



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE CISPLATINO, ITRACONAZOL E
HIDROXICLOROQUINA EN LÍNEAS TUMORALES DE CABEZA Y CUELLO
EXPUESTAS A BAJAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA**

Antonia Andrea Pardo Ojeda

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
José Antonio Jara Sandoval**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt de Iniciación 11180533
Santiago – Chile
2021**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE CISPLATINO, ITRACONAZOL E
HIDROXICLOROQUINA EN LÍNEAS TUMORALES DE CABEZA Y CUELLO
EXPUESTAS A BAJAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA**

Antonia Andrea Pardo Ojeda

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
José Antonio Jara Sandoval**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt de Iniciación 11180533
Santiago - Chile
2021**

Dedicatoria

Quiero dedicar esta etapa y trabajo, que a momentos se vio muy inalcanzable a mi familia, mi madre que siempre me apoyo en todos los obstáculos que se me presentaban, gracias por siempre tenerme más fe que yo a mi misma, siempre me transmitiste seguridad, que todo resultaría bien. A mi padre, que siempre me dio ánimo para no rendirme, y me ayudó a mirar las cosas desde una diferente perspectiva y a no desistir cuando muchas veces quise hacerlo. A mi hermana que siempre estuvo en los momentos más difíciles, y en los mejores, tanto como para felicitarme, como para aterrizarme, muchas gracias por ser mi cable a tierra y por ayudarme a desarrollar la capacidad de analizar mis oportunidades de manera sabia y tranquila.

Finalmente quiero agradecer a mi familia del sur, que a pesar de que se encuentren lejos siempre me dieron el apoyo que necesitaba. A mi angelito de la guarda, que me acompañó en este proceso desde que entré, mi tía Mosty, muchas gracias por su apoyo incondicional. También, como no agradecer a mi prima Fernanda, que estuvo experimentando junto a mi este último proceso de la carrera, apoyándonos y dándonos animo hombro a hombro.

Por último, pero no menos importante, quisiera agradecer a mis gatos, especialmente a mi hermosa siamesa de ojos cristalinos, mi Moka, que siempre estuvo ahí, pegada a mí, especialmente en los momentos más estresantes para darme apoyo incondicional y paz. Casi ya no la dejaba dormir de la angustia, hasta se le cayó gran parte de su pelaje, pero te prometo que dormiremos ahora en adelante tranquilamente juntas como solíamos hacerlo.

Agradecimientos

Al Doctor José Jara Sandoval y al Proyecto FONDECYT iniciación N°11180533

Al laboratorio de Farmacología y Farmacocinética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile

Al Doctor Alfredo Molina Berríos

A la Doctora Carla Lozano Moraga

A la Doctora Daniela Adorno Farías

A la Bioquímica Jennifer Faúndez

A la Egresada Daniela Martínez Camus

Al Egresado Sebastián Yévenes Huaiquinao

A la Tesista Sheyla Cortez Gomez

Al Tesista Denny Vidal Canales

INDICE

I.	RESUMEN.....	7
II.	MARCO TEÓRICO	9
1.	Conceptos básicos y epidemiología del cáncer.....	9
1.1.	Cáncer en Chile	10
2.	Cáncer de Cabeza y Cuello (CCyC).....	11
2.1	Generalidades y epidemiología.....	11
2.2.	Cáncer de laringe.....	12
2.3.	Cáncer Oral	12
3.	Tratamientos contra CCyC.....	14
3.1.	Cisplatino, el fármaco <i>gold standar</i>	14
4.	Heterogeneidad tumoral y resistencia terapéutica.....	16
5.	Metabolismo energético tumoral	17
6.	Mitocondria en células tumorales	18
6.1.	Mitocondria como blanco farmacológico.....	19
6.2.	Itraconazol, un posible fármaco pro-apoptótico	21
7.	Autofagia como mecanismo de resistencia en CCYC	22
7.1.	Hidroxicloroquina como inhibidor de autofagia	23
8.	Disponibilidad de glucosa	24
9.	Síntesis.....	26
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
1.	Hipótesis	27
2.	Objetivos Generales	27
3.	Objetivos Específicos.....	27
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1.	Materiales	28
1.1.	Compuestos e insumos	28
1.2.	Líneas celulares	29
2.	Métodos	29
2.1.	Preparación de las muestras	29
2.2.	Ensayos de Viabilidad Celular	30
3.	Western Blot	31
3.1.	Preparación de las muestras	31
3.2.	Método de Bradford.....	31
3.3.	Electroforesis y Transferencia	32

3.4. Inmunodetección	33
4. Análisis estadístico	34
V. RESULTADOS.....	35
1. Ensayos de Viabilidad Celular.....	35
1.1. Eficacia y Potencia Farmacológica.....	35
2. Evaluación de los niveles de expresión de las proteínas LC3B-II y VDAC1.....	43
VI. DISCUSIÓN.....	45
1. Ensayos de viabilidad	45
1.1. Eficacia y Potencia farmacológica	45
1.2. Selectividad Farmacológica.....	49
2. Evaluación de expresión de LC3B-II y VDAC1.....	49
VII. CONCLUSIONES	55
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	57

Índice de Figuras

Figura 1. Anatomía de la laringe, (NIH, 2020).	12
Figura 2. Manifestación clínica de Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE), Extraído de (Bolesina y cols., 2012) y (Del Corso y cols., 2016).	13
Figura 3. Mecanismos de resistencia de las células tumorales al cisplatino, Modificado de (Ribeiro y cols., 2018).	15
Figura 4. El concepto de <i>Cancer Stem Cell</i> (CSC), (Desai y cols., 2018)..	17
Figura 5. Roles funcionales de VDAC1 en condiciones fisiológicas, (Magri y cols., 2018).	20
Figura 6. Modelo de inhibición de VDAC1, Modificado de (Head y cols., 2015). ...	22
Figura 7. Proceso autofágico, Modificado de (Verbaanderd y cols., 2017).....	24
Figura 8. AMPK regula la homeostasis metabólica y energética en las células tumorales, (Chaube y Bhat, 2016).	25
Figura 9. Curva estándar BSA	32
Figura 10. Etapas de la técnica Western Blot.	33
Figura 11. Efectos citotóxicos de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina en cultivos con baja glucosa de CAL-27	35
Figura 12. Gráficos. Comparación entre los distintos valores de IC ₅₀ en CAL-27 ..	37
Figura 13. Efectos citotóxicos de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina en cultivos con baja glucosa de HEP-2.	37
Figura 14. Gráficos Comparación entre los distintos valores de IC ₅₀ en HEP-2. ...	39
Figura 15. Efectos citotóxicos de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina en cultivos con baja glucosa de DOK.	39
Figura 16. Gráficos. Comparación entre los distintos valores de IC ₅₀ en DOK.....	41
Figura 17. Gráfico. Comparaciones de los valores de IC ₅₀ de CIS entre las líneas tumorales.....	41
Figura 18. Gráfico. Comparaciones de los valores de IC ₅₀ de ITRA entre las líneas tumorales.....	42
Figura 19. Gráfico. Comparaciones de los valores de IC ₅₀ de HQC entre las líneas tumorales.....	42
Figura 20. Niveles proteicos de LC3B-II y VDAC1 en líneas celulares de CAL-27 y HEp-2 expuestas a medio con Alta y Baja Glucosa por 24 horas.	44

Índice de Tablas

Tabla 1. Escala de concentraciones de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina	30
Tabla 2. IC ₅₀ a las 24, 48 y 72 horas en la línea celular CAL-27..	36
Tabla 3. IC ₅₀ a las 24 horas, 48 horas y 72 horas en la línea celular HEP-2.	38
Tabla 4. IC ₅₀ a las 24 horas, 48 horas y 72 horas en la línea celular DOK.....	40
Tabla 5. IC ₅₀ de Cisplatino en CAL-27, HEP-2 y DOK.....	41
Tabla 6. IC ₅₀ de Itraconazol en CAL-27, HEP-2 y DOK.....	42
Tabla 7. IC ₅₀ de Hidroxicloroquina en CAL-27, HEP-2 y DOK.....	42

I. RESUMEN

Introducción:

El Cáncer de Cabeza y Cuello representa la sexta neoplasia maligna más incidente en el mundo. El quimioterapéutico más utilizado en su tratamiento es Cisplatino. No obstante, las células tumorales adquieren resistencia a este fármaco. La baja disponibilidad de glucosa en el microambiente selecciona poblaciones de células más resistentes o *Cancer Stem Cells*, por medio de la inducción del proceso autofágico. Por tanto, es necesario el desarrollo de tratamientos más eficaces que ataquen a estas células. Se ha descrito que fármacos de uso clínico como Itraconazol, un antifúngico, e Hidroxicloroquina, un inmunomodulador, podrían tener efecto antitumoral, ya que Itraconazol inhibe el canal VDAC1 e Hidroxicloroquina inhibe la autofagia, siendo la proteína LC3B-II uno de sus principales biomarcadores. Este estudio evalúa el efecto citotóxico de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina en líneas celulares de CCyC cuando se encuentran en un medio con baja glucosa.

Materiales y métodos: Los ensayos se realizaron en cultivos de CAL-27, HEP-2 y DOK expuestos a bajas concentraciones de glucosa. Mediante el ensayo de MTT se determinó su potencia y selectividad citotóxica. Por último, utilizando la técnica de Western Blot se determinó el impacto de la baja concentración de glucosa en la expresión de las proteínas LC3B-II y VDAC1 en los cultivos tumorales.

Resultados: Se obtuvieron valores de IC₅₀ mayores en cultivos con baja concentración de glucosa para Cisplatino, en cambio, para Itraconazol e Hidroxicloroquina los valores obtenidos resultaron menores en CAL-27 y HEP-2. Ninguno de los tres fármacos es selectivo para las células tumorales, ya que con la línea displásica DOK se obtuvo una disminución de la viabilidad considerable. Aumentó la expresión de LC3B-II y VDAC1 ($P < 0,05$) en cultivos de CAL-27 y HEP-2 en baja glucosa.

Conclusiones: Itraconazol e Hidroxicloroquina aumentaron su citotoxicidad en CAL-27 y HEP-2 al estar en bajas concentraciones de glucosa. Hidroxicloroquina posee una gran eficacia y concentraciones aplicables clínicamente (IC₅₀ 25-35,2

μM). Es necesario a futuro evaluar selectividad con otras líneas celulares sanas. Se puede inferir que las bajas concentraciones de glucosa tal vez podrían aumentar el proceso autofágico y desencadenar un cambio en el metabolismo energético mitocondrial de CAL-27 y HEP-2.

II. MARCO TEÓRICO

1. Conceptos básicos y epidemiología del cáncer

El cáncer o también denominadas neoplasias malignas es un conjunto de enfermedades multifactoriales que se caracteriza por la multiplicación descontrolada de células. Es una enfermedad que puede ramificarse a distintas zonas del cuerpo provocando no solo el deterioro de distintos órganos, sino que en su etapa más tardía la muerte (Instituto Nacional del Cáncer (NIH), 2015).

Es considerada la segunda causa de muerte a nivel mundial. Además, una de cada 6 muertes es atribuida al cáncer llegando a provocar 9,6 millones de muertes en el año 2018 (Organización Mundial de la salud (OMS), 2018).

La alta tasa de mortalidad es un resultado que se traduce en la detección tardía de esta enfermedad, y por consiguiente su retraso en el tratamiento. Se estima que el 75% de los cánceres en América son evitables siguiendo una correcta estrategia preventiva que se basa en el diagnóstico temprano y la reducción de sus factores de riesgo (Arem y Lofffield, 2017; Harvard Health Publishing, 2019).

Dentro de los factores de riesgo más influyentes destacan el consumo de tabaco, el exceso de peso y obesidad, mala alimentación en conjunto a una vida sedentaria, el abuso de alcohol, infecciones virales (virus papiloma humano, virus hepatitis B y C) y, por último, el estar expuesto a distintos agentes ambientales (contaminación del aire, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioletas, etc.) (Cancer Research UK, 2015). El tabaquismo es el factor de riesgo de cáncer más importante y ocasiona aproximadamente el 22% de las muertes por cáncer a nivel mundial (Forouzanfar y cols., 2016).

Se ha estimado que para el año 2040 la incidencia de nuevos casos de cáncer aumentará hasta 29,5 millones, un 63,1% más respecto a 2018, esto se cree debido a una mayor tasa de envejecimiento en la población (GLOBOCAN, 2018).

1.1. Cáncer en Chile

Existen diferencias regionales en la incidencia y mortalidad por cáncer, así como el tipo de cáncer predominante, esto determinado por los factores de riesgo, disponibilidad y uso de prácticas médicas de cada país (Itriago y cols., 2013).

La situación epidemiológica de mortalidad en Chile en el año 2010 muestra que el cáncer ocupa el segundo lugar dentro de las causas de muerte. La prevalencia nacional para cáncer es un 24,6% y se observa una prevalencia mayor en las regiones de Antofagasta (29,0%), Coquimbo (26,2%), Valparaíso (25,5%) y Región Metropolitana (25,1%). Los cánceres más prevalentes en nuestro país son: estómago, mama, próstata, pulmón, vesícula y colon, respectivamente. En los hombres, las tasas más altas corresponden a cáncer de próstata, estómago, piel (no melanoma), tráquea, bronquio y pulmón, colon y testículo. En cambio, en las mujeres, las tasas más altas corresponden a cáncer de mama, piel (no melanoma), vesícula biliar, cuello uterino, estómago y colon (Ministerio de Salud (MINSAL), 2018).

Actualmente, el desafío más grande que trata de combatir el sistema público es la reducción de las tasas de mortalidad. Por esta razón, en el año 2013 se incluyeron algunos cánceres dentro de las Garantías Explícitas de Salud (GES), programa ministerial en el que ofrecen garantías de acceso, calidad, protección financiera y oportunidad a distintas enfermedades o condiciones de salud. Ayudando de esta forma a cubrir costos económicos del diagnóstico y tratamiento de ésta, así como otorgando un acceso oportuno a la atención (MINSAL, 2018). En octubre del año 2020, debido a la alta incidencia de esta patología, se promulgó la Ley Nacional del Cáncer, que tiene por principal objetivo establecer un marco normativo para la planificación de políticas públicas, programas y acciones destinadas a establecer las causas y prevenir el aumento en la incidencia de esta enfermedad, así como su adecuado tratamiento y recuperación (MINSAL, 2020).

2. Cáncer de Cabeza y Cuello (CCyC)

2.1 Generalidades y epidemiología

Es un conjunto de cánceres que se caracterizan principalmente por afectar las mucosas que revisten las zonas húmedas de la cabeza y del cuello, así como a las distintas glándulas que se encuentran en este territorio anatómico (NIH, 2017).

De acuerdo con la *International Agency for Research on Cancer* (IARC GLOBOCAN), más de 630.000 personas son diagnosticadas anualmente por este cáncer. Más del 90% de ellos son de histología escamosa, es por esta razón que se les denominan carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CCyC). Poseen comportamiento agresivo, incluso comprometiendo órganos y tejidos en etapas posteriores al tratamiento. El resto de las histologías corresponde a un 2% sarcoma y un 7% a adenoescamoso, melanoma y otros no especificados (Cárcamo, 2018).

El tabaquismo y el consumo de alcohol son los principales factores de riesgo reconocidos, atribuyéndose un efecto en 75% de los casos, con un efecto sinérgico cuando son combinados. El tabaco se asocia más con cáncer de laringe, mientras que el consumo de alcohol con cáncer de cavidad oral y faringe. Se ha estudiado que existen cepas del virus papiloma humano que se encuentran ligadas al cáncer de garganta por medio de transmisión sexual, estas son (VPH16 asociado a cáncer oral y VPH18 asociado a cáncer laríngeo) las que se manifiestan sobre la base de la lengua y los pliegues de las amígdalas en una zona muy posterior. Debido a esta razón es muy difícil su diagnóstico (Cardemil, 2014; American Dental Association, 2019).

Existen distintos tipos de CCyC dependiendo de la zona anatómica afectada; orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, senos paranasales y cavidad nasal, glándulas salivales, laringe y cavidad oral (Marur y Forastiere, 2016).

2.2. Cáncer de laringe

El cáncer de laringe es un tipo de cáncer de CCYC que afecta principalmente las zonas de la supraglotis, glotis y subglotis, áreas donde se encuentran principalmente las cuerdas vocales (Figura 1). La laringe es una parte de la garganta, entre la base de la lengua y la tráquea (Jones y cols., 2016).

Sus principales signos y síntomas son: dolor de garganta o tos que no desaparece, dificultad o dolor al tragar, dolor de oído, bulto en el cuello o la garganta y cambio de la voz o ronquera. La mayor parte de los cánceres de laringe se forman en las células escamosas, que son células delgadas y planas que revisten el interior de la laringe (Rinkel y cols., 2014).

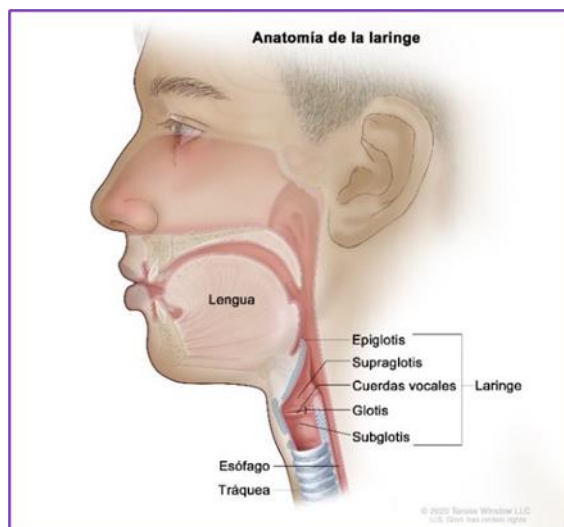


Figura 1. Anatomía de la laringe, (NIH, 2020). Las tres partes principales de la laringe son; la supraglotis (incluida la epiglotis), la glotis (incluidas las cuerdas vocales) y la subglotis.

2.3. Cáncer Oral

El cáncer oral es un tipo de CCYC que se puede encontrar principalmente en los labios, los dos tercios anteriores de la lengua, mucosa bucal, piso de boca, encía adherida, trígono retromolar y paladar duro (Bagan y cols., 2010). El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más común de origen epitelial en la cavidad bucal, representa aproximadamente al 90% de los casos y suele afectar en su mayoría a hombres mayores de 40 años de edad. Los sitios de localización más frecuentes son la lengua y el piso de la boca (Figura 2) (Boza, 2017).

Los signos y síntomas más habituales para su detección son; una lesión bucal que no regenera (signo más frecuente) que generalmente corresponde a una úlcera de fondo oscuro, dolor persistente en el área bucal, bulto o engrosamiento en la mejilla, leucoplasia/eritroplasia/leucoeritroplasia sobre las encías, lengua, amígdalas o el revestimiento de la boca, dolor de garganta o dificultad para masticar y tragar, cambios en la voz, una protuberancia en cuello que generalmente corresponde a una adenomegalia linfática, mal aliento y abrupta pérdida de peso. Estas lesiones son consideradas como precancerosas, quiere decir que pueden provocar cáncer, pero no basta solo con poseerlas para desarrollar signos de malignidad (Markopoulos, 2012).

Estos signos y síntomas al ser tan inespecíficos crean la necesidad de estar en constante revisión con un profesional, en este caso son los odontólogos los que cumplen este rol, si estos no remiten en 2 semanas es importante informarlo para descartar un diagnóstico de futura neoplasia maligna (Mateo-Sidrón y Somacarrera, 2015; NIH, 2018).

Generalmente la tasa de mortalidad de esta patología se da por el diagnóstico tardío (Fase III-IV) que corresponde actualmente a el 60% aproximadamente de los cánceres diagnosticados. La sobrevivida a 5 años es del 50%, lo que quiere decir que es una enfermedad de rápido progreso, aunque prevenible (Santelices y cols., 2016).

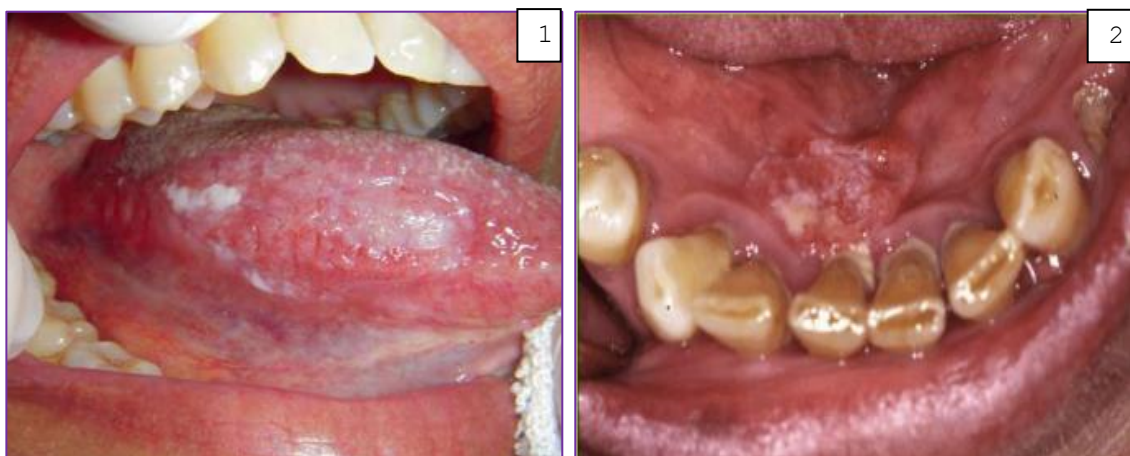


Figura 2. Manifestación clínica de Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE), Extraído de (Bolesina y cols., 2012) y (Del Corso y cols., 2016). 1.Carcinoma oral de células escamosas en borde lateral derecho de la lengua. 2. Carcinoma oral de células escamosas en piso de boca.

3. Tratamientos contra CCyC

En los últimos años han acontecido notables avances en el manejo inicial de estos pacientes gracias a la cooperación multidisciplinaria en los tratamientos. Cuando se diagnostica de forma precoz (estadio I o II) el CCyC puede tratarse con cirugía y/o radioterapia. Desafortunadamente, el 75% de los pacientes con CCyC se diagnostican con enfermedad localmente avanzada. En estos estadios más avanzados (III y IV) se han integrado estrategias más recientes al tratamiento local, tales como la quimioterapia de inducción y/o quimiorradioterapia en combinación con cirugía; sin embargo, la tasa de supervivencia a 5 años continúa siendo de alrededor del 30%; además, el 60% de los pacientes experimentarán una recaída/recurrencia locorregional o a distancia en los 2 años siguientes al tratamiento inicial (García y Bueno, 2008; Le y Hanna, 2018).

3.1. Cisplatino, el fármaco *gold standar*

Dentro de los quimioterapéuticos más comúnmente utilizados para el tratamiento de cáncer se encuentra el 5-fluorouracilo y los fármacos en base a platino, como carboplatino, oxaliplatino o cisplatino (Wise-draper y cols., 2013).

En los últimos 50 años Cisplatino o cis-diaminocloroplatino (CDDP) ha sido el fármaco quimioterapéutico más utilizado y estudiado. Esto debido a su seguridad clínica y su eficacia en la utilización de distintos cánceres humanos como cáncer de vejiga, pulmón, ovario, testículo, linfomas, sarcomas, de cabeza y cuello (CCyC), etc. (Pendleton y Grandis, 2013; Dasari y Tchounwou, 2014).

El mecanismo de acción que se describe para el CDDP es la capacidad que tiene para formar enlaces covalentes con las bases purinas del ADN de la célula tumoral; provocar daños en la secuencia genómica del ADN, y posteriormente inducir la apoptosis de la célula tumoral. A pesar de esto, se ha descubierto en varios estudios más actuales que uno de los obstáculos más grandes en esta terapia es que se comienza a desarrollar resistencia a cisplatino, en la cual el tratamiento pierde su eficacia, así como se ha visto asociado igualmente a numerosos efectos secundarios indeseables como problemas renales graves, reacciones alérgicas,

disminución de la inmunidad a infecciones, trastornos gastro-intestinales, hemorragias, pérdida de la audición, xerostomía y mucositis (Aldossary, 2019).

Múltiples investigaciones han determinado que la adquisición de la resistencia a CDDP es de origen multifactorial, en la que involucra los factores propios del hospedero, cambios genéticos, epigenéticos y numerosos eventos moleculares (Yamano y cols., 2009). Se han planteado a grandes rasgos tres posibles mecanismos celulares que explicarían el desarrollo de esta resistencia; el aumento en los mecanismos de reparación del ADN, una alteración en la acumulación intracelular de cisplatino mediada por transportadores celulares que aumentan la exportación y bloquean su entrada, o por una inactivación intracelular del CDDP al conjugarse con moléculas como glutatión y metalotioneinas (Figura 3) (Makovec, 2019). Estas moléculas participan en los mecanismos de detoxificación celular ya que son ricas en aminoácidos que contienen azufre como cisteína o metionina, permitiendo de esta manera que el platino se una intensamente al azufre, inactivando al CDDP. La unión del glutatión con el CDDP debe ser catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa (GST) que hace que la molécula, una vez conjugada, se vuelva menos reactiva y más susceptible de ser externalizada de la célula por las bombas específicas dependientes de ATP como las MRP1 o MPR2 (Germà-Lluch y Piulats., 2013).

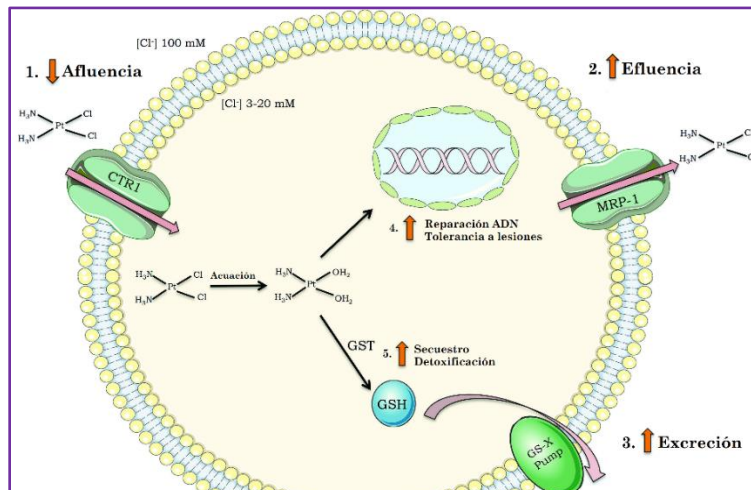


Figura 3. Mecanismos de resistencia de las células tumorales al cisplatino, Modificado de (Ribeiro y cols., 2018). 1. Disminución de la expresión de los canales transportadores y entrada del fármaco; 2 y 3. Salida del fármaco de las células (aumento de la expresión de canales transportadores de múltiples fármacos); 4. Capacidad de reparación del ADN; 5. Desintoxicación de fármacos (altos niveles de glutatión o glutatión S-transferasa); Abreviaturas: CTR1 (receptor de transporte de cloruro 1); GSH (glutatión); GST (glutatión S-transferasa); MRP-1 (proteína 1 asociada a la resistencia a múltiples fármacos); Bomba GS-X (bomba de exportación de conjugado S de glutatión dependiente de ATP).

4. Heterogeneidad tumoral y resistencia terapéutica

Los tumores sólidos se encuentran conformados por una compleja mezcla de diferentes subpoblaciones celulares en constante interacción con su microambiente (Cassidy y Bruna, 2017; Dagogo-Jack y Shaw, 2017). Este microambiente se encuentra compuesto por células sanguíneas, células linfáticas, vasos sanguíneos y una matriz extracelular (ECM) responsable de proporcionar nutrientes y soporte a las células tumorales (Arcucci y cols., 2016; Ribeiro y cols., 2020).

La heterogeneidad intratumoral, propuesta décadas antes, proporciona una explicación razonable para justificar el fracaso del tratamiento dirigido, el que se traduce en posterior desarrollo de recaídas y metástasis. Esto se debe a que la terapia selecciona subclones preexistentes que logran sobrevivir a la interacción con el fármaco por medio de mutaciones que obtuvieron para evitar su muerte celular (Mroz y Rocco, 2016).

Se han propuesto dos modelos para explicar el origen de la heterogeneidad, el modelo de *Cancer Stem Cells* (CSC) o Células Iniciadoras de Tumores (CTI) y el modelo de evolución clonal. Estos modelos, no son mutuamente excluyentes (Lovly y cols., 2016). La teoría de la evolución clonal tiene en cuenta las diferencias intrínsecas entre todas las células basadas en sus cambios genéticos y epigenéticos. Los clones más adaptados se seleccionan y contribuyen a la diversidad de la población de células tumorales (Thankamony y cols., 2020). En cambio, el modelo de las *Cancer Stem Cells* o Células Iniciadoras de Tumores considera responsables de la heterogeneidad tumoral a un subgrupo de células específicas que comparten propiedades biológicas con *Stem Cells* o Células madre. Estas se caracterizan por poseer capacidad de autorrenovación, así como de diferenciación en múltiples linajes y guiar el crecimiento tumoral, siendo capaces de replicar una nueva masa tumoral heterogénea de manera jerárquica. Últimamente se ha propuesto que son estas células las que adquieren la resistencia y sobreviven a los efectos de la quimioterapia, siendo posibles responsables de la invasión y crecimiento de nuevos tumores (Figura 4) (Zuoren y cols., 2012; Ferreira y cols., 2016). Evidencia emergente ha demostrado que las CSC tienen un fenotipo

metabólico diferente del resto de las células de la masa tumoral, y son estas actividades metabólicas las que participan directamente en el proceso de transformación de las CSC y que permiten la progresión tumoral (Chan Chae y Ho Kim, 2018).

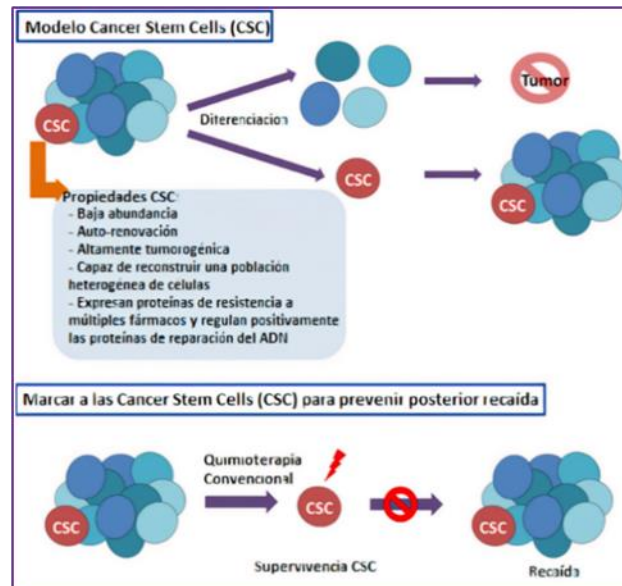


Figura 4. El concepto de *Cancer Stem Cell* (CSC), Extraído de (Desai y cols., 2018). Los tumores son heterogéneos y contienen a la mayoría de las células que no son o son poco tumorigénicas y un pequeño subconjunto de CSC. Las CSC se pueden distinguir funcionalmente de otras poblaciones por su capacidad para reconstituir un tumor diferenciado.

5. Metabolismo energético tumoral

Las células tumorales se caracterizan por tener preferentemente un metabolismo glucolítico aeróbico, esto quiere decir, que la mayor parte de su energía deriva de la glucólisis. Este proceso es el encargado de convertir la glucosa a lactato para posteriormente ganar energía por medio de su fermentación, aún en presencia de oxígeno disponible. A este comportamiento se le denomina Efecto Warburg, el que produce notoriamente menos energía que si la célula optará por la utilización del oxígeno en la vía de la fosforilación oxidativa (*OXPHOS*). No obstante, ha resultado ser beneficioso para éstas, ya que proporciona los precursores para diferentes vías metabólicas (aminoácidos y azúcares como lo son NADPH y ribosa), esenciales para la producción de ADN y ARN. Esta predilección por la vía glicolítica es necesaria para la proliferación y división de las células tumorales, para el crecimiento tumoral y la progresión a largo plazo a un estado de mayor malignidad (Fadaka y cols., 2017).

Las células tumorales se encuentran en constante interacción con cambios drásticos en el microambiente, como la hipoxia, la deprivación de nutrientes y la acidificación del medio. Últimamente se ha estudiado que existe una gran cantidad de células tumorales CSC que poseen una plasticidad notable en la adaptación metabólica. La reprogramación del metabolismo de la glucosa permite a estas células CSC satisfacer los requerimientos energéticos para mantener su actividad metabólica. Además, proporciona una gran ventaja para la supervivencia y crecimiento. Para la mantención de todos estos procesos las células recurren a la vía de la OXPHOS, ya que es la que proporciona mayor cantidad de energía. Este cambio adaptativo de vía metabólica glucolítica aerobia a fosforilación oxidativa se conoce como *Switch* glicolítico (Snyder y cols., 2018; Lin y cols., 2020).

Creciente evidencia sugiere fuertemente que la función mitocondrial en estas células es crítica y juega un papel crucial en las funciones de las CSC, como en su capacidad de ser iniciadora de tumores, la migración y la resistencia a medicamentos quimioterapéuticos (Chan Chae y Ho Kim, 2018).

6. Mitocondria en células tumorales

Estos organelos citoplasmáticos no sólo son los encargados de la producción de energía en la célula, sino que poseen variadas funciones incluida la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), de moléculas involucradas en el estado redox, de la regulación de la señalización y muerte celular (apoptosis), y del metabolismo biosintético. Estas múltiples funciones las convierten en importantes sensores de estrés celular y permiten la adaptación celular a distintos medioambientes estresores (Vyas y cols., 2016).

Cuando la célula normal se ve bajo niveles de estrés fisiológico, es la mitocondria la encargada de la liberación de varios factores inductores de apoptosis pertenecientes a la vía intrínseca, incluido Citocromo c, que conducen a la activación de las caspasas e inducen la muerte celular (Indran y cols., 2011). Las mitocondrias están involucradas en la apoptosis por medio de otros mecanismos, incluida la captación de Ca^{+2} intracelular y producción de H_2O_2 a través de la

dismutación del superóxido mitocondrial por la enzima manganeso superóxido dismutasa. El H_2O_2 difunde libremente y activa los canales de K^+ de la membrana plasmática, regulando así la afluencia de Ca^{+2} y, por tanto, la activación de caspasas (Bhat y cols., 2015).

Se han descrito mutaciones del ADN mitocondrial en varios cánceres que parecen alterar el metabolismo mitocondrial, mejorar la tumorigénesis y permitir la adaptación de las células tumorales a entornos cambiantes. La alteración del metabolismo provoca la disminución del potencial de membrana mitocondrial, reduciendo la captación de Ca^{+2} mitocondrial, disminuyendo así la activación de la vía de apoptosis intrínseca mitocondrial. Además, aumenta la producción de ROS, cambiando el estado redox celular, alterando así las actividades de factores de transcripción como HIF-1 α para cambiar la expresión génica y estimular la proliferación y supervivencia de las células tumorales (Wallace, 2012).

6.1. Mitocondria como blanco farmacológico

Al dilucidar las diferencias entre las mitocondrias de las células tumorales y las de las células normales se ha puesto especial atención en el desarrollo de varios agentes farmacológicos dirigidos específicamente a las mitocondrias llamados “Mitocans”, estos pueden potenciar el proceso pro-apoptótico (Guerra y cols., 2017).

Un enfoque es aumentar la conductancia del complejo del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTPC), lo que eventualmente conduce a la ruptura de la membrana mitocondrial y a la liberación de factores pro-apoptóticos del espacio intermembrana mitocondrial, los cuales son eventos clave en la apoptosis intrínseca (Fulda y cols., 2010). Esto se puede lograr mediante compuestos que actúan directamente sobre los componentes del mPTPC como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y el canal de aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1), o mediante compuestos que agotan los inhibidores del mPTPC como la glucosa, el fosfato de creatina y el glutatión (Yang y cols., 2016).

El canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1), es un canal encargado de regular el metabolismo y las funciones energéticas mitocondriales. Corresponde a

la proteína formadora de poros más abundante en la membrana externa mitocondrial, por lo que es considerada la intermediaria entre la mitocondria y el resto de la célula. Actúa como canales inespecíficos transportando ATP que se intercambia continuamente con ADP, NAD^+/NADH y otros intermediarios del ciclo de Krebs. También regula el flujo de iones pequeños (Cl^- , K^+ , Na^+ y Ca^{2+}), el transporte de ácidos grasos, la distribución del colesterol en las membranas mitocondriales y la concentración de Ca^{2+} citosólico, manteniendo este último en niveles fisiológicos (Magri y cols., 2018). Además, participa en la regulación de la apoptosis por medio de la interacción con proteínas reguladoras como Hexoquinasa II (HK II), Bcl-2 y Bcl-xL, las cuales se encuentran expresadas en gran medida en variados tipos de cáncer (Figura 5) (Shoshan-Barmatz y cols., 2017).

Junto con las funciones mencionadas anteriormente (Figura 5), estudios han demostrado que la HK-II unida a VDAC1 previene la apoptosis mediada por mitocondrias desencadenada por Bax o Bak. Adicionalmente, se evaluó que el desacoplamiento de HK II de las mitocondrias conduce a la liberación de citocromo c. Esto sugiere que HK II, cuando se une a VDAC1, bloquea la interacción de VDAC1 con los miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2. Por lo que el desacoplamiento farmacológico de HK II y VDAC1 logra de igual forma ser beneficioso, ya que reduce la supervivencia de las células tumorales y facilita el proceso de muerte celular (Camara y cols., 2017).

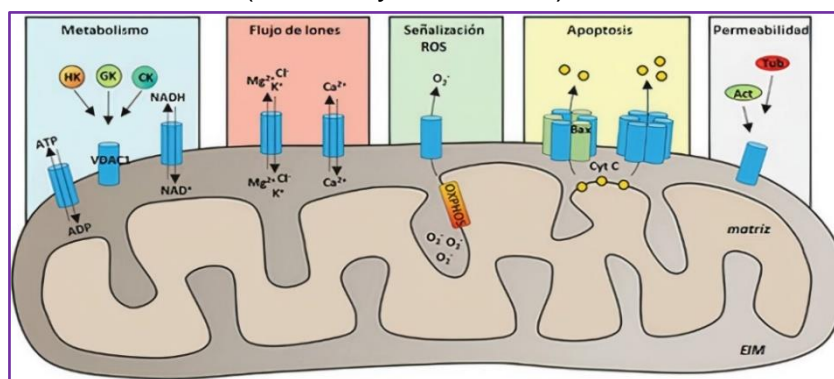


Figura 5. Roles funcionales de VDAC1 en condiciones fisiológicas, (Magri y cols., 2018). VDAC1 es la puerta principal para metabolitos, como ATP / ADP y $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$, pero también para intermediarios del ciclo de Krebs, colesterol y glutamato. Además, mediante la interacción con las hexoquinasas (HK), la glucoquinasa (GK) y la creatina quinasa (CK), VDAC1 controla el flujo de iones de magnesio, cloruro y potasio, así como de calcio, participando en el mantenimiento del nivel de Ca^{2+} citosólico en rango fisiológico. La evidencia destacó que VDAC1 actúa como un canal de liberación preferencial para el anión superóxido. Al igual que se considera un regulador de la apoptosis, promueve la liberación del citocromo c (CYT C) al citosol y activación de la apoptosis. Proteínas del citoesqueleto, como Actina (Act) o Tubulina (Tub), se unen a VDAC1 participando en la regulación del canal.

6.2. Itraconazol, un posible fármaco pro-apoptótico

Se ha estudiado que un fármaco que actuaría de esta manera es el tradicional antifúngico Itraconazol (ITRA), utilizado principalmente en infecciones sistémicas por hongos. Este fármaco aprobado por la FDA y el ISP corresponde a un compuesto azólico que actúa inhibiendo la enzima lanosterol 14 α -dismetilasa, enzima oxidativa asociada al citocromo P450 (CYP51), responsable de la conversión de lanosterol en ergosterol, componente indispensable de las membranas celulares en hongos (López y cols., 2016). Además de ser utilizado ampliamente en clínica es sabido que posee efectos a nivel microbiológico (Hu y cols., 2017).

Las propiedades antitumorales de ITRA se atribuyen en parte a la inhibición de la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis. Además, el tratamiento con ITRA puede inhibir la vía de señalización Hedgehog, vía principalmente encargada durante el desarrollo embrionario de la proliferación y diferenciación celular, así como de la homeostasis tisular post-embrionaria (Kim y cols., 2010). En un estudio realizado en el año 2020 se evaluó el efecto de ITRA en cultivos celulares de cáncer de colon en los que se observó; inhibición de la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* por medio de la activación de mecanismos apoptóticos, la inducción de autofagia, así como la inducción de apoptosis y finalmente la inhibición de la vía de señalización Hedgehog (Deng y cols., 2020).

De igual manera, ITRA actúa inhibiendo la proteína mitocondrial VDAC1 (Figura 6), lo que induce el aumento en la relación AMP: ATP intracelular. Esto provoca la estimulación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), desencadenando finalmente la inhibición de la vía del complejo 1 del blanco de rapamicina en células de mamífero (mTORC1), principal vía encargada de la supervivencia celular (Head y cols., 2015).

En los últimos años, se ha observado un aumento en las tasas de supervivencia de pacientes al ser tratados con itraconazol que padecían cáncer de pulmón, de ovario, de mama triple negativo, de páncreas y de vías biliares (Jiang y cols., 2018).

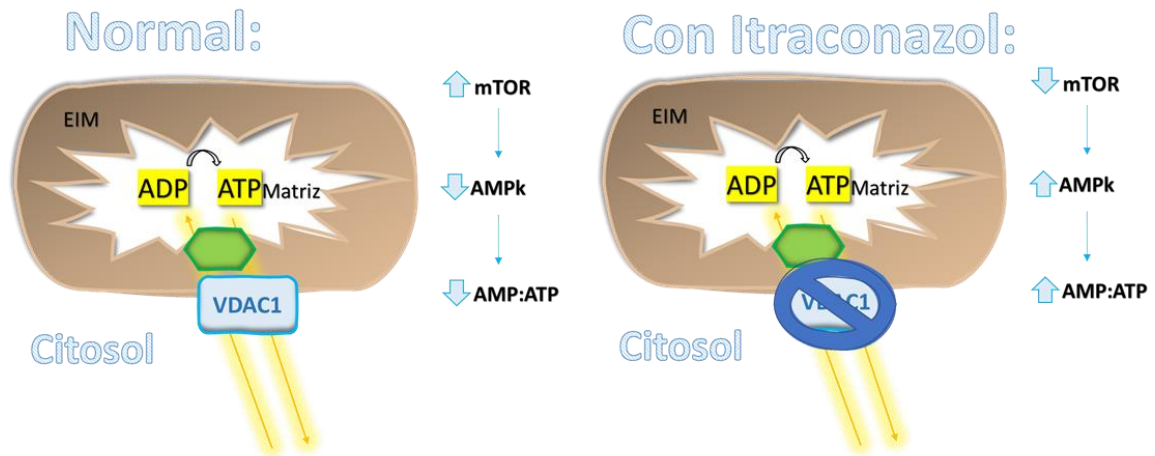


Figura 6. Modelo de inhibición de VDAC1, Modificado de (Head y cols., 2015). La unión de Itraconazol a VDAC1 conduce a un aumento de la relación AMP/ATP intracelular, lo que provoca la activación de AMPK y, en última instancia, la inhibición de mTOR.

7. Autofagia como mecanismo de resistencia en CCYC

Se ha observado que a pesar de la utilización de mecanismos que induzcan apoptosis en estas células tumorales, éstas de igual forma logran encontrar otras vías de escape a este proceso. La autofagia o macroautofagia es un proceso intracelular de tipo catabólico que consta de la degradación de constituyentes citoplasmáticos mediado por lisosomas (Adhailiya y cols., 2016). Este mecanismo se activa en respuesta a condiciones de estrés celular provocados por inanición u exposición a microambientes hipóxicos (Cosway y Lovat, 2016). Cumple variadas funciones dentro de los cuales se encuentran; adaptación celular frente a la inanición nutricional, la eliminación de proteínas y organelos dañados, regulación del envejecimiento celular y eliminación de microorganismos presentadores de antígenos (Ravanan y cols., 2017). En el tumor la autofagia tiene el rol principal de velar por la supervivencia celular frente al estrés metabólico (Mathew y cols., 2007).

A grandes rasgos este mecanismo consta de 6 etapas:

La primera llamada *iniciación/inducción* se caracteriza por la inhibición de la vía mTORC1, la cual se ve afectada por el estado de estrés metabólico por inanición. Esta vía por un complejo proceso comienza la inducción de la macroautofagia. La segunda etapa o *Nucleación* consta de la formación del Fagósforo, una doble membrana que se presume podría haber contribuido el Aparato de Golgi y el retículo

endoplásmico, que luego de formada sufre un proceso de *Elongación*, correspondiente a la tercera etapa. Es en ese momento que se cierra la membrana dando origen al Autofagosoma en la cuarta etapa de *Fusión/Cierre*, para que finalmente en la etapa de *Maduración* se una al lisosoma formando el complejo Autofagolisosoma que se encargara de la última etapa, la *Degradación* (Parzych y Klionsky, 2014).

Se han descrito en estudios anteriores biomarcadores asociados a el proceso de autofagia como LC3B-II encargado de la formación del autofagosoma y beclin-1 que participa en las etapas de nucleación y maduración, entre otros (Kang y cols., 2011).

7.1. Hidroxicloroquina como inhibidor de autofagia

Una opción para inhibir este mecanismo de escape celular es por medio de la utilización de Hidroxicloroquina, un derivado de cloroquina que ha sido descrito como un inhibidor inespecífico de autofagia. Este fármaco utilizado originalmente como tratamiento contra la malaria y como inmunosupresor, se acumula en los lisosomas de las células tumorales, neutralizando el pH e inhibiendo la función catalítica del lisosoma (Figura 7) (Cook y cols., 2014). En variados estudios se sugiere que la autofagia promueve la quimiorresistencia, actuando como un mecanismo de resistencia y que, al inhibirse, aumenta la quimiosensibilidad en las células tumorales, e incluso tendría un efecto de sinergia con los tratamientos actuales (Lin y cols., 2019). Por otro lado, en diferentes estudios se ha sugerido que la autofagia prolongada causa muerte celular programada tipo II que contribuiría a la supresión de la progresión del tumor (Guo y cols., 2012). Además, la autofagia posee un rol anti-metastásis mediante la regulación de las respuestas de necrosis e inflamación. En metástasis temprana, la autofagia también reduce la invasión y migración de células cancerosas desde los sitios de origen. Sin embargo, en las etapas avanzadas de la metástasis, la autofagia actúa en un papel pro-metastásico mediante la promoción de la supervivencia de las células cancerosas y la colonización en sitios secundarios (Yun y Lee, 2018).

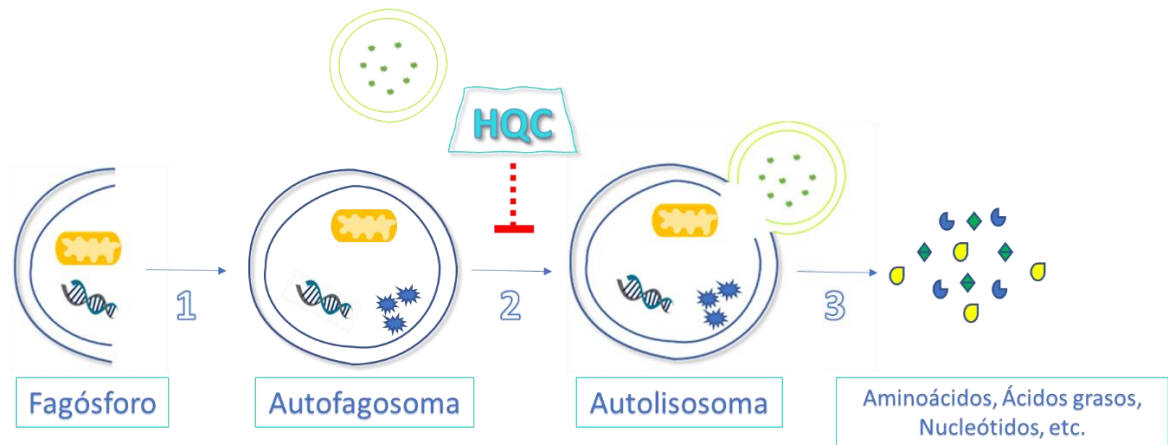


Figura 7. Proceso autofágico, Modificado de (Verbaanderd y cols., 2017). (1) Elongación del fagóforo y formación de vesículas. (2) Fusión del autofosoma y un lisosoma (3) Destrucción de los componentes celulares procesados por hidrolasas lisosomales. HCQ inhibe la autofagia a través de la interferencia con la acidificación lisosomal. (HCQ=Hidroxiclороquina).

8. Disponibilidad de glucosa

Es un hecho que la privación de nutrientes existe ampliamente en los tumores sólidos, esto debido al suministro deficiente de sangre dependiente de la cercanía de las células a los vasos sanguíneos. Los niveles de glucosa en los tumores suelen ser de 3 a 10 veces más bajos que los de los tejidos normales como resultado de la alta tasa de consumo de glucosa (alta actividad glucolítica) y la reducción de la vasculatura del tumor. Además, el crecimiento y progresión de los tumores dependen de este sustrato, por lo que privar a la célula puede resultar beneficioso para producir su apoptosis. Sin embargo, algunas células tumorales pueden reducir su dependencia de la glucosa activando procesos de formación/ahorro de ATP para mantener la viabilidad (Figura 8). Por otra parte, las células tumorales a menudo pierden sensibilidad a muchos fármacos antitumorales convencionales en condiciones de bajas concentraciones de glucosa (Navrátilová y cols., 2013).

La glucosa es una fuente de energía importante e inmediata en forma de ATP. Por tanto, es lógico considerar que se puede desencadenar igualmente el proceso de autofagia cuando la concentración de glucosa presente en el ambiente es baja, ya que la célula intenta adaptarse a este estrés energético. AMPK es un estimulador importante de la autofagia que se activa por una caída en los niveles de ATP. Dado que la AMPK es un sensor de energía, su actividad es importante en muchas

enfermedades humanas, como por ejemplo en carcinomas. Estas células tumorales al ser incubadas en condiciones de baja glucosa muestran una mayor actividad de AMPK que las células normales y, dado que la autofagia es más activa y produce metabolitos que generan energía, esto les proporciona una ventaja de supervivencia frente al estrés (Figura 8) (Moruno y cols., 2012).

En una publicación reciente se evaluó el efecto de la baja glucosa (Medios de cultivo con niveles de glucosa $\leq 1\text{g/L}$) en la expresión de la autofagia en células tumorales mamarias. Una de las proteínas que se observó fue LC3, en el que se concluyó que la expresión de este último dependía de la cantidad de glucosa en el ambiente, y del tiempo de incubación. Después de 12 horas de incubación en medio bajo en glucosa, el porcentaje de células tumorales con expresión de LC3 fue aproximadamente cinco veces mayor que en las células incubadas en medio con alto contenido de glucosa, esto dado por un aumento en la autofagia (Kretowski y cols., 2016).

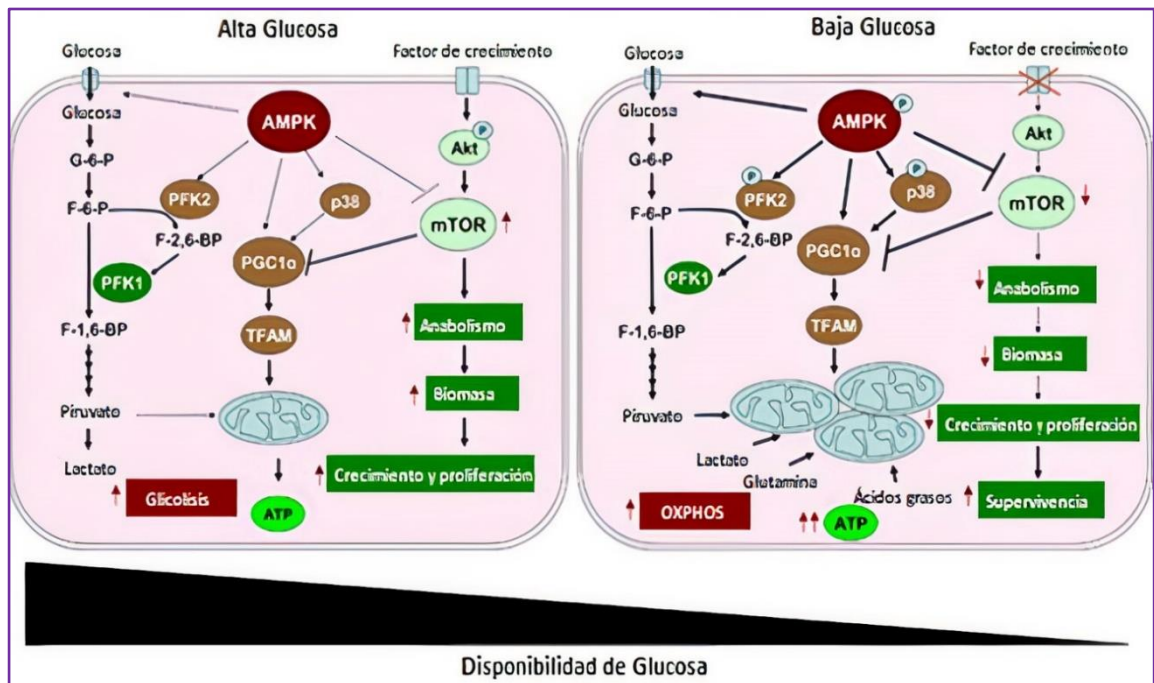


Figura 8. AMPK regula la homeostasis metabólica y energética en las células tumorales, (Chaube y Bhat, 2016). En condiciones de abundancia de nutrientes, se inhibe AMPK y se activa mTOR, lo que promueve la generación de biomasa que conduce al crecimiento y proliferación celular. Mientras está en condiciones de limitación de glucosa, AMPK, al activar p38 e inhibir mTOR, regula la expresión de PGC1- α , que controla la biogénesis mitocondrial en las células cancerosas, lo que permite el metabolismo oxidativo de fuentes de carbono distintas de la glucosa, como glutamina, lactato, ácidos grasos y aminoácidos, para generar ATP. Simultáneamente, AMPK puede elevar la tasa de glucólisis activando la utilización de PFK2 y glucosa para mantener la homeostasis metabólica. (Las líneas gruesas representan estado activado y las líneas delgadas representan el estado inactivado). F-6-P, fructosa 6-fosfato; F-1,6-BP, fructosa 1,6-bisfosfato; G6P, glucosa 6-fosfato.

9. Síntesis

El CCyC pertenece a la sexta neoplasia maligna más incidente en el mundo. Los tipos de cáncer más habituales son el oral y de laringe. Cisplatino (CIS) es el quimioterapéutico clásico más utilizado para el tratamiento de estas patologías, sin embargo, se han reportado grandes tasas de reincidencia y fracaso al tratamiento debido al desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las células tumorales. Debido a esto surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas para estos tipos de cáncer. Itraconazol (ITRA) e Hidroxicloroquina (HQC) son fármacos ampliamente utilizados en clínica como antifúngico y antimalárico, respectivamente. Estos han reportado tener un potencial efecto antitumoral. ITRA inhibe el canal VDAC1, disminuyendo principalmente el transporte de ATP provocando un estrés energético, lo que podría ser beneficioso ya que podría inducir el proceso de apoptosis celular. A pesar de esto, se ha estudiado que la célula recurre a la autofagia como vía de escape a las condiciones de estrés, evitando de esta manera la muerte celular. Sin embargo, HQC inhibe el proceso autofágico que en varios tipos de cáncer especialmente en CCyC se encuentra caracterizado por una alta expresión de la proteína LC3B-II, principal biomarcador de autofagia y también de estrés metabólico por falta de nutrientes como la glucosa. La baja disponibilidad de glucosa en el microambiente afecta de tal manera a las células tumorales que selecciona poblaciones de células más resistentes que logran adaptarse a estos estímulos llamadas Cancer Stem Cells (CSC), consideradas en varios modelos de estudio las responsables de los fracasos terapéuticos. Además de ser una inductora del proceso de autofagia. Este estudio evaluó el efecto citotóxico de CIS, ITRA e HQC sobre líneas tumorales de CCyC que se encuentran previamente en estado de estrés energético por baja disponibilidad de glucosa en el ambiente. Este modelo de estudio *in vitro* reproduce una variable muy importante que se encuentra presente en todos los tumores sólidos.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Itraconazol e Hidroxicloroquina ejercen un efecto citotóxico selectivo mayor que Cisplatino en células de carcinoma de cabeza y cuello sometidas a baja concentración de glucosa.

2. Objetivos Generales

Evaluar *in vitro* el efecto citotóxico de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello expuestas a bajas concentraciones de glucosa

3. Objetivos Específicos

Determinar el efecto citotóxico y selectividad de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina en cultivos de células tumorales de carcinoma escamoso de cabeza y cuello expuestas a baja concentración de glucosa.

Evaluar el cambio en la expresión de las proteínas LC3B-II y VDAC1 producidos por la baja concentración de glucosa en células tumorales de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El siguiente estudio realizado es una investigación de tipo experimental de laboratorio *in vitro*, en la cual se evalúan variables independientes (causas) bajo metodología científica en condiciones controladas y previamente establecidas con la finalidad de obtener y analizar las variables dependientes (efectos).

1. Materiales

1.1. Compuestos e insumos

Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa (1g/L) [REF: 31600-083, *Gibco® Cell Culture Basics*]; Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (4,5g/L) [REF: 11-055-1N, *Biological Industries®*]; Bicarbonato de Sodio [REF: S5761-500G, *Sigma®*]; Solución Penicilina-Estreptomicina (Penicilina 10.000 unidades/mL, Estreptomicina: 10 mg/mL) [REF: 03-031-1B, *Biological Industries®*]; Solución de Anfotericina B [REF: 03-028-1B, *Biological Industries®*]; Piruvato de Sodio 100x (100mM) [REF: 11360-070, *Gibco®*]; Suero Fetal Bovino (FBS) [REF: 04-127-1A, *Biological Industries®*]; Hidrocortisona [REF: H0888-5G, *Sigma® life science*]; Tampón fosfato-salino “10x PBS Liquid Concentrate” (pH=7,4) [REF: 6505-OP, *OmniPur®*]; Tripsina-EDTA Solución A (0,25%Tripsina y 0,02% EDTA) [REF: 03-050-1^a, *Biological Industries®*]; Dimetilsulfóxido [REF: D4540-1L, *Sigma®*]; Itraconazol [REF: M17-0526, *Dragpharma®*]; Hidroxicloroquina [REF: PHR1782-1G, *Sigma-Aldrich®*]; Cisplatino [REF:sc-200896, *Chem Cruz®*]; MTT [REF: M6494, *Thermo Fischer Scientific™*]; Solución Azul de Tripán [REF: 25-900-Cl, *Corning®*]; Membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF) [REF: 741260, *Macherey-Nagels®*]; Reactivo de extracción de proteínas de tejidos T-PER™ [REF: 78510, *Thermo Fischer Scientific™*]; Inhibidor de proteasas+fosfatasa sin EDTA 100x Halt™ [REF: 78441, *Thermo Fischer Scientific™*]; Albúmina Fracción V pH=7,0 (BSA) [REF: A1391,0100, *PanReac AppliChem ITW Reagents®*]; Reactivo de Bradford [REF: B6916-500ML, *Sigma®*]; Solución de Acrilamida 30% [REF: A4983,0500, *PanReac AppliChem ITW Reagents®*]; Persulfato de Amonio (APS) [REF: A3678-25G, *Sigma® Life Science*]; TEMED [REF: 161-0801, *Bio-Rad®*]; Cloruro de Potasio [REF: 793590-1KG, *Sigma-Aldrich®*]; Cloruro de Sodio [REF: 793566-1KG, *Sigma-Aldrich®*]; Tween®20 [REF: P1379-250ML, *Sigma-Aldrich®*]; Glicina [REF: BM-0820, *Winkler®*]; Trizma® base [REF: T1503-1KG, *Sigma®*]; Dodecilsulfato sódico [REF: L3771-100G, *Sigma®*]; Anticuerpo anti-VDAC1 / Porina [EPR10852 (B)] - Control de carga mitocondrial (*rabbit monoclonal*) [REF: ab154856, *abcam®*]; Anticuerpo anti LC3B (*rabbit polyclonal*) [REF: 2775S, *Cell Signaling Technology®*]; Anticuerpo anti-rabbit IgG unido a HRP (HRP: *Horseradish Peroxidase*) [REF: 7074S, *Cell Signaling Technology®*]; Anticuerpo β-actina (13E5) (*rabbit monoclonal*) mAb conjugado con HRP [REF:5125, *Cell Signaling Technology®*]; Clarity™ Sustrato ECL Western [REF: 170-5061, *Bio-rad®*]; Sustrato de máxima sensibilidad *SuperSignal™* West Femto [REF: 34095, *Thermo Fischer*

Scientific[™]]; Lápiz WesternSure® [REF: C80730-03, *Li-cor*®]; Tampón de muestra 4x Laemmli [REF: 161-0747, *Bio-rad*®]; Ditioneitol (*DTT*) [REF: D-9779, *Sigma*®]

1.2. Líneas celulares

Los ensayos se realizaron utilizando la línea celular CAL-27 correspondiente a carcinoma oral de células escamosas de lengua resistentes a cisplatino (*ATCC*®*CRL-2095*[™]). En conjunto a éstas se utilizaron además células de carcinoma epidermoide de laringe HEP-2 (*ATCC*®*CCL23*[™]) y queratinocitos orales displásicos de la línea celular DOK (*ECACC94122104*), los cuales fueron utilizados como variantes de normalidad para los ensayos de Viabilidad Celular.

Para la conservación de los cultivos celulares se utilizaron Placas Petri 90x20 mm *SPL Life Science*® y una incubadora *in vitro* de *NUAIRE*® programada para mantener la temperatura a 37°C, la presión de CO₂ a 5% y la presión de O₂ a 21%. Su manipulación se realizó principalmente en una Cabina de Bioseguridad Clase II *NUAIRE*® en condiciones estériles bajo flujo laminar. Todos los equipos pertenecen al Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Odontología.

Las líneas celulares CAL-27 y HEP-2 fueron incubadas con Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa suplementado con 1% de Anfotericina B, Solución Penicilina-Estreptomina al 2% y Suero Fetal Bovino al 10% para su mantención. En cambio, para la línea celular DOK se utilizaron los mismos componentes anteriormente mencionados con la adición de Hidrocortisona 5 µg/mL.

2. Métodos

2.1. Preparación de las muestras

Las líneas celulares CAL-27, HEP-2 y DOK fueron incubadas previamente por 24 horas con Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa (1g/L) a 37°C a 5% de CO₂ y 21% de O₂.

2.2. Ensayos de Viabilidad Celular

El principal objetivo de este ensayo es la medición del efecto citotóxico que poseen los fármacos Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina por separado sobre las líneas celulares CAL-27, HEP-2 y DOK en condiciones de baja glucosa (Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa (1g/L)), cuantificando su viabilidad celular.

Para este ensayo se utilizó en todo momento el medio Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa (1g/L). En placas de 96 pocillos [Falcon®] se sembraron 2.000 células/pocillo de CAL-27, 1.000 células/pocillo de HEP-2 y 2.000 células/pocillo de DOK y se dejaron incubando 24 h a una atmosfera de 37°C a 5% de CO₂ y 21% de O₂. Posteriormente, se administraron las dosis decrecientes de los fármacos, los cuales fueron disueltos anteriormente en Dimetilsulfóxido (DMSO) [Sigma®] principalmente un solvente inorgánico utilizado como vehículo. Luego de esto, se incubaron por 24, 48 y 72 h sin agitación. Las concentraciones de los fármacos utilizadas se encuentran especificadas en la tabla 1, las cuales fueron similares a las utilizadas previamente en el laboratorio (Martínez D. 2020, "Evaluación del efecto citotóxico de Itraconazol e Hidroxicloroquina en combinación con cisplatino en cultivos esferoidales de carcinoma de células escamosas oral" [Tesis de pregrado], Universidad de Chile, Facultad de Odontología) con modificaciones menores para una correcta adaptación al modelo de estudio.

Tabla 1. Escala de concentraciones de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina

Cisplatino	1μM - 5μM - 10μM - 16μM - 33μM - 100μM - 250μM - 500μM
Itraconazol	0,1μM - 0,5μM - 10μM - 50μM - 100μM - 200μM - 250μM - 300μM
Hidroxicloroquina	1μM - 5μM - 10μM - 20μM - 100μM - 200μM - 300μM - 400μM

Transcurrido el tiempo, las placas fueron lavadas con PBS con el fin de retirar por completo el tratamiento con los fármacos. Después fueron incubadas nuevamente por 3 h tanto HEP-2 como CAL-27 y 4 h DOK con 100 μL de MTT [*Thermo Fischer Scientific*™] en cada pocillo, con una concentración de 0,5 mg/mL, para la

producción de los cristales de formazán. Finalmente, los cristales de formazán fueron disueltos en 40 μL de DMSO, y posteriormente medidos por un espectrofotómetro de placas a 570 nm de longitud de onda (λ). Estos valores fueron graficados y analizados en el software GraphPad Prism 6, con el cuál se evaluó la potencia farmacológica por medio del análisis de los valores de IC_{50} o la Concentración a la que se observó un 50% de inhibición de la viabilidad celular. Se realizaron tres experimentos independientes ($N=3$) para cada línea celular con tres réplicas a menos que se exponga lo contrario.

3. Western Blot

3.1. Preparación de las muestras

Se trabajó con las líneas celulares CAL-27 y HEP-2 bajo dos condiciones determinadas por los medios de cultivo. Primero se sembraron 5 millones de células en placas Petri de 100 mm [Spl Life Science®], el control con *medio de cultivo modificado de Dulbecco alto en glucosa* y el otro grupo en estudio con *medio de cultivo modificado de Dulbecco bajo en glucosa*, ambos fueron incubados por 24 h a 37°C a 5% de CO_2 y 21% de O_2 .

Posteriormente, se realizó la obtención de estas muestras lavando las placas Petri con PBS 1x para eliminar el medio de cultivo. Se agregó inmediatamente una mezcla de 99 μL de T-per [Thermo Fischer Scientific™] + 1 μL inhibidor de proteasas+fosfatasa sin EDTA 100x Halt™ [Thermo Fischer Scientific™] a cada placa a 0°C, se recolectaron los restos celulares y después se centrifugaron por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Luego se conservó el sobrenadante en donde se encontraban las proteínas a estudiar LC3B-II y VDAC1.

3.2. Método de Bradford

Para comenzar con este método previamente se realizó una curva de calibración con concentraciones crecientes conocidas de Albúmina (BSA), desde la cual se pudieron interpolar las concentraciones de proteína de las muestras a estudiar. Primero se realizó un stock de BSA disuelto en agua destilada de 10 mg/mL el cual

posteriormente fue utilizado para realizar las diluciones seriadas de 8 concentraciones determinadas de BSA. Luego se le agregaron 199 μL de Reactivo de Bradford [*Sigma*®] a 1 μL de cada muestra de concentración conocida y a 1 μL de cada muestra de concentración desconocida. Se dejaron reposar por 10 minutos cubiertos de la luz para después poder medir su absorbancia en un espectrofotómetro de placas a 570 nm. Finalmente, los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en una curva $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ versus absorbancia de la que se extrapola la ecuación final que nos permite conocer las concentraciones de nuestras muestras a estudiar.

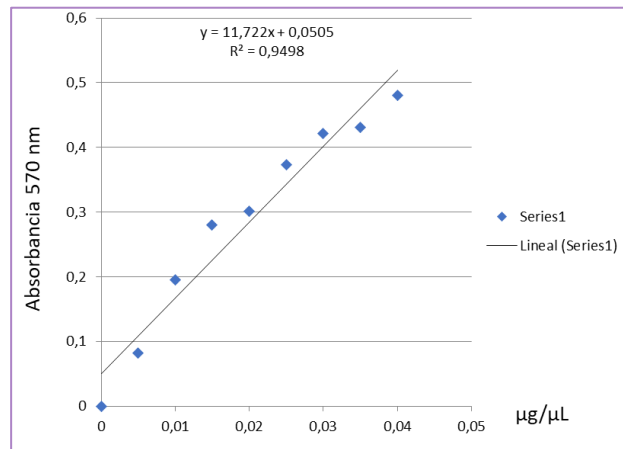


Figura 9. Curva estándar BSA. Se observan las 8 concentraciones en la curva de concentración vs absorbancia. Se reemplazaron en "Y" los valores de absorbancia de cada muestra y se despejaron las incógnitas "X" que corresponden a las concentraciones.

3.3. Electroforesis y Transferencia

Una vez obtenida la concentración de proteínas presente en las muestras se decidió utilizar la cantidad de 50 μg por condición, se les agregó buffer de carga y DTT [*Sigma*®] para posteriormente ser denaturadas a 70°C por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se cargaron en conjunto con el marcador de peso molecular en los geles de Acrilamida al 15% previamente preparados. Una vez todo listo se comenzó la electroforesis en la cual las proteínas se separaron migrando por tamaño a voltaje constante de 120 V.

Una vez finalizada la electroforesis se realizó la transferencia a una membrana de PVDF a amperaje constante de 400 A por 60 minutos.

3.4. Inmunodetección

Posteriormente, la membrana fue bloqueada con BSA al 5% tamponada con solución Tween 20 (TBS-T) al 0,2% por 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con los anticuerpos primarios anti-LC3B-II (concentración 1:4.000) y anti-VDAC1 (1:2.000) por 12 h a 4°C en agitación constante. Después se lavó 3 veces con solución TBS-T al 0,2% por 15 minutos, para finalmente ser incubado por 1 h con el anticuerpo secundario anti-rabbit (concentración 1:4.000). Para terminar, se lavó 3 veces nuevamente la membrana con solución de TBS-T al 0,2% para luego ser leída en el lector de membrana LI-COR. Para este último paso se utilizó el sustrato de Thermo Fischer Scientific™ por 3 minutos para la detección de quimioluminiscencia.

Para obtener el control de carga se utilizó el anticuerpo anti β -actina (concentración 1:10.000), el cual se incubó a temperatura ambiente por 1 h, se lavó posteriormente con solución TBS-T 0,2% para luego volver a ser expuestas al sustrato de Bio-Rad® por 3 minutos y leer la quimioluminiscencia en el lector LI-COR. Para finalizar se cuantificaron y midieron las bandas de densitometría en el programa Image Studio™ y se realizó un análisis estadístico con el software GraphPad Prism® 6 de la comparación entre el control y la muestra expuesta al medio baja glucosa tanto de CAL-27 y HEp-2 para estudiar LC3B-II y VDAC1. En la siguiente Figura 10 se muestra un esquema del proceso completo.

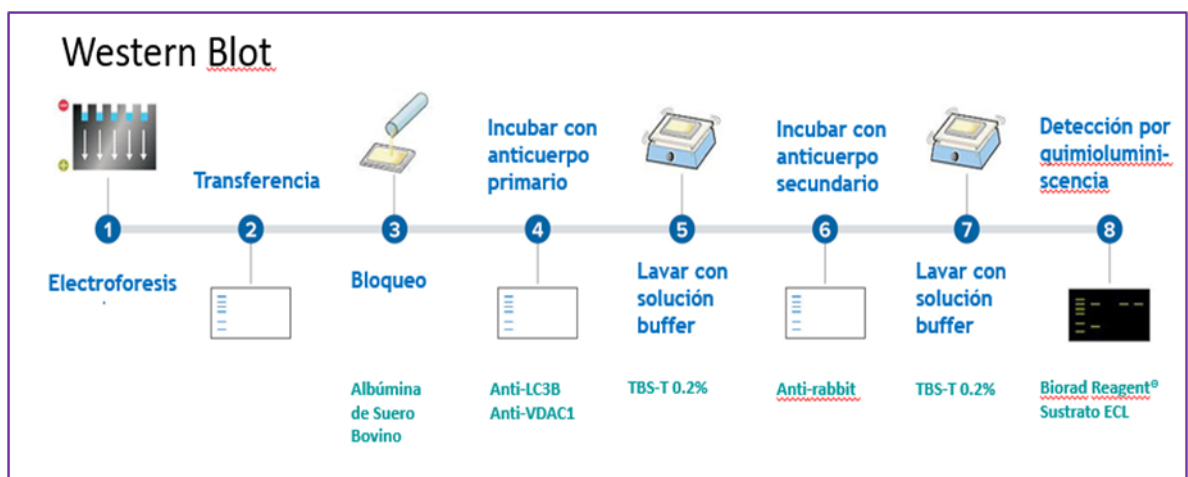


Figura 10. Etapas de la técnica Western Blot Modificado de (Molecular Devices, 2021). Comienza con la electroforesis donde se separan las proteínas, y en seguida esta la transferencia a una membrana de PVDF y el bloqueo de esta membrana con BSA. Posteriormente, se procede a la incubación con el anticuerpo primario por 12 h y después se lava con solución TBS-T al 0,2% para finalmente ser incubado con el anticuerpo secundario y realizar su detección por quimioluminiscencia después de su segundo lavado con TBS-T al 0,2%.

4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio de *t-test* o análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. Asimismo, se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada ensayo a menos que se indique lo contrario. Para todos los experimentos se estableció como nivel de significancia un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el software Graphpad Prism® 6 para todos los análisis estadísticos.

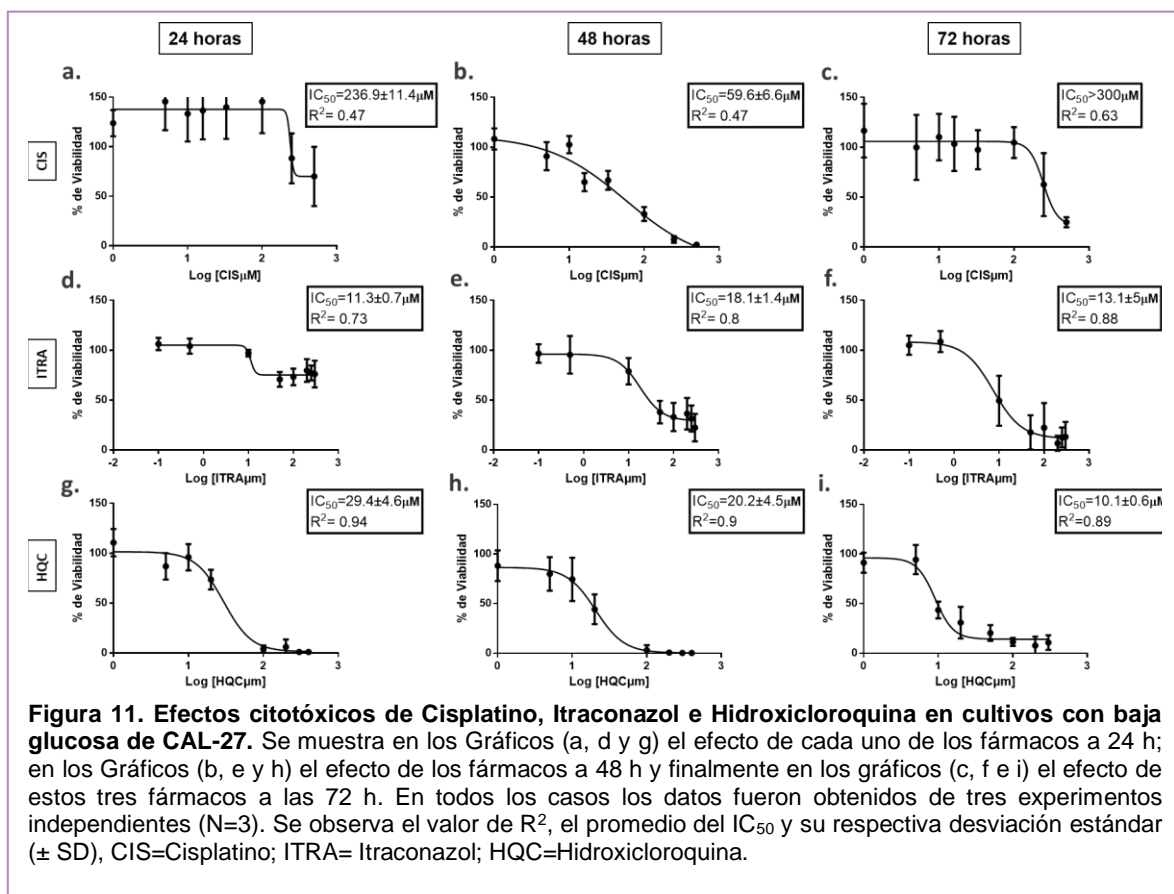
V. RESULTADOS

1. Ensayos de Viabilidad Celular

1.1. Eficacia y Potencia Farmacológica

Por medio de la técnica de MTT se evaluó la eficacia y potencia de los fármacos CIS, ITRA e HQC sobre los cultivos celulares de CAL-27, HEp-2 y DOK expuestos a medio con baja concentración de glucosa (1g/L).

En la figura 11 se observan el promedio de las curvas semilogarítmicas a partir de los cuales se calcularon los valores de IC_{50} a 24, 48 y 72 h de CIS, ITRA e HQC en la línea celular CAL-27.



Se observa en las curvas de CIS que la viabilidad celular disminuye en un 30% a las 24 h (Figura 11a), en cambio a las 48 h se logra el máximo efecto (Figura 11b). Por otro lado, a las 72 h se obtiene una disminución aproximada de un 80% en la viabilidad celular (Figura 11c). En el caso de ITRA, a las 24 h se inhibe casi en un 30% la viabilidad celular (Figura 11d), a las 48 h la inhibición aumenta a 80% hasta llegar a casi a un efecto máximo de inhibición a las 72 h (Figuras 11e y 11f). Respecto a HQC es el único fármaco que logró la inhibición del 100% de la viabilidad celular a sus tres tiempos de exposición (Figuras 11g, 11h e 11i).

En la tabla 2 se encuentran resumidos todos los valores de IC₅₀ obtenidos en los tres fármacos para la línea celular CAL-27 a las 24, 48 y 72 h.

Tabla 2. IC₅₀ a las 24, 48 y 72 horas en la línea celular CAL-27. Promedio de IC₅₀ de cada fármaco y su desviación estándar. Datos obtenidos de tres experimentos independientes (N=3).

CAL-27						
	24 horas IC ₅₀ ± SD (μM)		48 horas IC ₅₀ ± SD (μM)		72 horas IC ₅₀ ± SD (μM)	
CIS	236,9	±11,45	59,6	±6,64	>300	
ITRA	11,3	±0,78	18,1	±1,44	13,1	±5,09
HQC	29,4	±4,69	20,2	±4,54	10,1	±0,69

De acuerdo con los datos presentados, el fármaco con menor valor de IC₅₀ que logró un máximo efecto en la disminución de la viabilidad en CAL-27 es HQC a las 72 h con un valor de 10,1 μM, seguido por ITRA a las 72 h con 13,1 μM.

Se realizó posteriormente el test de ANOVA para evaluar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los distintos valores de IC₅₀ (24, 48 y 72 horas). En la siguiente figura 12 se observa el resultado de este análisis, en los cuales se logra dilucidar que los valores de 24 - 48 h con el fármaco ITRA tienen una variación estadísticamente significativa, pero debido a un valor mayor de IC₅₀ a 48h; en el caso de HQC también existen variaciones mucho más marcadas, de acuerdo con lo esperado, que se caracterizan principalmente con la disminución de los valores de IC₅₀ a medida que aumenta el tiempo de exposición. Al contrario, con el fármaco CIS no se observaron variaciones significativas estadísticamente, respecto al tiempo de incubación, donde se destacan los valores elevados de IC₅₀.

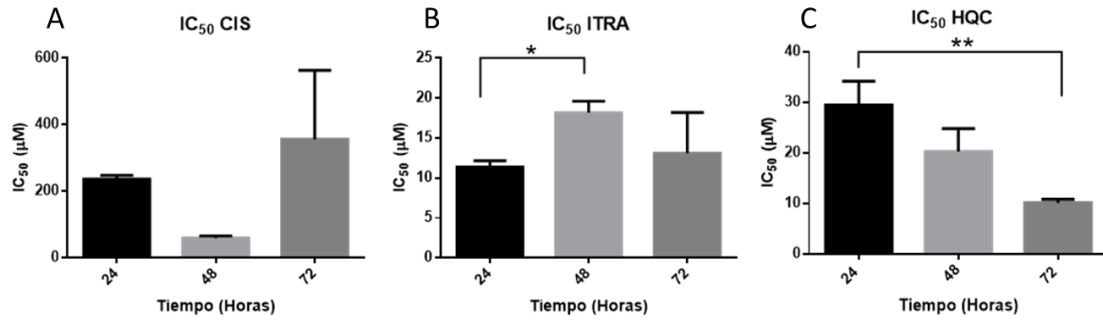


Figura 12. Comparación entre los distintos valores de IC₅₀ en CAL-27 a los distintos tiempos (24, 48 y 72 horas), de Cisplatino (A), Itraconazol (B) e Hidroxicloroquina (C). *P < 0,05 **P < 0,001 *P < 0,0001.**

En la figura 13 se observan el promedio de las curvas semilogarítmicas a partir de los cuales se calcularon los valores de IC₅₀ a 24, 48 y 72 horas de CIS, ITRA e HQC en la línea celular HEP-2.

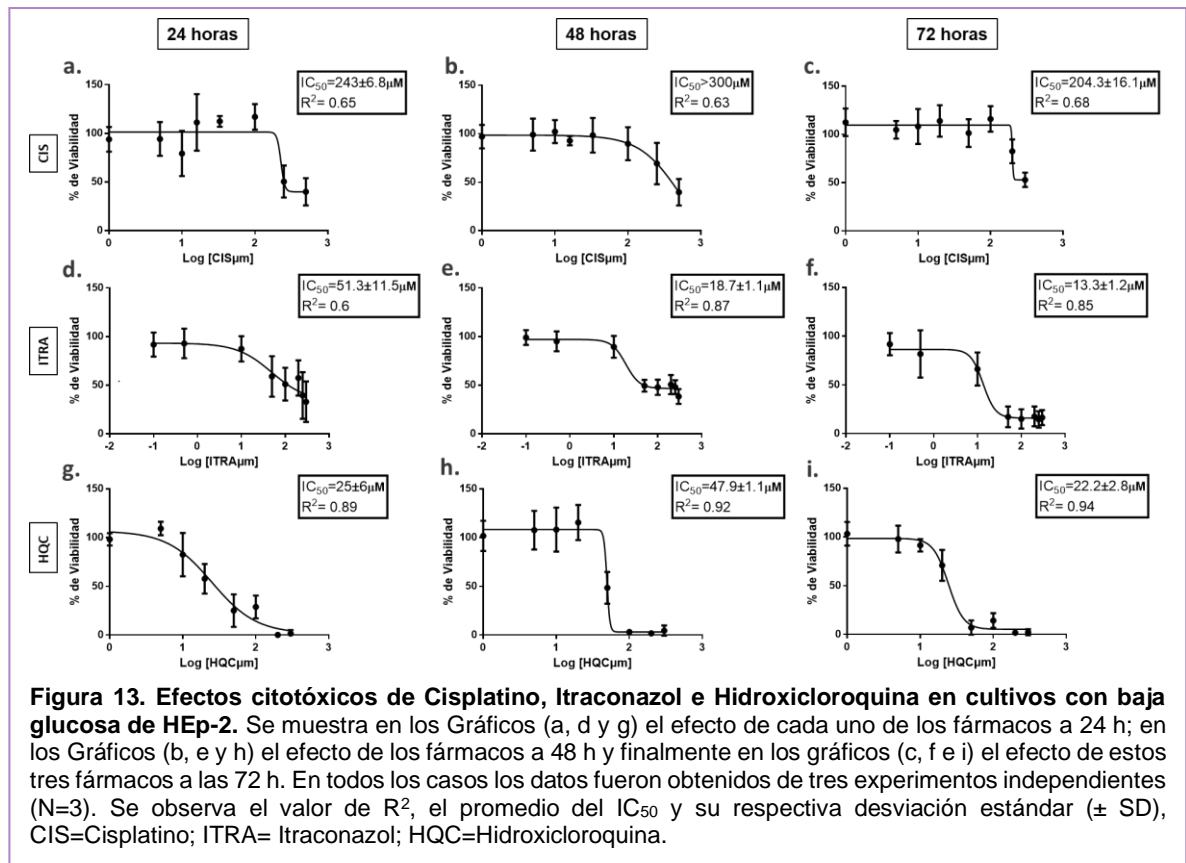


Figura 13. Efectos citotóxicos de Cisplatino, Itraconazol e Hidroxicloroquina en cultivos con baja glucosa de HEP-2. Se muestra en los Gráficos (a, d y g) el efecto de cada uno de los fármacos a 24 h; en los Gráficos (b, e y h) el efecto de los fármacos a 48 h y finalmente en los gráficos (c, f e i) el efecto de estos tres fármacos a las 72 h. En todos los casos los datos fueron obtenidos de tres experimentos independientes (N=3). Se observa el valor de R², el promedio del IC₅₀ y su respectiva desviación estándar (± SD), CIS=Cisplatino; ITRA= Itraconazol; HQC=Hidroxicloroquina.

En las curvas de CIS (Figuras 13a, 13b y 13c) se observa una respuesta similar a la obtenida en CAL-27, con la diferencia que el efecto logra disminuir únicamente en un 60% la viabilidad celular, manteniéndose sin variaciones a los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 h). Tanto las curvas de ITRA (Figuras 13d, 13e y 13f) como las de HQC (Figuras 13g, 13h y 13i) se comportaron de manera similar a las obtenidas en CAL-27, destacando nuevamente el efecto citotóxico de HCQ que alcanza un 100% de inhibición de la viabilidad celular en todos los tiempos.

En la tabla 3 se encuentran resumidos todos los datos obtenidos para la línea celular HEP-2.

Tabla 3. IC₅₀ a las 24 horas, 48 horas y 72 horas en la línea celular HEP-2. Promedio de IC₅₀ de cada fármaco y su desviación estándar. Datos obtenidos de tres experimentos independientes (N=3).

HEP-2						
	24 horas IC ₅₀ ± SD (µM)		48 horas IC ₅₀ ± SD (µM)		72 horas IC ₅₀ ± SD (µM)	
CIS	243	±6,85	>300		204,3	±16,17
ITRA	51.3	±11,54	18,7	±1,18	13,3	±1,21
HQC	25	±6,03	47,9	±1,19	22,2	±2,85

Basado en los datos obtenidos, ITRA es el fármaco que consiguió el menor IC₅₀ (o mayor potencia) logrando un máximo efecto (eficacia) a los 72 h con un valor de 13,3 µM. Además, HQC posee un valor de IC₅₀ de 22,2 µM a las 72 h.

Al igual que en el resultado anterior se realizó el test de ANOVA para evaluar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los distintos valores de IC₅₀ obtenidos a los distintos tiempos (24, 48 y 72 horas). En la siguiente figura (Figura 14) se observa el resultado de este análisis. CIS posee una variación significativa entre los valores de IC₅₀ a 48 h - 72 h, pero solo debido a un valor alto a las 48h; mientras que ITRA entre los valores de 24 - 48 h como entre los valores 24- 72 h. Por último, en HQC se observó una variación significativa entre 24 h - 48 h, así como entre 48 y 72 h, nuevamente debido a un valor muy alto de IC₅₀ a las 48 horas.

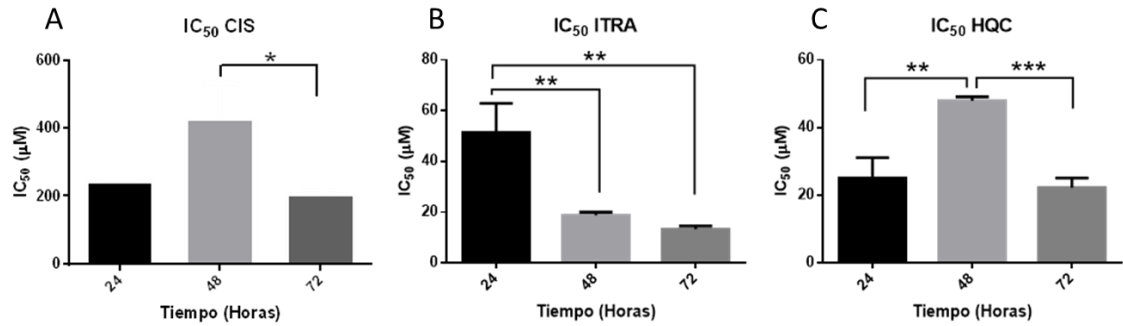
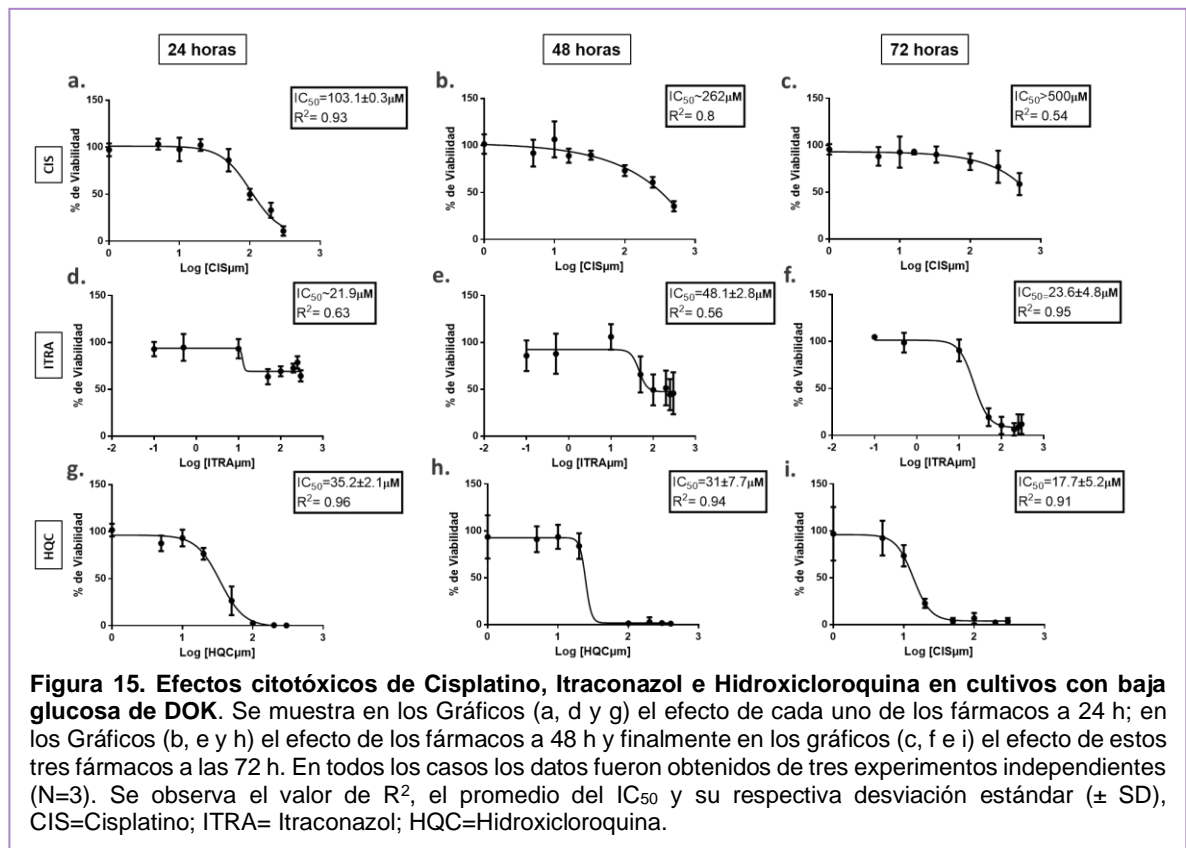


Figura 14. Comparación entre los distintos valores de IC₅₀ en HEP-2 a los distintos tiempos (24,48,72 horas), de Cisplatino (A), Itraconazol (B) e Hidroxicloroquina (C). *P < 0,05 **P < 0,001 ***P < 0,0001.

Por último, en la figura 15 se observan el promedio de las curvas semilogarítmicas a partir de los cuales se determinaron los valores de IC₅₀ a 24, 48 y 72 h de los distintos fármacos en la línea celular DOK.



En relación a la curva de CIS en DOK se observó que a las 24 h hubo una disminución de casi un 100% de la viabilidad celular (Figura 15a), sin embargo, con el paso del tiempo fue menor, alcanzando la inhibición de solo un 80% de la viabilidad celular a las 48 h (Figura 15b). Finalmente, a las 72 h se observa la inhibición de menos del 50% de la viabilidad celular (Figura 15c). En las curvas de ITRA e HQC se observa un comportamiento similar a los obtenidos en las líneas celulares CAL-27 y HEP-2. ITRA no logra un máximo efecto a las 24 h (Figura 15d), aunque a medida que transcurre el tiempo va descendiendo la curva, aumentando la inhibición en la viabilidad celular (Figuras 15e y 15f). A diferencia de este último, HQC nuevamente ejerció un efecto máximo en los tres tiempos evaluados (Figuras 15g, 15h y 15i).

En la siguiente tabla se encuentran resumidos todos los datos obtenidos para la línea celular DOK.

Tabla 4. IC₅₀ a las 24 horas, 48 horas y 72 horas en la línea celular DOK. Promedio de IC₅₀ de cada fármaco y su desviación estándar. Datos obtenidos de dos experimentos independientes (N=2) con el fármaco Cisplatino y tres experimentos independientes con Itraconazol e Hidroxicloroquina (N=3).

DOK						
	24 horas IC ₅₀ ± SD (µM)		48 horas IC ₅₀ ± SD (µM)		72 horas IC ₅₀ ± SD (µM)	
CIS	103,1	±0,35	~262,3		>500	
ITRA	21,9	±0,02	48,1	±2,41	23,6	±4,84
HQC	35,2	±2,17	31	±7,77	17,7	±5,23

En el caso de DOK, HQC e ITRA consiguieron los IC₅₀ más bajos (17.7 µM y 23,6 µM) con un máximo efecto a las 72 h.

En este caso se realizó el test ANOVA únicamente para ITRA e HQC, a diferencia de CIS que en el cual se realizó un t-test. Esto debido a un alto y ambiguo resultado en su IC₅₀ a las 72 horas, por lo que no fue posible realizar la comparación con este valor. Sin embargo, la divergencia entre los valores de IC₅₀ de 24 – 48 h no es estadísticamente significativa. La diferencia entre los valores de 24 h – 48 h y 48 h – 72 h resultó estadísticamente significativa en ITRA, así como la diferencia de valores a 24 h -72 h con HQC.

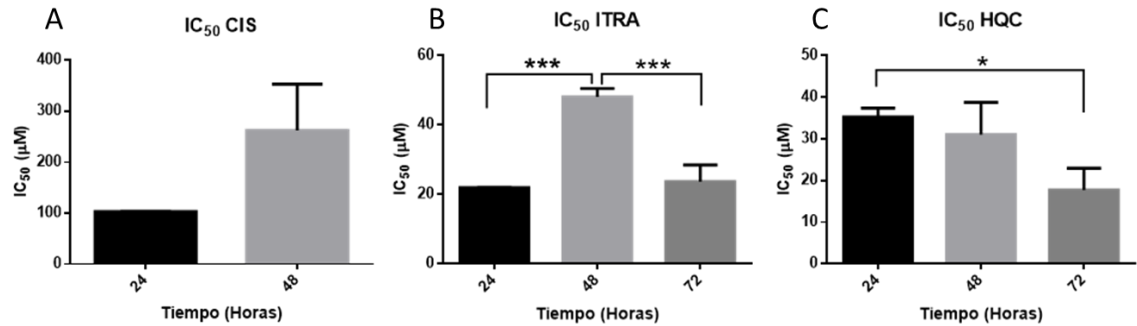


Figura 16. Comparación entre los distintos valores de IC₅₀ en DOK a los distintos tiempos (24 y 48 horas) de Cisplatino (A) y (24, 48 y 72 horas) Itraconazol (B) e Hidroxicloroquina (C). *P < 0,05 ***P < 0,001 ****P < 0,0001.

1.2. Selectividad Farmacológica

A continuación, se realizó un análisis comparativo entre los valores de IC₅₀ obtenidos en los ensayos de MTT entre las líneas celulares tumorales (CAL-27 y HEp-2) y la línea displásica oral DOK, con la finalidad de evaluar la selectividad farmacológica de CIS, ITRA e HQC y su comportamiento en una línea celular no tumoral. Posteriormente, se realizó un test de ANOVA entre estos valores para constatar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre estos.

Se muestra en la tabla 5 que los valores de CIS en DOK son menores a las 24 h con respecto a los valores de CAL-27 y HEp-2. Además, a las 48h presenta un valor mayor que CAL-27, pero menor que HEp-2; Sin embargo, a las 72 h los valores de DOK se elevan sobrepasando los 500 μM. En el análisis estadístico (Figura 17), el test de ANOVA nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas a las 24 h. No obstante, a las 48 h se logra identificar una diferencia estadísticamente significativa entre

Tabla 5. IC₅₀ de Cisplatino en CAL-27, HEp-2 y DOK. Tabla comparativa de los valores de IC₅₀ a 24, 48 y 72 h.

	CIS		
	CAL-27	HEp-2	DOK
24h	236,9	243	103,1
48h	59,6	>300	~262,3
72h	>300	204,3	>500

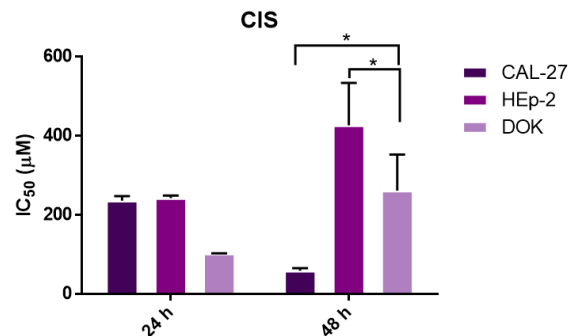


Figura 17. Comparaciones de los valores de IC₅₀ de CIS entre las líneas tumorales (CAL-27, HEp-2) y DOK. Análisis estadístico ANOVA de la diferencia entre los valores de IC₅₀ a las 24, 48 y 72 h. *P < 0,05 **P < 0,001 ***P < 0,0001.

CAL-27-DOK y HEp-2- DOK, esto debido a que se obtuvo un valor más alto a las 48 h en HEp-2, y un valor menor en CAL-27. A las 72 h no fue posible realizar una comparación de valores de IC₅₀, ya que la respuesta de DOK al tratamiento con CIS no proporcionó un valor definido. En resumen, no existe una tendencia a una diferencia estadísticamente significativa entre estas tres líneas celulares (CAL-27, HEp-2 y DOK) con CIS.

En el caso de ITRA (Tabla 6), los valores de IC₅₀ para DOK muestran ser más altos que los de CAL-27 y que los de HEp-2 en los tiempos evaluados. A excepción del IC₅₀ de las 24 h, en donde HEp-2 presenta un valor más alto que DOK. De acuerdo con el análisis estadístico (Figura 18), a las 24 h existe una diferencia significativa estadísticamente entre CAL-27- DOK y HEp-2- DOK, debido a que el valor de HEp-2 es más elevado y el valor de CAL-27 es menor con respecto a DOK. Sin embargo, también existe una diferencia significativamente estadística a las 48 y a las 72 h que es de manera similar tanto en CAL-27-DOK como entre HEp-2-DOK.

Tabla 6. IC₅₀ de Itraconazol en CAL-27, HEp-2 y DOK. Tabla comparativa de los valores de IC₅₀ a 24, 48 y 72 h.

ITRA			
	CAL-27	HEp-2	DOK
24h	11,3	51,3	21,9
48h	18,1	18,7	48,1
72h	13,1	13,3	31

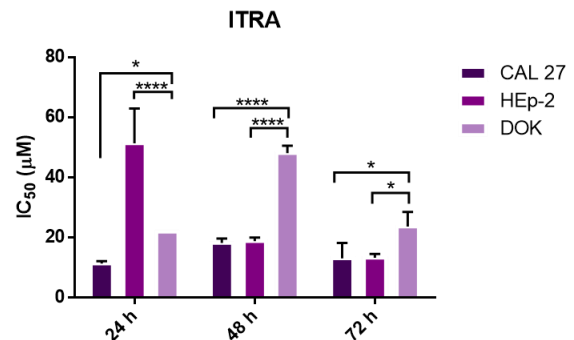


Figura 18. Comparaciones de los valores de IC₅₀ de ITRA entre las líneas tumorales (CAL-27, HEp-2) y DOK. Análisis estadístico ANOVA de la diferencia entre los valores de IC₅₀ a las 24, 48 y 72 h. *P< 0,05 **P<0,001 ***P<0,0001.

Tabla 7. IC₅₀ de Hidroxicloroquina en CAL-27, HEp-2 y DOK. Tabla comparativa de los valores de IC₅₀ a 24, 48 y 72 h.

HQC			
	CAL-27	HEp-2	DOK
24h	29,4	25	35,2
48h	20,2	47,9	23,6
72h	10,1	22,2	17,7

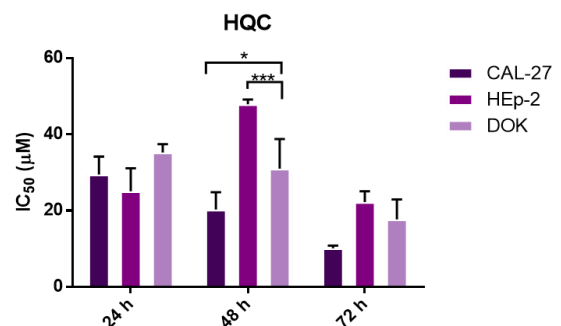


Figura 19. Comparaciones de los valores de IC₅₀ de HQC entre las líneas tumorales (CAL-27, HEp-2) y DOK. Análisis estadístico ANOVA de la diferencia entre los valores de IC₅₀ a las 24, 48 y 72 h. *P< 0,05 **P<0,001 ***P<0,0001.

Por último, los valores de IC_{50} de HQC (tabla 7) en DOK son mayores a las 24 h que los valores de CAL-27 y HEp-2. Sin embargo, con el transcurso del tiempo (48 y 72 h), los valores de DOK se encuentran entre los obtenidos por estas dos líneas celulares (CAL-27 y HEp-2). Al observar el análisis estadístico (Figura 19), se constata solo diferencias estadísticas significativas a las 48 h, debido a que en CAL-27 se obtuvo un valor de IC_{50} menor que el de DOK, al contrario de HEp-2 que obtuvo un valor superior. Estos resultados no poseen una tendencia clara, sin diferencias estadísticamente significativas entre los valores de estas tres líneas celulares (CAL-27, HEp-2 y DOK).

2. Evaluación de los niveles de expresión de las proteínas LC3B-II y VDAC1.

Para evaluar los niveles de expresión de estas proteínas, las líneas celulares CAL-27 y HEp-2 fueron expuestas por 24 h a distintos medios, a un medio alto en glucosa, correspondiente al control, y a un medio bajo en glucosa. Esto se realizó con la finalidad de caracterizarlas y observar el efecto de este estímulo en la expresión de sus proteínas (LC3B-II y VDAC1). Se realizó para su detección y cuantificación el método de Western blot.

En la subsiguiente figura (Figura 20) se muestran los resultados de los niveles proteicos de LC3B-II y VDAC1 bajo la condición de alta/baja glucosa (4,5 g/L / 1 g/L) en las líneas celulares CAL-27 (Figuras 20A y 20C) y HEp-2 (Figuras 20B y 20D). Posteriormente a esto, se realizó un t-test con el objetivo de verificar si la diferencia entre la cuantificación proteica en ambos estímulos alta/baja glucosa era estadísticamente significativa. De este análisis se obtuvo como resultado un aumento significativo tanto para LC3B-II en línea celular CAL-27 y HEp-2 (Figuras 20A y 20B), como para VDAC1 en CAL-27 y HEp-2 (Figuras 20C y 20D), siendo en LC3B-II más notoria la diferencia llegando aproximadamente al doble de su expresión con respecto al control.

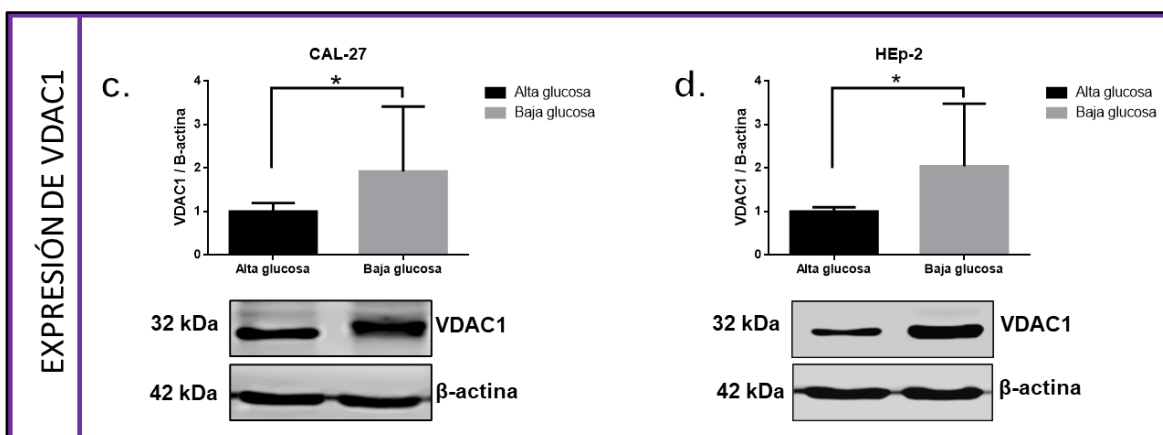
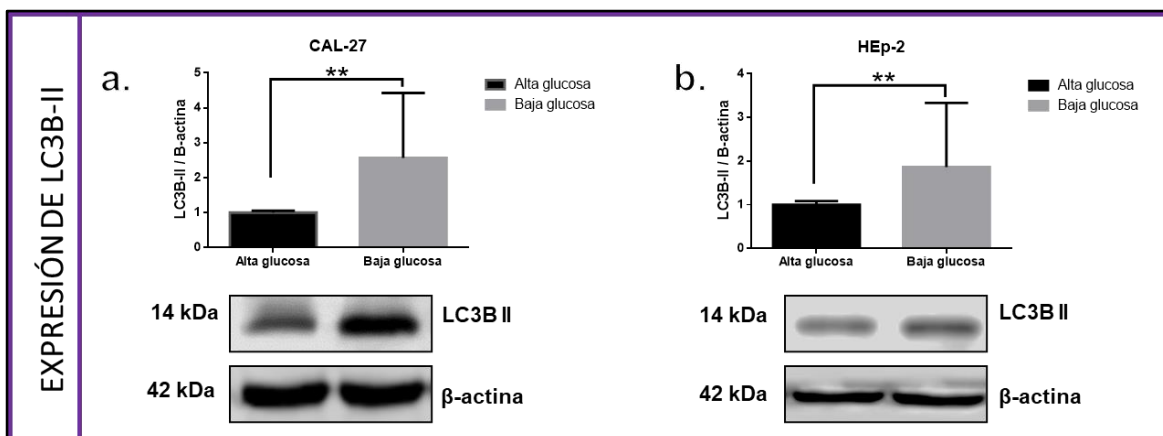


Figura 20. Niveles proteicos de LC3B-II y VDAC1 en líneas celulares de CAL-27 y HEp-2 expuestas a medio con Alta y Baja Glucosa por 24 horas. Se observa en el gráfico (a y b) la expresión de LC3B-II (a) en línea celular CAL-27 y (b) en línea celular HEp-2. En gráfico (c y d) la expresión de VDAC1 (c) en línea celular CAL-27 y (d) en línea celular HEp-2. *En la parte inferior se muestran las bandas de densitometría cuantificada. Cada gráfico representa la suma de tres experimentos individuales (N=3). *P< 0,05 **P<0,001 ***P<0,0001*

VI. DISCUSIÓN

1. Ensayos de viabilidad

1.1. Eficacia y Potencia farmacológica

En este estudio *in vitro* se evaluó el impacto que posee la baja concentración de glucosa en la viabilidad celular de distintas líneas celulares tumorales (CAL-27 y HEp-2) y displásica (DOK) de cabeza y cuello en el paso del tiempo (24, 48, 72 h) mientras se encuentran expuestas bajo el efecto de Cisplatino (CIS), un quimioterapéutico clásico de uso frecuente, y otros fármacos con diferentes fines clínicos que se les ha estudiado un potencial efecto antitumoral, como es el caso de Itraconazol (ITRA), antifúngico de amplio espectro e Hidroxicloroquina (HQC), un antimalárico de uso común en enfermedades reumáticas.

La eficacia farmacológica corresponde a la respuesta o efecto máximo que se puede lograr con un fármaco. El efecto del fármaco se presenta frente a la dosis en un gráfico para obtener la curva dosis-respuesta. El punto más alto de la curva muestra la respuesta máxima o eficacia y se denomina E_{max} (Visser, 2018). En este caso se observa el punto más bajo de la curva ya que se está evaluando un efecto inhibitorio de la viabilidad celular.

Al analizar la eficacia en los gráficos obtenidos de los ensayos MTT se observa que CIS en CAL-27 no posee un efecto dependiente del tiempo, aunque sí presenta un efecto dependiente de la concentración. Por lo que se puede inferir que este fármaco es poco eficaz, ya que si bien su respuesta a las 48 h en CAL-27 logró una máxima eficacia (E_{max}), este disminuye su efecto a las 72 h. Con respecto a la curva obtenida, este fármaco lamentablemente no logró adaptarse al modelo, obteniendo valores altamente dispersos (R^2 entre 0,47- 0,63). Esto se puede deber a que se encuentra descrito en varios estudios que la línea celular CAL-27 posee una resistencia al tratamiento con CIS. Estudios previos describen que células tumorales ováricas resistentes a cisplatino se sensibilizarían con el efecto de la baja glucosa, esto debido a que son células altamente glucolíticas que requieren altos niveles de

oxígeno (Catanzaro y cols., 2015). Sin embargo, se debe tener en cuenta que todos los tipos de cáncer se comportan de distinta manera frente a estímulos estresores y terapias farmacológicas. Para HEP-2 el efecto de CIS es dependiente de la concentración más no del tiempo. No logra un efecto máximo, por este motivo no es un fármaco eficaz, tampoco para HEP-2. En definitiva, este fármaco es poco eficaz y va perdiendo eficacia a medida que transcurre el tiempo.

En el caso de ITRA, tanto en la línea celular CAL-27 como en HEP-2 se produjo una disminución en la viabilidad celular dependiente de la concentración, y además se constata que su efecto va aumentando a medida que transcurre el tiempo. En consecuencia, ITRA es un fármaco que va aumentando su eficacia en el tiempo, logrando su E_{max} a las 72 h. En cambio, en el caso de HQC se logra dilucidar en las dos líneas celulares (CAL-27 y HEP-2) un efecto citotóxico dependiente de la concentración, sin embargo, esta logra la disminución total de la viabilidad celular a los tres tiempos evaluados (24h, 4h y 72 h), por lo que su eficacia no es dependiente del tiempo, logrando ser el fármaco más eficaz de los tres.

Para la medición del potencial terapéutico de un agente farmacológico, la medida *in vitro* de potencia más utilizada es el IC_{50} o concentración inhibitoria semi-máxima, esta corresponde a la concentración a la que un fármaco es capaz de inhibir a la mitad una actividad biológica o farmacológica (Aykul y Martinez-Hackert, 2016).

Respecto a los valores de IC_{50} de CIS a las 24 h en CAL-27 y HEP-2 se obtuvieron los valores 236,9 μM y 243 μM , respectivamente. A las 48 h solo se pudo obtener un valor exacto para CAL-27 de 59,6 μM , ya que para HEP-2 sus valores resultaron indeterminados ($>300 \mu M$). Respecto a los IC_{50} obtenidos a las 72 h, únicamente HEP-2 tiene un valor exacto de 204,3 μM . En definitiva, los valores de IC_{50} para este fármaco resultaron altos para estas dos líneas celulares tumorales, esto era esperable en la línea celular CAL-27, pues presenta una resistencia a esta terapia, sin embargo, se ha evaluado previamente el efecto de CIS en cultivos en medio alto en glucosa, obteniendo valores de IC_{50} en la línea CAL-27 de 182,9 μM y 122,3 μM (48 y 72 horas, respectivamente) y de 210,3 μM y 218,6 μM para HEP-2 (48 y 72 horas, respectivamente) (datos no publicados del Laboratorio de Farmacología de

la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, LFFOUCH). La información anterior nos indica que los valores de IC_{50} de CIS aumentaron en cultivos con baja disponibilidad de glucosa de estas dos líneas tumorales. Por lo que se podría inferir un aumento en la resistencia frente a este quimioterapéutico, ya que se necesita mayor cantidad de fármaco para provocar el mismo efecto.

Generalmente las dosis utilizadas en clínica van desde los 50-100 mg/m² en adultos por ciclo de quimioterapia. Es administrado por vía parenteral cada 3-4 semanas, a menudo junto a otros agentes antineoplásicos (Tsang y cols., 2009). La administración de una infusión corta (1 h) de 40 mg/m² alcanza una concentración plasmática máxima de 5,37 µg/mL, y la administración de una infusión larga (3 h) de 100 mg/m² alcanza una concentración plasmática de 9,02 µg/mL (Rajkumar y cols., 2016). Los valores obtenidos en este estudio para CIS fueron >200µM en las tres líneas celulares, esto quiere decir que los valores son >60,2 µg/mL. Por lo que estas concentraciones no son aplicables en un esquema terapéutico clínico seguro, podría provocar efectos nocivos no deseados. En este último tiempo se han evaluado terapias de combinación con CIS en distintas líneas celulares, con el fin de provocar una mayor quimiosensibilidad de éste. En un estudio del año 2018 en cáncer de pulmón, las combinaciones con distintos fármacos redujeron las dosis de uso de CIS, aumentando su potencia citotóxica y disminuyendo sus efectos secundarios (Duan y cols., 2018).

Los valores de IC_{50} obtenidos para ITRA en la línea celular CAL-27 expuesta a un medio bajo en glucosa fueron de 11,3µM a 24 h, 18,1 µM a 48 h y 13,1 µM a 72 h. Para la línea HEP-2 los valores de IC_{50} fueron similares, aunque levemente superiores respecto a la línea celular anterior. Hasta la fecha se ha encontrado en la literatura un solo estudio publicado donde se evaluó el valor de IC_{50} en CAL-27 en medio de alta glucosa. En este último no se pudo determinar un valor específico de IC_{50} a ninguno de los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 h), sin embargo, se logró concluir que sus valores eran mayores que 50 µg/mL (70,8 µM aproximadamente) (Dias y cols., 2020). Basándonos en este estudio, los niveles de IC_{50} de ITRA son menores al estar CAL-27 expuesta a el medio estresor bajo en

glucosa, por lo que se puede inferir que la citotoxicidad aumenta en estas condiciones. Esto es beneficioso ya que las dosis necesarias para alcanzar un mismo efecto son más bajas al estar en medio bajo glucosa.

Las dosis clínicas que se utilizan de este fármaco varían según su indicación, generalmente se utilizan dentro de un rango de 100-600 mg diarios. Una sola dosis de 200 mg de ITRA produce una concentración plasmática máxima de 239 ng/mL (0,34 μ M). Por lo general se administran clínicamente cápsulas de 200 mg cada 12 h. Después de 14 días con este régimen, la concentración plasmática máxima es de 1881 ng/mL (2,67 μ M) (Pantziarka y cols., 2015). En consecuencia, en este último estudio se demuestra que ITRA podría no ser una opción segura para un esquema terapéutico de monoterapia. Puesto que los valores de IC₅₀ conseguidos en este estudio para ITRA a las 72 h resultan muy lejanos de la máxima concentración plasmática admitida en clínica. A pesar de esto, este es solamente un estudio que evalúa en condiciones determinadas este fármaco, no es posible descartar su uso a futuro, ya que aún se necesita realizar mayor cantidad de estudios para analizar su potencial efecto citotóxico, así como su posible aplicación en un esquema terapéutico.

En cuanto a los valores de IC₅₀ de HQC para CAL-27 se obtuvieron los siguientes resultados; 29,4 μ M a 24 h, 20,2 μ M a 48 h y por último 10,1 μ M a 72 h. Para la línea celular HEp-2 los valores que se extrapolaron fueron de 25 μ M a 24 h, 47,9 μ M a 48 h y 22,2 μ M a 72 h. Datos obtenidos en el LFFOUCH establecen que el valor de IC₅₀ en cultivos *in vitro* con medio alto en glucosa (4,5 g/L) de estas líneas celulares son 40,1 μ M y 100,6 μ M a las 48 h, 31,7 μ M y 92,82 μ M a las 72 h, respectivamente (datos no publicados). Como es posible evidenciar, tanto los valores para CAL-27 como para HEp-2 en medio bajo glucosa son menores que al estar en un medio alto en glucosa, por lo que se puede inferir que, a pesar de estar bajo un medio que favorece el desarrollo de un mecanismo de resistencia como autofagia (Williams y cols., 2009; Kim y cols., 2011; Esteve y Knecht, 2011; Moruno y cols., 2012), igualmente aumenta el efecto citotóxico de este fármaco. Esto era esperable, ya que este fármaco actúa como un potente inhibidor del proceso de

autofagia, dejando a la célula sin una vía de escape contra el estrés metabólico, desencadenándose la apoptosis celular.

Para el tratamiento de lupus eritematoso con HQC las dosis que generalmente se utilizan van desde 200-400 mg al día. Con 200 mg administrados cada 12 h los niveles terapéuticos medidos en la sangre son entre 500-2000 ng/mL (0,5 a 2 $\mu\text{g/mL}$) (Durcan y cols., 2015). El uso de este antimalárico ya se ha expandido a la oncología en estos últimos años, administrándose dosis mucho más altas generalmente 800-2000 mg diarios (correspondientes a 4-10 $\mu\text{g/mL}$) por cortos periodos de tiempo (Abdulaziza y cols., 2018). Si tomamos en cuenta que los valores de IC_{50} de CAL-27, HEp-2 y DOK a las 24 h corresponden respectivamente a 4,4 $\mu\text{g/mL}$, 3,8 $\mu\text{g/mL}$ y 5,4 $\mu\text{g/mL}$, por lo que se encuentran dentro del rango de concentraciones seguras para ser aplicadas clínicamente en un esquema terapéutico. En consecuencia, este fármaco puede ser aplicado posteriormente en un estudio *in vivo* para evaluar su efecto sin correr riesgos adversos.

1.2. Selectividad Farmacológica

La selectividad farmacológica describe la capacidad de un fármaco para afectar preferentemente a una población particular, un gen, una proteína, vía de señalización o célula, por sobre otras. De esta forma un fármaco selectivo discrimina entre ambas y lograría ejercer su efecto o producir un evento en una de éstas (Mencher y Wang, 2005). En este estudio se evaluó la capacidad de producir la muerte celular en líneas tumorales de manera selectiva.

Para este objetivo se evaluó la presencia de una respuesta citotóxica y se contrastaron los valores de IC_{50} obtenidos en los tres fármacos en la línea celular de queratinocitos displásicos DOK con respecto a las líneas tumorales CAL-27 y HEp-2. Posteriormente, se analizaron estadísticamente las diferencias entre los valores de IC_{50} obtenidos con los tres fármacos.

A grandes rasgos, la línea DOK obtuvo una respuesta bastante similar a las de las líneas tumorales con los tres fármacos (CIS, ITRA e HQC). Con CIS se observaron

valores de IC_{50} altos, con muy poca eficacia en las tres líneas celulares. El análisis estadístico de los valores no arrojó diferencias significativas, en razón de lo cual este fármaco resulta poco selectivo. En cuanto a el fármaco ITRA, se observa que el efecto citotóxico es dependiente del tiempo, obteniéndose un IC_{50} de $23,6 \mu M$ a las 72 h, valor mayor que las células tumorales CAL27 y HEP-2, aunque con una disminución de casi un 100% en su viabilidad celular. En consecuencia, ITRA tampoco logra ser un fármaco muy selectivo para las células tumorales, no obstante, existe una diferencia estadísticamente significativa en sus valores, con un patrón que se repite tanto a las 48 como a las 72 h, donde se obtuvieron valores mayores en DOK que en CAL-27 y HEP-2, por lo que nos hace pensar que existe una leve predilección por las células tumorales. Sin embargo, aún es necesaria una mayor recopilación de datos para poder afirmar la existencia de una selectividad. Por último, HQC es un fármaco que a primera vista posee un gran efecto citotóxico a partir de las primeras 24 h, con un IC_{50} de $35,2 \mu M$, al igual que ITRA con un valor levemente superior a las células tumorales CAL-27 y HEP-2 ($29,4 \mu M$ y $25 \mu M$), pero con una disminución del 100% de viabilidad celular. Según el análisis estadístico, los valores de IC_{50} no arrojaron diferencias significativas, convirtiendo a HQC en el fármaco con menor selectividad de los tres.

En resumen, ninguno de estos tres fármacos (CIS, ITRA e HQC) son selectivos o poseen una afinidad por las células tumorales *in vitro*, en las condiciones evaluadas durante este trabajo. Es importante destacar que ésta es una característica que un fármaco debe cumplir en una terapia farmacológica antitumoral, especialmente para no causar un efecto nocivo en células no tumorales que se encuentren aledañas a los tumores sólidos en otros tejidos. No obstante, se debe tomar en cuenta el tipo de línea celular que son las DOK, ya que éstas no corresponden a células sanas del tejido a estudiar, sino que son variantes de la normalidad con un tipo de alteración en su morfología constatable de forma histológica (Jerjes y cols., 2011). Pese a todo, atacar selectivamente a estas células puede resultar beneficioso, ya que las células displásicas pueden malignizarse a futuro provocando la formación de tumores sólidos, siendo consideradas por algunos autores como una etapa pre-tumoral (Ho y cols., 2012). Estos fármacos podrían ser considerados como una

opción terapéutica preventiva sistémica, evitando la formación futura de un carcinoma *in situ* atacando a estas células displásicas que no siempre se logran extirpar completamente de una lesión. Sin embargo, para que eso ocurra es importante seguir con más estudios y continuar probando estos fármacos en líneas celulares de queratinocitos orales de tejido sano o en otras líneas celulares como hepatocitos o células cardíacas para comprobar una verdadera selectividad.

2. Evaluación de expresión de LC3B-II y VDAC1

En esta oportunidad se evaluaron los niveles de LC3B-II (16 kDa), una proteína microtubular que participa en el proceso de autofagia, localizada en la membrana externa e interna del autofagosoma, considerada el biomarcador más específico de la cantidad de autofosomas y de la actividad autofágica (Zhao y cols., 2013; Zheng y cols., 2012), reportándose en este último tiempo altos niveles de expresión en diferentes tipos de cáncer incluidos el de pulmón, colorrectal, digestivos y de mamas (Lefort y cols., 2014). Esto también se ha visto relacionado con un comportamiento más agresivo de los tumores sólidos aumentando la infección en linfonodos y metástasis en otros órganos (Giatromanolaki y cols., 2014).

En relación con los valores proteicos obtenidos de LC3B-II, se obtuvo un aumento en los niveles tanto en línea celular CAL-27 como en HEP-2 de aproximadamente el doble de su expresión en comparación con el control, alcanzando diferencias significativamente estadísticas en ambas líneas celulares. Esto se condice con la literatura, ya que las células al verse bajo un medio estresor, como es la baja concentración de glucosa en el medio de cultivo celular, pueden activar la vía autofágica para mantener su homeostasis y evitar la muerte celular (Aversa y cols., 2016).

En un estudio de Lai y cols. (2018) se evaluaron los niveles proteicos de LC3B y la relación con su pronóstico en cáncer orofaríngeo y en carcinoma oral de células escamosas (SCC), en el cual se reportaron altos niveles proteicos de expresión, además de tener una estrecha relación con un mal pronóstico en ambas patologías, considerando a esta proteína como un biomarcador independiente del pronóstico

de cáncer orofaríngeo. Asimismo, destaca la importancia de la inhibición del proceso autofágico, ya que este puede resultar beneficioso en terapias actuales, provocando quimiosensibilidad o radiosensibilidad en modelos de estudios (Lai y cols., 2018). De hecho, esto fue analizado anteriormente en diferentes estudios experimentales, la regulación del proceso autofágico provocó que las células tumorales se vuelvan más sensibles o resistentes a la irradiación o quimioterapia, lo que sugiere que éste sí interviene en la respuesta a agentes citotóxicos (Giatromanolaki y cols., 2014).

Con respecto a la disponibilidad de nutrientes, en este caso de glucosa, un estudio realizado en el año 2020 observó el efecto de la privación de glucosa en células de cáncer colorrectal y, se percataron de un cambio en el metabolismo de los aminoácidos que beneficia la supervivencia de estas células, este cambio es provocado por el gen *JMJD2B*, el cual se ve sobreexpresado en este cáncer y en otros tipos de cáncer. Este gen es responsable de la inducción de la autofagia y de la agresividad de este cáncer, promoviendo la progresión del tumor (Tan y cols., 2020).

A pesar de que el proceso de autofagia está ampliamente descrito en la literatura, aún existe confusión con respecto al rol que adquiere este proceso en el desarrollo del cáncer. Esto se debe a que se encuentra directamente involucrado en la protección de la integridad celular y la estabilidad genómica, actuando como un posible supresor de la tumorigénesis. Sin embargo, también se ha demostrado en diferentes estudios que los componentes que fueron degradados por los autofagolisosomas proporcionan; aminoácidos, nucleótidos y lípidos, moléculas esenciales utilizadas para la posterior producción de ATP y la síntesis de nuevas células tumorales, actuando en este caso como un factor que ayuda a la progresión del tumor (Czyzyk-Krzeska y cols., 2012). Por lo tanto, es de suma importancia continuar estudiando este proceso, pues se determinará el rol que cumple en los tumores sólidos.

Posteriormente, se evaluaron los niveles de expresión de VDAC1 (32 kDa), o canal aniónico voltaje dependiente, encargada del transporte de moléculas pequeñas, metabolitos e iones. Considerada como la principal mediadora entre la célula y la

mitocondria. Localizada en la membrana externa mitocondrial, este canal interacciona con diferentes proteínas reguladoras de procesos pro-apoptóticos como anti-apoptóticos, considerada de esta manera como la reguladora de las vías de señalización. Además, en últimos estudios se ha observado que promueve el fenotipo metabólico de las células tumorales y que se ve sobre-expresada en múltiples tipos de cáncer (Shoshan-Barmatz y Mizrachi, 2012).

Los niveles proteicos obtenidos de VDAC1 fueron mayores en relación con el control tanto en la línea celular CAL-27 como en HEP-2, esta diferencia en su expresión fue significativamente estadística para ambas líneas celulares. Estos resultados concuerdan con lo que se esperaba, ya que cuando la célula entra en proceso de estrés metabólico, debido a un agente estresor, en este caso la baja glucosa, opta por la supervivencia y por una vía metabólica distinta a la vía glucolítica que acostumbra. Esta vía produce mayor cantidad de transporte de ATP, que se ha visto está relacionada con un aumento en la expresión de VDAC1, por lo que se deduce que la célula estaría realizando la vía de la Fosforilación Oxidativa (OXPHOS) (Amsalem y cols., 2020). Además, se ha proporcionado evidencia que existe un aumento en la biogénesis mitocondrial mediada por AMPK, lo que puede explicar el aumento de ATP y mayor expresión de VDAC1 al encontrarse la célula tumoral en situaciones de limitación de glucosa. Es importante destacar que la supervivencia celular mediada por AMPK requiere la inhibición de mTOR. Como mTOR regula principalmente los procesos anabólicos, su activación puede perturbar la homeostasis energética bajo estrés metabólico (Chaube y Bhat, 2016). Para poder asegurar este hecho sería interesante medir la cantidad de ATP intracelular y la velocidad de consumo de oxígeno respecto a las células cultivadas en alta glucosa.

En el estudio de Mazure igualmente se menciona la importancia del flujo de metabolitos esenciales, como el ATP, ya que este determina el funcionamiento de las mitocondrias ante estímulos nocivos. Además, VDAC1 actúa como plataforma para muchas proteínas y, al hacerlo, apoya la glucólisis y previene la apoptosis al interactuar con Hexoquinasa (HK) o miembros de la familia Bcl-2, respectivamente. Por lo tanto, VDAC1 participa en la elección que hacen las células para sobrevivir o morir, lo que es particularmente relevante para las células tumorales. Por estos

motivos, VDAC1 se ha convertido en potencial blanco terapéutico para combatir el cáncer, pero también otras enfermedades en las que se modifica el metabolismo mitocondrial (Mazure, 2017).

En definitiva, aún existen muchas variables que condicionan el comportamiento de las células tumorales frente a los tratamientos actuales y a los diferentes estímulos, por lo que aún estas deben ser exhaustivamente estudiadas, ya sea en estudios *in vivo* como en ensayos clínicos, con la finalidad de encontrar un camino a futuro para poder combatir esta enfermedad. Los medios bajo en glucosa provocan la supervivencia de las células tumorales y la adaptación por medio de vías de escape como es el proceso de autofagia, sin embargo, cuando esta se encuentra combinada con terapias farmacológicas que inhiben este proceso o modifican el metabolismo mitocondrial se ve una mejora en la eficacia de las terapias convencionales, por lo que es un factor que modula la respuesta a los tratamientos. Los odontólogos tienen el deber de estar atentos a las distintas señales a tiempo para poder disminuir las tasas de mortalidad de CCyC que cada año van en aumento. Es por esta razón que es de vital importancia realizar una buena entrevista, examen físico intraoral y diagnóstico preventivo, así como una adecuada educación y promover el autoexamen para concientizar a la población sobre este problema de salud pública.

VII. CONCLUSIONES

En este estudio se evaluó el efecto que posee la baja concentración de glucosa sobre las líneas celulares tumorales CAL-27, HEP-2 y la línea celular displásica DOK cuando se encuentran bajo la acción de fármacos potencialmente citotóxicos.

Respecto a estos fármacos se concluye que; Itraconazol e Hidroxicloroquina son fármacos que aumentaron su citotoxicidad en CAL-27 y HEP-2 al estar sometidas a baja disponibilidad de glucosa. El medio bajo en glucosa provocó un estado de estrés metabólico que probablemente seleccionó a las células tumorales más aptas, desencadenando cambios en su metabolismo mitocondrial y la inducción de la autofagia para lograr su adaptación. Por lo que se podría inferir que Itraconazol e Hidroxicloroquina aumentaron su potencia farmacológica inhibiendo estos procesos adaptativos, respectivamente.

En ambas líneas tumorales hubo una disminución de la citotoxicidad de Cisplatino frente a las condiciones de baja glucosa, por lo que su potencia terapéutica fue menor. Se generó probablemente mayor resistencia en CAL-27 y HEP-2, debido a la posible generación previa del proceso autofágico.

Hidroxicloroquina es el fármaco con mayor eficacia de los tres evaluados en baja glucosa, además de poseer una buena potencia farmacológica con concentraciones aplicables clínicamente en un esquema terapéutico. Se deben realizar estudios a futuro con terapias de combinación, así como estudios *in vivo*.

Los tres fármacos resultaron poco selectivos para el tratamiento de células tumorales CAL-27 y HEP-2. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que los queratinocitos orales displásicos DOK son células que se encuentran levemente alteradas. Es necesario a futuro evaluar con otras líneas celulares de tejido sano para estudiar esta característica.

La baja concentración de glucosa provocó un aumento en la expresión de LC3B-II principal biomarcador de la autofagia en ambas líneas celulares tumorales, por lo

que se puede suponer que la célula opta por esta vía de escape a la muerte celular al encontrarse frente a este estímulo. Sin embargo, el rol de la autofagia en el cáncer aún no está esclarecido del todo, por lo que los esfuerzos futuros deben apuntar a un análisis más exhaustivo en otros modelos de estudio.

La expresión de VDAC1 en estas líneas tumorales es alta y aumentan aún más sus niveles proteicos cuando se encuentran expuestos al medio bajo en glucosa, provocando un probable cambio en el metabolismo mitocondrial clave para la adaptación a este ambiente. Al igual que la proteína anterior, aún es una proteína ampliamente estudiada considerada un blanco terapéutico, debido a sus variadas funciones en el metabolismo de las células tumorales y en su supervivencia.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulaziza, N., Shah, A. y McCune, W. (2018). Hydroxychloroquine: balancing the need to maintain therapeutic levels with ocular safety: an update. *Current Opinion in Rheumatology* , 1-7.
- Adhaultiya, N., Kalappanavar, A., Ali, I.M. y Annigeri, R. (2016). Autophagy: A boon or bane in oral cancer. *Oral Oncology*, 120-126.
- Aldossary, A. (2019). Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal* , 7-15.
- American Dental Association.(2019). *Oral Health Topics; Cancer (Head and neck)*. Obtenido de <https://www.ada.org/en/member-center/oral-health-topics/cancer-head-and-neck> (Visitado el 20 de Abril de 2021).
- Amsalem, Z., Arif, T., Shteinfer-Kuzmine, A., Chalifa-Caspi, V. y Shoshan-Barmatz, V. (2020). The Mitochondrial Protein VDAC1 at the Crossroads of Cancer Cell Metabolism: The Epigenetic Link. *cancers*, 1-25
- Arcucci, A., Ruocco, M. R., Granato, G., Sacco, A. M., y Montagnani, S. (2016). Cancer: An Oxidative Crosstalk between Solid Tumor Cells and Cancer Associated Fibroblasts. *Biomed Res Int.* , 1-7.
- Arem, H. y Lofffield, E. (2017). Cancer Epidemiology : A Survey of Modifiable Risks Factors for prevention and survivorship. *THEMED*, 200-210.
- Aversa, Z., Pin, Z. , Lucia, S., Penna, F., Verzaro, R. y cols. (2016). Autophagy is induced in the skeletal muscle of cachectic cancer patients. *Scientific Reports*, 1-11.
- Aykul, S., y Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *HHS Public Access*, 508: 97–103.
- Bagan, J., Sarrion, G. y Jimenez, Y. (2010). Oral cancer: Clinical features. *Oral Oncology*, 414-417.
- Bhat, T., Kumar, S., Chaudhary, A., Yadav, N. y Chandra, D. (2015). Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discovery Today* , 635-643.
- Bolesina, N., Femopase, F., López de Blanc, S., Morelato, R. y Olmos, M. (2012).

- Oral Squamous Cell Carcinoma Clinical Aspects. *Oral Cancer*, 1-46.
- Boza Oreamuno, Y. (2017) Carcinoma oral de células escamosas diagnosticado precozmente: Reporte de caso y revisión de literatura -*ODOVTOS-Int. J. Dental Sc.*, 19-1: 43-50.
- Camara, A., Zhou, Y., Wen, P., Tajkhorshid, E. y Kwok, W. (2017). Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *frontiers in physiology*, 1-18.
- Cancer Research UK, C. R. (2015). *Cancer Research UK*. Obtenido de Worldwide cancer risk factors: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/risk-factors#heading-Zero> (Visitado el 19 de Abril del 2021).
- Cárcamo, M. (2018). Epidemiología y generalidades del tumor de cabeza y cuello. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 388-396.
- Cardemil, F. (2014). Epidemiología del carcinoma escamoso de cabeza y cuello. *Revista Chil. Cir Vol 66- N°6*, 614-620.
- Cassidy, J. W., y Bruna, A. (2017). Tumor Heterogeneity. *Mouse Xenograft Models of Cancer*, 37-55.
- Catanzaro, D., Gaude, E., Orso, G., Giordano, C., Guzzo, G. y cols. (2015). Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase sensitizes cisplatin-resistant cells to death. *Oncotarget*, 30102-30114.
- Chan Chae, Y., y Ho Kim, J. (2018). Cancer stem cell metabolism: target for cancer therapy. *BMB Reports*, 319-326.
- Chaube, B., y Bhat, M. (2016). AMPK, a key regulator of metabolic/energy homeostasis and mitochondrial biogenesis in cancer cells. *News and Commentary*, 7(1).
- Cook, K., Wärrri, A., Soto-Pantoja, D., Clarke, P., Cruz, M., y cols. (2014). Hydroxychloroquine Inhibits Autophagy to Potentiate Antiestrogen Responsiveness in ER +Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 3222-3232.
- Cosway, B. y Lovat, P. (2016). The role of autophagy in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology*, 1-6.
- Czyzyk-Krzeska, M., Meller, J. y Plas, D. (2012). Not all autophagy is equal. *Autophagy*, 1155-1156.

- Dagogo-Jack, I., y Shaw, A. (2017). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *NATURE REVIEWS | CLINICAL ONCOLOGY*, 1-14.
- Dasari, S. y Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanism of action. *National Institute of Health*, 1-2.
- Del Corso, G., Villa, A., Tarsitano, A. y Gohel, A. (2016). Current trends in oral cancer: a review. *Cancer Cell & Microenvironment*, 1-11.
- Deng, H., Huang, L., Liao, Z., Liu, M., Li, Q. y cols. (2020). Itraconazole inhibits the Hedgehog signaling pathway thereby inducing autophagy-mediated apoptosis of colon cancer cells. *Cell Death & Disease volume 11*, 539
- Desai, A., Yan, Y. y Gerson, S. (2018). Concise Reviews: Cancer Stem Cell Targeted Therapies: Toward Clinical Success. *Stem Cells Translational medicine*, 75-81.
- Dias, R., Borges, R., Torres, M., De Faro, L., Gomes, R. y cols. (2020). Inhibition of CAL27 Oral Squamous Carcinoma Cell by Targeting Hedgehog Pathway With Vismodegib or Itraconazole. *frontiers in Oncology*, Volume 10, 1-12.
- Duan, J., Yang, D., Liu, D. y Shi, Y. (2018). Clinical efficacy of bevacizumab combined with gemcitabine and cisplatin combination chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *JBUON*, 1403-1405.
- Durcan, L., Clarke, W., Magder, L. y Petri, M. (2015). Hydroxychloroquine Blood Levels in Systemic Lupus Erythematosus: Clarifying Dosing Controversies and Improving Adherence. *The Journal of Rheumatology*, 42 (11) 2092-2097.
- Esteve, J. y Knecht, E. (2011). Mechanisms of autophagy and apoptosis: Recent developments in breast cancer cells. *World J Biol Chem. Oct 26, 2011; 2(10): 232-238*
- Fadaka, A., Ajiboye, B., Ojo, O., Adewale, O., Olayide, I., y cols (2017). Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*, 45-51.
- Ferreira, J. A., Peixoto, A., Neves, M., Gaitero, C., A Reis, C. y cols. (2016). Mechanism of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug resistance update*, 34-54.
- Fulda, S., Galluzi, L., y Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Review Drug Discovery*, 447- 464.
- García, J.A. y Bueno, C. (2008). Avances en el tratamiento del cáncer escamoso de

- cabeza y cuello. *Anales de Medicina Interna*, 157-158.
- Germà-Lluch, J. y Piulats, J. (2013). Bases moleculares de la resistencia a Cisplatino en cáncer de testículo. *Perspectivas actuales de la biología molecular aplicada a la Uro-oncología*. 524-535.
- Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Mendrinos, S., Koutsopoulos, A. y Koukourakis, M. (2014). Autophagy proteins in prostate cancer: Relation with anaerobic metabolism and Gleason score. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 32, 39e11-39e18.
- GLOBOCAN. (2018). *Cancer Tomorrow*. Obtenido de <http://gco.iarc.fr/tomorrow/help?tab=references> (Visitado el 19 de abril del 2021).
- Guo, X-l., Li, D., Hu, F., Song J-r., Zhang, S. y cols. (2012). Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer letters*, 320(2), 171–179.
- Guerra, F., Arbini, A. y Moro, L. (2017). Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 686-699.
- Harvard Health Publishing, H. H. (2019). The 10 commandments of cancer prevention. *Harvard Health Publishing*. Obtenido de: https://www.health.harvard.edu/newsletter_article/the-10-commandments-of-cancer-prevention (Visitado el 20 de abril del 2021).
- Head, S., Shi, W. , Zhao, L., Gorshkov, K., Pasunooti, K. y cols. (2015). Antifungal drug itraconazole targets VDAC1 to modulate the AMPK/mTOR signaling axis in endothelial cells. *PNAS*, 1-10.
- Ho, M., Risk J. M. , Woolgar, J., Field, E., Field, J. y cols. (2012). The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncology*, 969-976.
- Hu, Q., Hou, Y, Huang, J., Fang, J. y Xiong, H. (2017). Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Research* , 1-11.
- Indran, I., Tufo, G. y Pervaiz, S. y Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 735-745.
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2015). Cáncer. Obtenido de:

- <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> (Visitado el 18 de Abril 2021).
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2017) . Cánceres de Cabeza y cuello. Obtenido de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/hoja-informativa-cabeza-cuello> (Visitado el 18 de Abril del 2021).
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (Julio de 2018). El cáncer oral. Obtenido de https://www.nidcr.nih.gov/espanol/temas-de-salud/el-cancer-oral/informacion_adicional (Visitado el 20 de Abril del 2021).
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2020). Tratamiento de los tumores de laringe infantiles (PDQ®)–Versión para pacientes. Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/paciente/infantil/tratamiento-laringe-pdq> (Visitado el 20 de Abril del 2021)
- Itriago, Silva, N., y Cortes, G. (2013). Cáncer en Chile y el mundo: Una mirada epidemiológica, presente y futuro. *Clínica Las Condes*, 531 -552.
- Jerjes, W., Upile, T., Hamdoon, Z. , Mosse, C., Akram, S. y cols. (2011). Photodynamic Therapy Outcome for Oral Dysplasia. *Lasers in Surgery and Medicine*, 192–199.
- Jiang, F., Xing, H., Chen, W., Du, J., Ruan, W. y cols. (2018). Itraconazole inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through activation of Bak-1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1-9.
- Jones, T., De, M., Foran, B., Harrington, K. y Martimore, S. (2016). Laryngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary guidelines. *The Journal of Laryngology & Otology*, S75-S82.
- Kang, R., Zeh, H., Lotze, M. y Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and. *Cell Death and Differentiation*, 571–580.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., y Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141.
- Kretowski, R., Burzym-Kluczyk, M. , Stypulkowska, A., Branska-Januszewska, J., Ostrowska, H. y cols. (2016). Low glucose dependent decrease of apoptosis and induction of autophagy in breast cancer MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* , 35-47.

- Lai, K., Matthews, S., Wilmott, J., Killingsworth, M., Yong, J. y cols. (2018). Differences in LC3B expression and prognostic implications in oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma patients. *BMC cancer*, 1-12.
- Lefort, S., Joffre, C., Kieffer, Y., Givel, A., Bourachot, B. y cols. (2014). Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Monash University Library*, 1-32.
- Lin, J., Xia, L., Liang, J., Han, Y., Wang, H. y cols. (2019). The roles of glucose metabolic reprogramming in chemo- and radio-resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 1-13.
- Lin, X., Xiao, Z., Chen, T., Liang, S. y Guo, H. (2020). Glucose Metabolism on Tumor Plasticity, Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Oncology*, 1-10.
- López, K., Dzul, K., Lugo, C., Arias, J. y Zavala, J. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomed 2016*, 27:127-136
- Lovly, C., Salama, A., y Salgia, R. (2016). Tumor Heterogeneity and Therapeutic Resistance. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, e587-e593.
- Magri, A., Reina, S. y Pinto, V. (2018). VDAC1 as Pharmacological Target in Cancer and Neurodegeneration: Focus on Its Role in Apoptosis. *frontiers in Chemistry*, 1-17.
- Makovec, T. (2019). Cisplatin and beyond: Molecular Mechanism of Action and Drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology*, 148-158.
- Markopoulos, A. (2012). Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. *The Open Dentistry Journal*, 126-130.
- Marur, S. y Forastiere, A. (2016). Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, diagnosis and treatment. *Symposium on neoplastic hematology and medical oncology*, 386-396.
- Mateo-Sidrón Antón, M.C., y Somacarrera Pérez, M.L. (2015). Cáncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. revisión de la literatura. *Avances en Odontoestomatología*, 31(4), 247-259.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. y White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nature Review: Cancer*, 961-967.

- Mazure, N. (2017). VDAC in cancer. *BBA- Bioenergetics*, 665-673.
- Mencher, S., y Wang, L. (2005). Promiscuous drugs compared to selective drugs (promiscuity can be a virtue). *BMC Clinical Pharmacology* , 5:3.
- Ministerio de Salud (MINSAL). (2018). *Plan Nacional de Cáncer 2018-2028*. Obtenido de https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/01/2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf (Visitado el 22 de Abril del 2021)
- Ministerio de Salud (MINSAL). (2020). *Biblioteca del Congreso Nacional de Chile/BCN*. Obtenido de Ley 21258: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1149004> (Visitado el 22 de Abril del 2021)
- Molecular Devices. (2021). *Western blotting assay workflow*. Obtenido de: <https://www.moleculardevices.com/technology/western-blot#gref> (Visitado el 22 de abril del 2021).
- Moruno, F., Pérez-Jiménez, E. y Knecht, E. (2012). Regulation of Autophagy by Glucose in Mammalian Cells . *cells*, 372-395.
- Mroz, E., y Rocco, J. (2016). Intra-tumor heterogeneity in head and neck. *World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery* , 60-67.
- Navrátilová, J., Hankeová, T., Beneš, T. y Smarda, J. (2013). Low-Glucose Conditions of Tumor Microenvironment Enhance Cytotoxicity of Tetrathiomolybdate to Neuroblastoma Cells. *Nutrition and cancer*, 702-710.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), O. M. (12 de septiembre de 2018). *World Health Organization*. Obtenido de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer#:~:targetText=Cancer%20is%20the%20second%20leading,%2D%20and%20middle%2Dincome%20countries>.
- Pantziarka, P., Sukhatme, V., Bouche, G., Meheus, L. y Sukhatme V. (2015). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—itraconazole as an anti-cancer agent. *ecancermedicalscience*, 1-16.
- Parzych , K., y Klionsky, D. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *FORUM REVIEW ARTICLE*, 460-473.
- Pendleton, K. y Grandis. J. (2013). Cisplatin-based chemotherapy options for recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *National Institute of Health*, 1-2.

- Rajkumar, P., Mathew, B. , Das, S. , Isaiah, R., John, S. y cols. (2016). Cisplatin Concentrations in Long and Short Duration Infusion: Implications for the Optimal Time of Radiation Delivery. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 1-4.
- Ravanan, P., Srikumar, I., y Talwar, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sciences*, 1-48.
- Ribeiro, C., Molina, M., Quinet, A., Bispo, J., y Martins, C. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, 1-10.
- Ribeiro, P. I., Perillo , A., Borges, L., y Pacheco, M. (2020). Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. *Pathology - Research and Practice*, 1-9.
- Rinkel, R., Verdonck-de Leeuw, I., Van den Brakel, N., de Bree, R., Eerenstein, S., Aaronson, N. y cols. (2014). Patient-reported symptom questionnaires in laryngeal cancer: Voice, speech and swallowing. *Oral Oncology*, 759-764.
- Santelices, M., Cárcamo, M., Brenner, C. y Montes, R. (2016). Cáncer Oral en Chile; Revisión de la Literatura. *Revista Médica Chile*, 766-770.
- Shoshan-Barmatz, V., y Mizrachi, D. (2012). VDAC1: from structure to cancer therapy. *frontiers in Oncology*, 1-33.
- Shoshan-Barmatz, V., Maldonado, E. y Krelin, Y. (2017). VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *cell stress*, 11-36.
- Snyder, V., Reed-Newman, T., Arnold, L., Thomas, S. y Anant, S. (2018). Cancer Stem Cells Metabolism and potential therapeutic targets. *frontiers in Oncology*, 1-9.
- Tan, J., Wang, H., Yang, J., Liu, Q. , Li, C. y cols. (2020). JMJD2B-induced amino acid alterations enhance the survival of colorectal cancer cells under glucose-deprivation via autophagy. *Theranostics*, 5763-5777.
- Thankamony, A., Saxena, K., Murali, R., Jolly, M. y Nair, R. (2020). Cancer stem cell plasticity - A deadly deal. *frontiers in Molecular Bioscience* , 1-16.
- Tsang, R., Al-Fayea, T., Au, H. (2009). Cisplatin Overdose Toxicities and Management. *Practical Drug Safety*, 1109-1122.
- Verbaanderd, C., Maes, H., Schaaf, M., Sukhatme, V., Pantziarka, P. y cols. (2017). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *ecancermedicalscience*, 11:781.

- Visser, M. (2018). Techniques for Monitoring Drug Efficacy. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 21(2), 287–295
- Vyas, S., Zaganjor, E., y Haigis, M. (2016). Mitochondria and Cancer. *HHS Public Access*, 555-566.
- Wallace, D. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews*, 685-698.
- Wise-draper, T. M., Draper, D., Gutkind, J., Molinolo, A., Wikenheiser-Brokamp, K. y cols. (2013). Future Directions and treatment strategies for head and neck squamous cell carcinoma . *National Institute of Health*, 3.
- Williams, T., Forsberg, L. J., Viollet, B., y Brenman, J. E. (2009). Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy*, 5(8), 1155–1165.
- Le, X. y Hanna, E. Y. (2018). Optimal regimen of cisplatin in squamous cell carcinoma of head and neck yet to be determined. *Annals of Translational Medicine* , 1-5.
- Yamano, Y., Uzawa, K., Saito, K., Nakashima, D., Kasamatsu, A. y cols.(2009). Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 129.
- Yang, Y., Karakhanova, S., Hartwig, W., D'Haese, J., Philippov, P. y cols. (2016). Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *Cellular Physiology*, 1-12.
- Yun, C. W., & Lee, S. H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3466.
- Zhao, H., Yang, M., Zhao J., Wang, J., Zhang, Y. y cols. (2013). High expression of LC3B is associated with progression and poor outcome in triple-negative breast cancer. *Med Oncol* , 1-8.
- Zheng, H.-y., Zhang, X-y., Wang, X-f. y Sun, B-c. (2012). Autophagy Enhances the Aggressiveness of Human Colorectal Cancer Cells and Their Ability to Adapt to Apoptotic Stimulus. *Cancer Biol Med* , 105-110.
- Zuoren, Y., Pestell, T., Lisanti, M. y Pestell, R. (2012). Cancer Stem Cells. *National Institute of Health*, 1-15.