



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DETERMINACIÓN DE UN PANEL DE BIOMARCADORES METABÓLICOS PARA EL
DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DUCTAL MAMARIO HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
SILVIA CECILIA PACHECO VELÁZQUEZ

TUTORA PRINCIPAL

DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ

COMITÉ TUTORAL

DRA. VILMA A. MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ

CIUDAD DE MÉXICO. OCTUBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

Esta tesis doctoral se realizó bajo la destacada dirección de la Dra. Sara Rodríguez Enríquez en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Agradezco al Comité Tutoral por los comentarios y observaciones realizados para el desarrollo de este proyecto.

La Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) apoyó a la sustentante con la beca No. 269212, y los proyectos 107183 de la Dra. Sara Rodríguez Enríquez y 239930 del Dr. Rafael Moreno Sánchez.

Por último ofrezco un sincero reconocimiento al Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez y al Dr. Álvaro Marín Hernández por la asesoría metodológica para el diseño y ejecución de este proyecto.

Dedicatorias

Fuera de la academia, la autora de esta tesis no podría haberse titulado sin la ayuda de las siguientes personas:

La manada de perros-ujuros:

Silviur 1, Crisur, Raymond y Ur[†].

Lo mejor del espacio:

Yamil

Mi crush/gurú del posgrado:

Daniel

Mis amigxs de cardio/posgrado:

Ileana, Geovanni, Isis, Paco, Edna, Nadia, Sayra, Iván y Felipe

Mis amigas de la vida:

Karla, Ale, Betsy y Akatzin

Entre palabras de aliento, consejos, regaños y cariño incondicional me han permitido llevar esta etapa a buen término.

Resumen

El carcinoma mamario triple negativo (TN) carece de una terapia específica debido a que no expresa receptores hormonales (RH) ni HER2, por lo que el análisis a nivel molecular y el desarrollo terapias específicas es un tópico de interés clínico.

La expresión del factor de transcripción HIF-1 α (el cual se asocia a estadios agresivos de la enfermedad) fue analizada en 102 biopsias de pacientes mexicanas, comparándose con 31 biopsias de tejido mamario no tumoral. Para evaluar la funcionalidad de HIF-1 α , se realizó un análisis por western blot de proteínas glicolíticas cuya expresión se encuentra regulada por este factor. Asimismo, se analizó el contenido de proteínas mitocondriales. La validación de HIF-1 α como biomarcador se realizó comparando su expresión con los contenidos de proteína de biomarcadores utilizados en clínica, así como proteínas asociadas a metástasis y autofagia. HIF-1 α , C-MYC, HER2 y COXIV aumentaron significativamente (2-100 veces) frente al tejido no tumoral. A pesar de la expresión de HIF-1 α en todas las muestras tumorales, únicamente el subtipo HER2+/RH-, mostró un aumento sustancial de HKII. Por el contrario, en el subtipo TN se detectó un aumento significativo en 2OGDH y E-cadherina vs. otros subtipos. Estos resultados sugieren que HIF-1 α + COXIV + C-MYC (+ HER2 para el subtipo HER2+/RH-) pueden ser útiles para integrar un patrón de biomarcadores metabólicos para el diagnóstico en CaMa, mientras que HIF-1 α + C-MYC + 2OGDH + E-cadherina pueden ser una alternativa de una firma molecular útil y confiable para el subtipo TN.

Para proponer estrategias terapéuticas se analizó el metabolismo energético de las líneas celulares TN; MDA-MB-231 (231) y MDA-MB-468 (468) en condiciones de normoxia (21% de O₂) e hipoxia (0.1% de O₂) midiendo: 1) el contenido de proteína de enzimas glicolíticas y mitocondriales, 2) el flujo de glucólisis y de fosforilación oxidativa (FO), y 3) la sensibilidad a inhibidores glicolíticos, mitocondriales y fármacos canónicos. En ambas líneas celulares la hipoxia aumentó significativamente los niveles de HIF1- α (99%), lo que se relacionó con un aumento de 2 a 5 veces de GLUT-1, HKI y II y LDH; así como un aumento del flujo glicolítico (30-80%). En referencia a la FO la hipoxia disminuyó (20% -60%) los contenidos de 2OGDH, COX-IV ND1 y ATP-sintasa así como la FO (60-75%). En normoxia ambas líneas celulares dependieron de la FO (60-75%) mientras que en hipoxia dependieron de la glucólisis (70-76%). En normoxia, las drogas antimitocondriales (casiopaina II gly y derivados de la vitamina E) disminuyeron la proliferación (IC₅₀ \approx 2.5 μ M) y la migración. Estos datos favorecen el uso de inhibidores antimitocondriales para el tratamiento del carcinoma mamario TN.

Summary

Triple negative breast cancer (TN) lacks a specific therapy due to the absence of HER2 and hormone receptors (HR) expression. Then a molecular analysis is an interesting approach to search new biomarkers and therapies.

The expression of the transcription factor HIF-1 α (which is associated with more aggressive stages of this disease) was analyzed in biopsies from 102 Mexican patients and compared to 31 non-tumoral breast biopsies. To assess the functionality of HIF-1 α , a proteomic analysis of glycolytic proteins whose expression is regulated by this transcription factor was carried out. Additionally, the content of mitochondrial proteins was analyzed. Furthermore, validation of HIF-1 α as a biomarker of breast cancer was performed by comparing its expression with protein content of common clinical biomarkers and proteins associated with metastasis and autophagy. HIF-1 α , C-MYC, HER2 and COXIV protein contents increased significantly in all tumor subtypes versus normal tissue. Although HIF-1 α showed a high expression in tumor samples, only HER2+/HR–subtype, showed a substantial HKII increase. Also, in the TN subtype a significant increase of 2OGDH and E-cadherin was detected vs. other subtypes. These results suggest that HIF-1 α + COXIV + C-MYC protein (+ HER2 for subtype HER2+/HR-) may be useful to integrate a pattern of metabolic biomarkers in breast cancer diagnosis, while the content of HIF-1 α + C-MYC + E-cadherin + 2OGDH can be an alternative to become a useful and reliable cancer prognosis subtype TN signature.

In order to establish targeted therapies, energy metabolism of the TN cell lines; MDA-MB-231 (231) and MDA-MB-468 (468) was analyzed under both normoxia (21% O₂) and hypoxia (0.1% O₂) by determining: 1) protein content of glycolytic and mitochondrial enzymes; 2) glycolytic and oxidative phosphorylation (OxPhos) fluxes; and 3) cell growth sensitivity to glycolytic and mitochondrial inhibitors, and anti-cancer drugs. In both cancer cell lines, 24 h hypoxia significantly increased HIF1- α (99%), which correlated with a significant increment (2-5 times) in GLUT-1, HKI and II and LDH, as well as in the glycolytic flux (30-80%). For OxPhos, hypoxia decreased (20%-60%) the contents of COX-IV, 2OGDH, ND1 and ATP-synthase as well as OxPhos flux (75%). Under normoxia, both cancer cell lines mainly depended on OxPhos (75-60%); whereas in hypoxia, both cell lines depended on glycolysis (70-76%). Under normoxia, anti-mitochondrial drugs (casiopaina II-gly and vitamin E-phosphonium derivatives) decreased cancer cell proliferation (IC₅₀ values \approx 2.5 μ M) as well as cell migration. These data support the use of mitochondrial inhibitors for the treatment of TN breast carcinoma.

Índice

Capítulo 1 Determinación de un perfil de biomarcadores para carcinoma mamario ductal infiltrante.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Epidemiología	2
1.2. Biomarcadores en CaMa: detección, clasificación y tratamiento.....	3
1.3. Limitaciones de los biomarcadores actuales en CaMa	5
1.4. Metabolismo energético en cáncer, una propuesta en la búsqueda de biomarcadores	7
2. Hipótesis y objetivos.....	12
3. Resultados	13
4. Discusión.....	26
5. Conclusiones.....	28
Capítulo 2 Análisis del metabolismo energético en carcinoma mamario triple negativo	29
1. Introducción.....	30
1.1. Epidemiología del carcinoma ductal mamario triple negativo	30
1.2. Estrategias terapéuticas / clasificación molecular	30
1.3. Metabolismo energético en el carcinoma mamario triple negativo.....	33
2. Hipótesis y objetivos.....	35
3. Material y métodos	36
4. Resultados	41
5. Discusión.....	52
6. Conclusiones.....	55
Apéndice 1 Referencias	56
Apéndice 3 Publicaciones en las que colaboré durante mis estudios de doctorado	62

Capítulo 1

**Determinación de un perfil de biomarcadores
para carcinoma mamario ductal infiltrante.**

1 Introducción

1.1 Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de muerte en países desarrollados (con un 13% del total de las muertes) en 2012 [WHO, 2015]. A nivel nacional, las estadísticas más actuales (2014) sitúan a este padecimiento como la tercera causa de muerte, siendo superada por la diabetes y las enfermedades cardiovasculares [INEGI, 2015]. Los cánceres de mama (CaMa) y cérvix (CaCu) se consideran las principales causas de morbilidad y de mortalidad en la población femenina mexicana [INEGI, 2015; SS 2015]. Las estadísticas muestran que del 2004 al 2014, la incidencia del CaMa aumentó 2.2 veces y la mortalidad un 40%, mientras que el CaCu presentó una disminución del 40% en incidencia y del 10% en mortalidad durante el mismo periodo de tiempo [INEGI, 2015; SS, 2015] (Figura 1). El CaMa tiene una mayor prevalencia a partir de los 25 años (*i.e.* de los 11,372 casos reportados en el 2014 únicamente el 1% corresponden al rango de 10 a 24 años) [SS, 2015] y en el rango de 25 a 65 esta patología es la principal causa de muerte por cáncer (20%) [INEGI, 2015]. Debido a lo anterior, el Sector Salud en México sitúa al CaMa como un problema grave de salud pública.

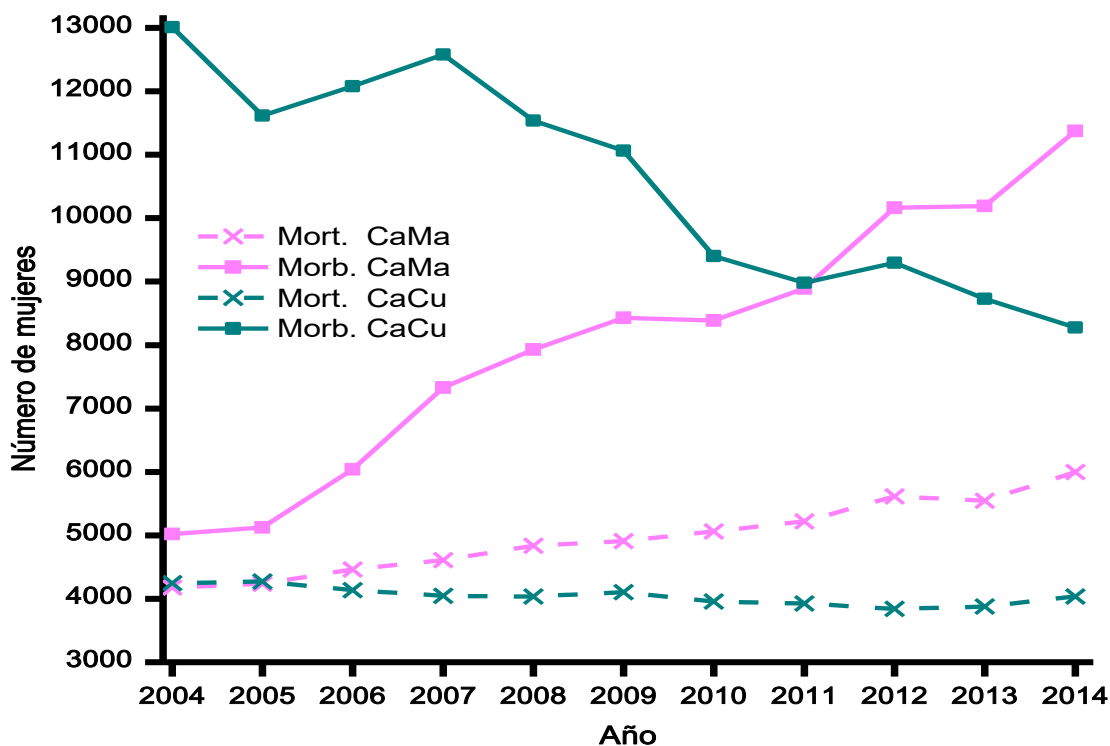


Figura 1. Relación morbilidad/mortalidad de CaMa y CaCu del 2004-2014. La línea continua indica la incidencia de cada tipo de cáncer y la línea punteada indica la mortalidad para cada una. INEGI, 2014 y SS 2014.

El aumento en la mortalidad se debe a; 1) campañas de detección insuficientes; lo que repercute en una mayor probabilidad (56-80%) de identificación del CaMa en estadios avanzados y 2) las metodologías de diagnóstico (mamografías y ultrasonidos) y clasificación (evaluación de receptores hormonales (RH) y HER2) son escasas en los centros de salud lo que prolonga (10 meses) la elección del tratamiento [Chavarri-Guerra et al., 2012]. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan una detección eficiente para la selección apropiada de un tratamiento.

1.2. Biomarcadores en CaMa, detección, clasificación y tratamiento

Un biomarcador molecular se define como una proteína o metabolito cuyo cambio en expresión y/o contenido se asocia a procesos fisiológicos o patológicos [Mayeux, 2004]. Los biomarcadores moleculares identificados en CaMa son de utilidad para evaluar la prognosis y la predicción de la enfermedad [Sawyers, 2008]

Los biomarcadores pronósticos permiten (a) clasificar a los cánceres con "buen pronóstico" vs. los de "mal pronóstico", (*i.e.* en un CaMa con buen pronóstico como el que es positivo al receptor de estrógeno (RE) la esperanza de vida de 5 a 15 años es del 70-95%; mientras que un cáncer de mal pronóstico como son los CaMa triple negativos (TN), la esperanza de vida es menor a 5 años (86%) [EBCTCG, 2005]; y (b) seleccionar adecuadamente el tipo de tratamiento clínico a seguir (*i.e.* el tratamiento adyuvante para los tumores positivos a RE es su inhibidor tamoxifen, mientras que los tumores positivos a HER2 son tratados con el anticuerpo monoclonal trastuzumab) [EBCTCG, 2005]. Los biomarcadores predictivos (o de respuesta) evalúan la probabilidad de obtener beneficios a largo plazo después de un tratamiento (*i.e.* en tumores positivos a RE el tratamiento con tamoxifen aumenta la sobrevida a 5 años en un 31%) [EBCTCG, 2005].

Para diagnosticar el estadio de malignidad (*i.e.* estadios I, II, III, IV) y establecer un tratamiento inicial, se evalúan características clínico-patológicas de la enfermedad mediante análisis morfológicos e histológicos [Fitzgibbons *et al.*, 2000]. En México los biomarcadores de tratamiento para CaMa son los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y el receptor al factor de crecimiento epidérmico en humano tipo 2 (HER2) [Pérez-Sánchez *et al.*, 2008; Ceballos-Cancino, 2008]. Este criterio permite clasificar a las pacientes en 4 subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2, y Triple negativo (Tabla 1). El subtipo Luminal A se caracteriza por presentar positividad a RE, puede o no presentar positividad a RP y no presenta positividad a HER2. Otro factor que recientemente se ha relacionado con este subtipo es una baja expresión del factor de

proliferación Ki67 (<30%). Es el subtipo con más prevalencia en el mundo (40-70%) y presenta una sobrevida mayor en comparación con los demás subtipos (*i.e.* la sobrevida a 5 años es del 90%). El luminal B presenta positividad a RE, puede o no presentar positividad a RP o a HER2 y, contrario al Luminal A, presenta niveles mayores de Ki67 ($\geq 30\%$). Este subtipo es el segundo lugar en prevalencia a nivel mundial (6-22%) y tiene una sobrevida semejante al grupo Luminal A. Por su parte, el subtipo HER2 únicamente presenta positividad a este receptor, tiene una menor prevalencia a nivel mundial (8-16%) y la sobrevida general es más baja en comparación con los otros subtipos (*i.e.* la sobrevida a 5 años es del 80%). Por último, el subtipo TN no expresa estos receptores. Su prevalencia es mayor en la población hispana y en la población afroamericana (14-22%) y es el subtipo con menor sobrevida (*i.e.* la sobrevida a 5 años es del 75%) [Perou *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 2006; Spitale *et al.*, 2009; Vallejos *et al.*, 2010; Pacheco-Velázquez *et al.*, 2014; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2012].

Subtipo	Clasificación histológica	Sobrevida a 2, 5 y 10 años	Tratamiento: Cirugía +	Incidencia en LA	Incidencia mundial
Luminal A	RE +	97%, 90%, 82%	Tamoxifen	56-65% (MX) 49% (PE)	73% (SZ)
	RP +/-				69% (PL)
	HER2-				55% (US)
	Ki67 <14%				53% (CO)
Luminal B	RE +	97%, 85%, 73%	Tamoxifen/ Trastuzumab	13-22% (MX) 13% (PE)	22% (CO)
	RP +/-				17% (US)
	HER2 +/- Ki67 >14%				14% (SZ) 6% (PL)
HER2	RE -	92% 80% 62%	Trastuzumab	16% (PE) 8-9% (MX)	12% (SZ)
	RP -				12% (PL)
	HER2 +				9% (CO) 7% (US)
Triple negativo	RE -	85%, 75%, 67%	Quimioterapia	21% (PE) 14% (MX)	22% (US)
	RP -				16% (CO)
	HER2-				7% (SZ) 8% (PL)

Tabla 1. Clasificación histológica de los subtipos de CaMa. Abreviaturas +; positivo, -; negativo, CO; Corea, LA; Latinoamérica, MX; México, PE; Perú, PL; Polonia, RE; receptor de estrógeno, RP; receptor de progesterona, SZ; Suiza, US; Estados Unidos de Norteamérica. Referencias: Carey *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2012; Pacheco-Velázquez *et al.*, 2014; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2015; Perou *et al.*, 2000; Spitale *et al.*, 2009; Vallejos *et al.*, 2010.

1.3 Limitaciones de los biomarcadores actuales en CaMa

Debido a que la clasificación de los tumores mamarios en estos 4 subtipos depende de análisis inmunohistoquímicos, se presentan con frecuencia resultados negativos aun cuando la patología esté presente (falso negativo; *i.e.* la relación de falsos negativos para el RE es de 30-70%, mientras que para el RP es del 40% y para HER2 es del 20% [Allred, 2008; Wolff *et al.*, 2006]) y en consecuencia el tratamiento será incompleto e inadecuado. Esto puede deberse a que: (1) la selección de un punto de corte (medido como el porcentaje de expresión del biomarcador para ser considerado como positivo) en la intensidad de la tinción, queda a criterio de la inspección ocular del patólogo; y (2) la intensidad de la señal inmunohistoquímica variará dependiendo del sitio donde fue obtenida la muestra (la señal será más débil conforme se aleje del tumor) [revisado en Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011]. Aunque en la clínica también se emplean otros biomarcadores como son C-MYC, Ki-67, H-RAS y p53 [Lari *et al.*, 2011], estos son más susceptibles a interpretaciones erróneas pues algunos tumores malignos los expresan independientemente del estadio en el que se encuentre el tumor (*i.e.* en CaMa, la expresión de Ki-67 es semejante en estadios II, III y IV [Burcombe *et al.*, 2005]).

Además, el análisis de un biomarcador de manera individual usualmente reporta resultados contradictorios. Por ejemplo, a pesar de que HER2 es considerado como un biomarcador pronóstico relativamente confiable para CaMa [King *et al.*, 1985; Slamon *et al.*, 1987; Citri *et al.*, 2006; Moasser, 2007; Graus-Porta *et al.*, 1997], algunos tumores pierden la expresión de HER2 luego del tratamiento con trastuzumab pero mantienen su malignidad o se vuelven más agresivos (*i.e.* solamente el 35% de las pacientes HER2 positivas tendrán una respuesta favorable al emplear trastuzumab; y de éstas el 70% presentará metástasis al año de tratamiento [Mitterdorf *et al.*, 2009; Gajria *et al.*, 2011]). La resistencia al tratamiento con trastuzumab se debe a (1) mutaciones en HER2 (*i.e.* la mutación p59HER2 da como resultado la activación constitutiva de este receptor); (2) la sobreexpresión de otros receptores de la familia de HER2 (como son EGFR, HER3 e IFGR); y (3) mutaciones en la cascada de señalización de HER2 (por ejemplo la disminución de PTEN y la sobre activación de la vía PI3K/Akt [Vu *et al.*, 2012]).

Como contraparte, el descubrimiento de nuevos biomarcadores ha impulsado el desarrollo (y mejoramiento) de nuevas terapias antineoplásicas personalizadas, como es el caso de las firmas genéticas *Mammaprint* y *OncotypeDX* (las cuales miden el nivel de mRNA de 70 y 21 genes en muestras de tejido fresco respectivamente) y permiten identificar a pacientes con alto riesgo de padecer metástasis y elegir candidatas para

tratamiento con quimioterapia [van 't Veer *et al.*, 2002]. Sin embargo, este tipo de análisis genómicos conllevan varias suposiciones y restricciones: (i) estas firmas subestiman el potencial de genes cuya regulación es a nivel transcripcional, post-transcripcional o post-traduccionales; (ii) la expresión del gen, medida como el incremento en el contenido de mRNA, no garantiza la estabilidad ni mucho menos la funcionalidad de la proteína; y por último (iii) los cambios en la transcripción genética no siempre correlacionan con la función biológica y las proteínas pueden ser reguladas por procesos post-traduccionales independientes del nivel de proteína o el nivel del ARN mensajero (mARN) por lo que resulta en un análisis incompleto [Moreno-Sánchez *et al.*, 2016; Subramanian y Simon, 2010; ter Kuile y Westerhoff, 2001]. La dificultad de clasificar y diseñar una terapia exitosa para el fenotipo TN denota la necesidad de desarrollar un análisis más integral, donde se incluya un perfil de biomarcadores de proteínas de diferentes vías (*e.g.* metabolismo+ proliferación+ resistencia a drogas+ metástasis+ hipoxia+ angiogénesis) para tener un mejor entendimiento del cáncer, su progresión y su posible tratamiento [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011].

1.4 Metabolismo energético en cáncer, una propuesta en la búsqueda de biomarcadores.

Las modificaciones en el metabolismo energético en los tumores (*i.e.* producción de ATP por glucólisis y fosforilación oxidativa: FO) es una característica que ha cobrado interés en la última década, a tal grado que se ha considerado como un marco de referencia del desarrollo tumoral [Hanahan y Weinberg, 2011]. Sin embargo, una gran cantidad de los estudios publicados se centran en analizar el aumento de la glucólisis tumoral en condiciones aeróbicas, fenómeno conocido como *efecto Warburg* [Warburg, 1956]. Esto se debe a que la mayoría de los tumores mantienen una glucólisis aumentada de 2 a 17 veces comparada con los tejidos de origen [Pedersen, 1999; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007], lo que provee de metabolitos esenciales para la proliferación (nucleótidos, aminoácidos, coenzimas y esqueletos de carbono) y equivalentes reductores (NADPH) para contender contra el estrés oxidante [Hanahan y Weinberg, 2011]; y permite el desarrollo de fenotipos invasivos en vejiga, mama, cervix y ovario [Semenza 2008]. Este fenómeno es semejante a los estadios iniciales del desarrollo embrionario previo a la implantación y generación de la placenta [Smith *et al.*, 2013].

En condiciones de normoxia este efecto es mediado por la expresión de oncogenes como C-MYC y cascadas de señalización (como es la vía de PI3K/AKT), que en conjunto aumentan la expresión de transportadores y enzimas de la glucólisis (*i.e.* GLUT1, HPI, PFK-1, enolasa, GAPDH, PGK y LDH-A [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007; Semenza, 2008; Lurlaro, *et al.*, 2014] (Tabla 3).

Por otro lado los tumores sólidos, a los que pertenece el CaMa, presentan una estructura heterogénea, es decir, en ciertas regiones no se tiene irrigación sanguínea apropiada por lo que hay una reducción de nutrientes y de oxígeno generando una condición de hipoxia [Höckel *et al.*, 2001]. La baja tensión de oxígeno (concentraciones tisulares de O₂ inferiores a 5-10 mm Hg) altera la homeostasis de la célula, lo que conduce a la estabilización de la subunidad 1 α del factor inducido por la hipoxia (HIF-1 α). El contenido de HIF-1 α se encuentra incrementado de 10 a 100 veces en tumores de pulmón, páncreas, colon, mama, ovario, hígado y gliomas, ya sea medido por Western Blot o por ensayos de inmunohistoquímica [Bos *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2012; revisado en Mabjeesh *et al.*, 2007]. Su activación promueve la transcripción de diversos factores que permiten la supervivencia y desarrollo celular como son: angiogénesis (VEGF y VEGFR, angiopoietina-2), eritropoyesis (trombospondina-1), incremento en el metabolismo energético (Tabla 3), proliferación celular (FGF, PDGF), remodelación vascular, proteólisis, inhibición de apoptosis, regulación del pH (MCT4 y CA-IX) y resistencia a fármacos (P-glicoproteína) [Brahimi-Horn *et al.*, 2009; Weidemann *et al.*, 2008]

En células cancerosas, la activación de HIF-1 α aumenta la cantidad y actividad de numerosas isoformas de la glucólisis en comparación con las células no-malignas [Revisado en Marín-Hernández *et al.*, 2009]. Por lo tanto, este proceso se ha correlacionado con el aumento de la velocidad del flujo glucolítico. Entre las enzimas glucolíticas reguladas por la estabilización de HIF-1 α están los transportadores de glucosa (principalmente, GLUT-1 y GLUT-3) que se sobreexpresan bajo condiciones hipóxicas [Brown *et al.*, 2002; Burt *et al.*, 2001; Rodríguez Enríquez *et al.*, 2010]; las hexocinasas (HK) HK-I y HK-II también son sobreexpresadas por este factor [Rankin y Giaccia, 2008]; y la lactato deshidrogenasa tipo A (LDH-A) que aumenta la producción y expulsión de lactato, acidificando el medio extracelular, de manera que el tumor continúe en crecimiento y expansión [Semenza, 2008] (Tabla 3). En este sentido la expresión de HIF-1 α y la regulación de proteínas involucradas en el metabolismo glucolítico son una alternativa considerable para ser estudiados como biomarcadores.

Normoxia			Hipoxia		
FT	Sitio de acción	Efecto	FT	Sitio de acción	Efecto
Glucólisis	C-MYC	GLUT1, HPI, PFK-1, GAPDH, PGK, ENO y LDH-A	HIF-1 α	GLUT1, HKII, HPI, ALDO, TPI,	Aumento de la glucólisis
	PI3K-AKT	GLUT 1, GLUT 4, PFK2		GAPDH, PGAM-B, ENO, PYK-M2 y LDH-A	
Metabolismo mitocondrial	p53	SCO2, GLS, PDK2, AIF, y Parkina	HIF-1 α	PDK1, LON, COX4-2	Disminución del consumo de piruvato Disminución de la FO
	C-MYC	TFAM, SLC1A5, SLC7A5, GLS, PDK1	AMPK	ATG5, LC3-I, BNIP3 y BNIP3L	Aumento en la autofagia

Tabla 3. Oncogenes, vías de señalización y factores de transcripción que modifican la glucólisis y el metabolismo mitocondrial en condiciones de normoxia e hipoxia. Abreviaturas: AIF; Factor inductor de la apoptosis, ALDO; Aldolasa, AMPK; Cinasa dependiente de monofosfato de adenosina, ATG5; Proteína de autofagia 5, BNIP3; Proteína de interacción con el complejo BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa, isoforma ,3 BNIP3L; Proteína parecida a la proteína de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa, isoforma 3, COX4-2; Isoforma 2 de la Citocromo oxidasa, ENO; Enolasa, FO; Fosforilación oxidativa, FT; Factor de transcripción, GAPDH; Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, GLS; Glutaminasa, GLUT1; Transportador de glucosa isoforma 1, GLUT 4; Transportador de glucosa isoforma 4, HIF-1 α ; Factor inducido por hipoxia, HKII; Hexocinasa isoforma 2, HPI; Hexosa fosfato isomerasa, LC3-I; Proteína 1A/1B-cadena liviana 3 asociada a microtúbulos isofoma 1, LDH-A; Lactato deshidrogenasa isoforma A, PDK1; Piruvato deshidrogenasa cinasa isoforma 1, PDK2; Piruvato deshidrogenasa cinasa isoforma 2, PFK-1; Fosfofructocinasa isoforma 1, PFK-2; Fosfofructocinasa isoforma 2, PGAM-B; Fosfoglicerato mutase tipo isoforma B, PGK; Fosfoglicerato cinasa, PI3K-AKT; Fosfoinositol 3-cinasa/ proteína cinasa de residuos serina/threonina, PYK-M2; Piruvato cinasa isoforma M2, SCO2; Proteína de ensamblaje de la citocromo C oxida isoforma 2, SLC1A5; Miembro número 1 de la familia 5 de acarreadores de solutos, SLC7A5; Miembro número 7 de la familia 5 de acarreadores de solutos, TFAM; Factor de transcripción mitocondrial A, TPI; Triosafosfato isomerasa. Referencias: Kim *et al.*, 2006, Marín-Hernández *et al.*, 2009, Fukuda *et al.*, 2007, Papandreou *et al.*, 2008; Matoba *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2011; Stambolsky *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Iurlaro *et al.*, 2014

Asimismo, en condiciones de normoxia el metabolismo mitocondrial se mantiene activo mediante procesos regulados por el factor transcripcional p53, el cual aumenta la expresión de la proteína de ensamblaje de la citocromo oxidasa (SCO2), la glutaminasa (GA), la piruvato deshidrogenasa quinasa 2 (PDK2), el factor inhibitorio de la apoptosis (AIF) y de una RBR E3 ubiquitín proteín ligasa (Parkina) [Matoba *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2011; Stambolsky *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011]. Asimismo C-MYC aumenta la biogénesis mitocondrial (mediante la transcripción de TFAM) y la glutaminólisis (modulando la expresión de los transportadores de glutamina y la GA [Revisado en Iurlaro *et al.*, 2014] (Tabla 3).

La hipoxia tumoral también genera cambios en el metabolismo mitocondrial (que pueden o no estar ligados a la estabilización de HIF-1 α) como son:

- (1) la disminución en la actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) mediada por el aumento en la transcripción y la actividad de la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), proteína regulada por HIF-1 α [Kim *et al.*, 2006];
- (2) la disminución en la actividad de ciertas enzimas del ciclo de Krebs como son la α -cetoglutarato deshidrogenasa (2OGDH) [McLain *et al.*, 2011];
- (3) el aumento de la GA [Matés *et al.*, 2009];
- (4) la disminución de enzimas de la cadena transportadora de electrones y el sistema fosforilante como es la degradación de la citocromo c oxidasa isoforma 1 (COX4-1) por la proteasa mitocondrial LON (la cual está regulada por HIF-1 α), al igual que la isoforma 2 de COXIV [Fukuda *et al.*, 2007] (Tabla 4). La ATP-sintasa disminuye su expresión [Isidoro *et al.*, 2004], aunque la translocasa de adenín nucleótidos (ANT) se encuentra sobre-expresada en diversos tipos de cáncer incluyendo el de mama [Brenner *et al.*, 2010].

Aunado a esto, la autofagia es un proceso que permite al tumor sobrevivir cuando la angiogénesis, que en tumores sólidos es limitada e imperfecta, lleva a la privación de nutrientes e hipoxia. Este mecanismo puede ser identificado por Bnip-3 y LAMP1. El primer factor es una proteína pro-apoptótica que está asociada a la disfunción mitocondrial y a la muerte celular, además de ser un potente inductor de la mitofagia [Quinsay *et al.*, 2010]. LAMP1 es una proteína membranal de los lisosomas cuya función intra-celular es mantener la integridad de los lisosomas, sin embargo cuando se encuentre en la membrana plasmática favorece la adhesión célula-célula [Sarafin *et al.*, 1998] y en cáncer está involucrada en procesos de migración, invasión y metástasis [Jensen *et al.*, 2013].

Aun así, son pocos los estudios donde se analizan los niveles de HIF-1 α en biopsias de CaMa. Bos y colaboradores (2001) demostraron que el carcinoma mamario muestra altos niveles de HIF-1 α (4 a 14 veces) comparado con el tejido mamario normal, en el cual está ausente [Bos *et al.*, 2001]. Además, la alta expresión de HIF-1 α se vincula a una mayor malignidad tumoral evaluada como metástasis y bajo pronóstico de supervivencia en pacientes con CaMa [Patiar, 2006]. De forma general, los niveles de HIF-1 α a nivel proteómico se consideran como un factor pronóstico en el CaMa tanto en pacientes con ganglios positivos como negativos [Patiar, 2006]. Sin embargo, ningún estudio analiza el contenido proteico de HIF-1 α junto con la expresión y actividad de proteínas glucolíticas y tampoco se considera al metabolismo mitocondrial como un biomarcador potencial.

Está ampliamente documentado que la alta velocidad glucolítica en todos los tumores de rápido crecimiento estudiados, es el resultado de la estabilización de HIF-1 α y este fenotipo está asociado con la tumorigénesis [Lee *et al.*, 2006], por lo que es posible que estas características permitan proponer “biomarcadores” específicos de desarrollo tumoral. En este sentido, en algunas biopsias de diferentes carcinomas humanos GLUT-1 se sobre-expresa de forma significativa [Rudlowski *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2007]. De igual forma, en biopsias humanas de CaMa, pulmonar y rectal la sobre-expresión de LDH y de HKII se vincula con un aumento en su actividad [Ballinski *et al.*, 1983; Ballinski *et al.*, 1984]. Sin embargo, HIF-1 α no se evaluó para establecer una correlación entre ambos. Por el contrario, el análisis en algunos tipos de cáncer se limita a evaluar individualmente los niveles de expresión de HIF-1 α o de alguna proteína del metabolismo glucolítico como GLUT-1 [Lee *et al.*, 2008] y en pocos casos se analiza la combinación de HIF-1 α + GLUT-1 [Lee *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009].

Con base en lo anterior resulta novedoso establecer si existe una mayor expresión de HIF-1 α y de algunas proteínas glucolíticas o mitocondriales, en CaMa. En el caso de lograr establecer con claridad una relación positiva entre el nivel de sobre-expresión de HIF-1 α , y las enzimas y transportadores glucolíticos o mitocondriales, en un tumor (en comparación con tejido no tumoral) estas proteínas podrían ser potenciales biomarcadores de cáncer.

2 Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El aumento en el nivel de estabilización de HIF-1 α , y los cambios subsecuentes en el contenido de proteínas de sus sitios de acción, podrán ser empleados en el desarrollo de un perfil de biomarcadores para pacientes triple negativo.

Objetivo Principal

Establecer un perfil de biomarcadores para biopsias de carcinomas mamarios ductales infiltrantes basados en el contenido de proteínas mediadas por HIF-1 α .

Objetivos particulares

- 1) Análisis de los contenidos de proteínas glucolíticas, mitocondriales, marcadores canónicos, proteínas asociadas a procesos de metástasis y autofagia en muestras tumorales y no tumorales
- 2) Análisis del contenido de proteínas en diferentes subtipos de carcinoma mamario.

3 Resultados

Identification of a metabolic and canonical biomarker signature in Mexican HR+/HER2-, triple positive and triple-negative breast cancer patients*

*Este artículo se publicó en la revista *International Journal Of Oncology*

En este trabajo, se analizó la expresión del factor de transcripción HIF-1 α en 102 biopsias de tumores mamarios de pacientes mexicanas sin tratamiento clínico previo (51 \pm 12 años) y se compararon con 31 biopsias de tejido mamario no tumoral. Todas las muestras fueron otorgadas por el banco de tumores del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). El análisis inmunohistoquímico de las 102 muestras nos permitió agruparlas en 4 subtipos; 56% correspondían a subtipo HER2- / RH+, 8% al HER2 + / RH-; 22% fueron triples positivo (HER2 + / RH +); y 14% fueron triple negativo (TN, HER2- / RH-). Para evaluar la funcionalidad de HIF-1 α , se realizó un análisis proteómico y funcional ("cinetómico") de proteínas glicolíticas, y de enzimas mitocondriales. Por otro lado, la validación de HIF-1 α como biomarcador de CaMa se realizó comparando su expresión con los contenidos de proteína de biomarcadores utilizados comúnmente en la clínica (C-MYC, Ki67 y H y K-RAS), así como proteínas asociadas a procesos de metástasis y la autofagia. El análisis por western blot reveló que los contenidos de proteína de HIF-1 α , C-MYC, HER2 y COXIV se incrementaron de manera significativa en todos los subtipos tumorales frente a tejido normal. Los contenidos y las actividades de las proteínas glicolíticas fueron similares entre muestras normales y tumorales, a excepción del subtipo HER2 / RH +, donde se observó un aumento sustancial de HKII. Por el contrario, en el subtipo TN se detectó un aumento significativo en 2OGDH y E-cadherina para vs. otros subtipos de CaMa. Estos resultados indican que las proteínas HIF-1 α + COXIV + C-MYC (+ HER2 para el subtipo HER2+) pueden ser útiles para describir un patrón de marcadores metabólicos en CaMa para el diagnóstico, mientras que el contenido de HIF-1 α + C-MYC + 2OGDH + E - cadherina puede ser una alternativa de una firma útil y confiable para el pronóstico del cáncer subtipo TN.

Identification of a metabolic and canonical biomarker signature in Mexican HR⁺/HER2⁻, triple positive and triple-negative breast cancer patients

SILVIA CECILIA PACHECO-VELÁZQUEZ¹, JUAN CARLOS GALLARDO-PÉREZ¹, JOSÉ LUIS AGUILAR-PONCE², PATRICIA VILLARREAL², LUZ RUIZ-GODOY², MANUEL PÉREZ-SÁNCHEZ², ALVARO MARÍN-HERNÁNDEZ¹, ERIKA RUIZ-GARCÍA², ABELARDO MENESES-GARCÍA², RAFAEL MORENO-SÁNCHEZ¹ and SARA RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ^{1,2}

¹Biochemistry Department, Cardiology National Institute, México City;

²Translational Medicine Laboratory, Cancerology National Institute, México City, México

Received June 27, 2014; Accepted August 14, 2014

DOI: 10.3892/ijo.2014.2676

Abstract. Infiltrating ductal breast cancer (IDC) is the principal tumor associated-malignancy in Mexican women. In IDC, the development of intermittent hypoxia leads to an adaptive response coordinated by the transcriptional factor HIF-1 α . In the present pilot, retrospective/cross-sectional study, the HIF-1 α expression was analyzed in 102 tru-cut biopsies from female patients (51 \pm 12 years) without previous clinical treatment and compared to 31 normal breast biopsies. The 102 IDC samples corresponded to 56% of HER2⁻/HR⁺; 8% of HER2⁺/HR⁻; 22% of triple positive (HER2⁺/HR⁺); and 14% of triple negative (TN, HER2⁻/HR⁻) subtypes. To assess HIF-1 α functionality, proteomic and kinetic analysis of glycolytic as well as mitochondrial enzymes, were determined. Validation of HIF-1 α as cancer biomarker was assessed by determining the contents of the commonly used biomarkers c-MYC, Ki67, and H- and K-RAS, as well as metastatic and autophagy proteins. Proteomic analysis revealed that HIF-1 α , c-MYC, HER2 and COXIV contents were significantly increased in all IDC subtypes vs. normal tissue. The contents and activities of glycolytic proteins were similar between normal and IDC samples, except for HER2⁺/HR⁺ where a substantial increase of HKII was observed. Significant increase in 2OGDH and E-cadherin was detected for TN samples vs. other IDC subtypes and for normal samples. These results clearly indicated that HIF-1 α + COXIV + c-MYC (+ HER2 for HER2⁺ subtype) may be useful to depict

a breast cancer metabolic marker pattern for diagnosis, whereas the contents of HIF-1 α + c-MYC + 2OGDH + E-cadherin may be an alternative useful and reliable signature for TN subtype cancer prognosis.

Introduction

Breast cancer involves a wide range of genetic and biochemical alterations and different clinical behavior and outcomes. As a consequence, there is an imperative clinical need to accurately identify the different classes of breast cancer to better define specific therapies. Molecular characterization may allow for a more precise classification of breast cancer by identifying new functional and more specific markers and which may represent potential therapeutic targets and/or indicators of prognosis (1). Currently, routine clinical management of breast cancer involves the use of presumably sensitive and specific molecular markers such as the hormone receptors (HR) for estrogen (ER) and progesterone (PR), and the epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Thus, ER, PR and HER2 immunohistochemistry (IHC) has become a routine and standard clinical task for diagnosis and treatment of breast cancer subtypes.

However, some relevant disadvantages have emerged from using these standard clinical procedures for diagnosis such as: i) the elevated number of false negatives (20% vs. total cases) and false positives (7% vs. total cases), i.e., increased levels of the ER, HER2 and PR proteins are also attained in non-tumor but proliferative tissues such as hematopoietic cells (2) and adipocytes of post-menopausal women (3) stimulated by proliferation-related cytokines (4); ii) the undefined and trial/error based treatment for the TN breast cancer patients (which account for approximately 20% of total cases) (4); iii) the acquired tumor resistance to prolonged trastuzumab initial treatments (35% vs. total cases) leading to metastatic progression despite the significant diminution detected in HER2 levels (70% vs. total cases) (5,6); and iv) the development of chemotherapy-resistant tumors after anti-hormonal treatments (7).

Correspondence to: Dr Sara Rodríguez-Enríquez, Biochemistry Department, Cardiology National Institute, Juan Badiano No. 1, Col. Sección 16, Tlalpan, México D.F. 14080, México
E-mail: saren960104@hotmail.com

Key words: cancer diagnostic marker, triple negative prognostic marker, HIF-1 α , metabolic biomarker, oncogenes, infiltrating ductal breast carcinoma

These disadvantages prompt the need for developing more reliable biomarkers with lower percentages of false positive and false negative responses.

Cancer is a multi-factorial disease (8). Therefore, the identification of several key proteins constituting different altered pathways (i.e., signaling, metabolism and proliferation), and whose contents and activities are very likely altered in tumor cells vs. normal cells, seems a more rational strategy, than that based on the identification of one single protein or gene (9,10), for precise tumor subtype diagnosis and improvement in the design of treatments for primary, refractory and metastatic tumors.

It has been proposed that the changes observed in several tumor signal transduction and metabolic pathways vs. normal ones may provide a molecular signature (8,10). The abnormal activation of the glycolytic pathway even under high oxygen availability is considered to be one of the most important metabolic hallmarks of cancer (reviewed in refs. 11,12). This observation takes relevance under normoxic and hypoxic conditions as well as normoglycemia and hypoglycemia, because glycolysis provides both ATP and glycolytic intermediaries for DNA, protein and lipid synthesis required for tumor proliferation and survival (12). In this regard, it has been determined that overexpression and secretion of glycolytic enzymes may improve diagnosis of ER⁺ breast cancer (13).

The molecular mechanism of the glycolytic activation involves several transcription factors and oncogenes (14,15). In particular, the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) increases the transcription of genes coding for specific glycolytic protein isoforms (GLUT1, GLUT 3, HK-I, HK-II, PFK-L, ALDO-A and -C, PGK1, ENO- α , PYK-M2, LDH-A and PFKFB-3) found overexpressed in tumor cells and absent (or in low expression) in their normal counterparts (reviewed in ref. 15). It has been also documented in monolayer cultures of metastatic tumors that elevated HIF-1 α contents correlate with accelerated glycolysis (15) which in turn, correlates with high malignancy (16). Notably, the expression of all these particular glycolytic isoforms is linked to other activated tumor pathways such as cellular survival, apoptosis resistance and cellular migration onset, which are indeed also regulated by HIF-1 α as well as by other transcription factors (15).

The HIF1 α -glycolysis-malignancy interrelationship has not been studied in human tumor biopsies, although a high content in HIF1- α protein has been found in advanced clinical stages (IIIA) and in highly metastatic breast tumor biopsies vs. non-metastatic stage tumors, suggesting that this transcription factor can be a reliable diagnosis/predictive/prognostic biomarker (17). Unfortunately, HIF-1 α increased levels can also be associated with other hypoxic diseases (heart attack, preeclampsia, diabetes, inflammation, ischemia and psoriasis) which are not linked to cancer development (18), deterring its potential role as cancer biomarker. Notwithstanding, to examine the possibility of establishing HIF1- α as selective biomarker in Mexican breast cancer patients, its content and functionality (assessing the contents and activities of glycolytic protein isoforms targeted by HIF-1 α) were determined in human infiltrating ductal breast carcinoma biopsies. In parallel, canonical diagnosis/prognosis biomarkers involved in altered signaling tumor pathways were also analyzed. Furthermore, the contents

of several mitochondrial enzymes were also determined to establish a possible relationship between HIF-1 α and mitochondrial metabolism in cancer biopsies. The design of a global biomarker panel, including proteins of the most altered pathways in tumors (metabolism, proliferation and signal transduction) in different breast cancer subtypes may help to improve cancer prognosis and hence its clinical treatment.

Materials and methods

Human breast tumor tissue collection and histopathology. The present study represents a pilot (19), prospective/cross-sectional research approved by the Ethics and Research Committees of the Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), México. The study from 2008 to 2013 included the evaluation of 102 women (age from 30-86, mean 51 \pm 12 years) diagnosed with infiltrating ductal breast carcinoma (IDC) also called invasive ductal carcinoma at the INCAN, México. According to the Cochran's categorical formula for determining sample sizes in pilot and prospective studies, 100 was the appropriate sample size based on i) the α level = 0.05; and ii) an acceptable margin of error: <10% (20).

Normal tissue was surgically withdrawn from selected areas of normal breast tissue of 31 cancer patients (age from 27 to 89 years, mean 58 \pm 17 years) and stored in liquid nitrogen in the INCAN Tumor Bank for 12-24 months (21). Internal control of sample stability revealed that the contents of several proteins (HIF-1 α , GLUT, LDH and ATPase) from fresh samples were similar to those stored in the INCAN Tumor Bank (data not shown). Normal samples were further validated as non-tumorigenic by assessing immunohistochemistry (IHC) negativity towards HER2 and hormone receptor. Patients diagnosed with IDC and no previous clinical treatments were used as the inclusion criterion for the present study, whereas insufficient material for biochemical assays was used as the exclusion criterion.

Tumor samples were obtained following the medical proceedings for tissue handling and patient care approved by the Institutional Ethics Committee supported by a patient's informed consent according to the Declaration of Helsinki. Patients were punctured with a tru-cut biopsy needle in the absence of local anesthesia. Histopathology was performed on hematoxylin and eosin stained biopsy slides. Each specimen was analyzed by visual inspection using standard light microscope by experimented pathologists as described (22) without knowledge of IHC results.

IHC analysis of biopsies. Human tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h. The sample was embedded in paraffin, cut with a microtome at 3 μ m thick and placed on microscope slide. Immunostaining was performed with a BenchMark Ultra automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA); estrogen receptor, progesterone receptor, HER2 and Ki67 protein antibodies were used at 1:100-250 dilutions. All antibodies were from Ventana Medical Systems, except for Ki67 (Bio SB Inc., Santa Barbara, CA, USA).

For estrogen and progesterone receptor identification, H-SCORE method was employed as described (23). For HER2

identification, negative score indicated <10% of stained cells; positive score indicated >30% of cellular staining.

The IHC analysis revealed that from 102 IDC biopsies, 23 corresponded to triple positive; 57 to HER2⁺/HR⁺; 8 to HER2⁺/HR⁻; and 14 to TN.

Western blot analysis. Samples from biopsies (0.4-1.8 mg total cellular protein, n=102) were placed in liquid nitrogen and kept at -70°C until used. For western blotting processing, frozen tumor and normal samples were powdered, re-suspended and homogenized in 0.6 ml 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, plus 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), 1 mM EDTA and 5 mM DTT, and centrifuged at 2,000 x g for 30 min at 4°C. Supernatants were recollected and protein content was determined by using the Lowry assay. IDC and normal breast samples (50 µg cellular protein) were re-suspended in loading buffer (10% glycerol; 2% SDS and 5% β-mercaptoethanol) and loaded onto 12.5% SDS-PAGE under denaturalizing conditions. The proteins were blotted to PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and protein identification was performed by overnight incubation with anti-HIF-1α, -GLUT1, -HKI, -HKII, -LDHA, -COXIV, -ATPase, -ANT, -GA, -2OGDH, -HER2, -c-MYC, -Ki67, -α-tubulin and -HRAS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) specific monoclonal antibodies (1:500-1:1,000 dilution). Detection of the hybridization bands was performed with the horseradish peroxidase reaction in photographic plates as previously described. Densitometry analysis was carried out using Scion Image software (Scion Corp., Walkersville, MD, USA). Double normalization of tumor sample signal was first performed against its respective load control (α-tubulin) and then considering the normal tissue as 100% (24).

Enzyme activities. The supernatants from the frozen-thawed biopsy samples, prepared as described above, were stored at -20°C in the presence of 10% (v/v) glycerol until determination of enzyme activities. Hexokinase (HK) and lactate dehydrogenase (LDH) activities were spectrophotometrically determined at 340 nm and 37°C as described elsewhere (25). Briefly, HK activity was assayed in 50 mM MOPS buffer, pH 7.0 plus 2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 1 mM NADP⁺, 15 mM MgCl₂, 10 mM ATP and 20-60 µg cell extract protein/ml. The reaction was started by adding 3 mM glucose after 3-min pre-incubation and generation of NADPH was measured at 340 nm. Lactate dehydrogenase (LDH) was assayed in 50 mM MOPS, pH 7.0, 0.15 mM NADH and 10-20 µg cell extract protein/ml; after 3-min pre-incubation; the reaction was started with 1 mM pyruvate and NADH consumption was registered at 340 nm.

Statistical analyses. To identify significant differences in protein contents between non-tumor and tumor samples as well as among the different tumor subtypes, parametric and non-parametric statistical analyses were performed. The Kolmogorov-Smirnov and Levene tests (26,27) were applied to demonstrate the protein normal distribution and homogeneity of variance of samples. Analysis of Kolmogorov-Smirnov and Levene tests data indicated that non-parametric analysis (NPA) should be used for appropriate statistical assessment between non-tumor and tumor samples. The NPA analysis

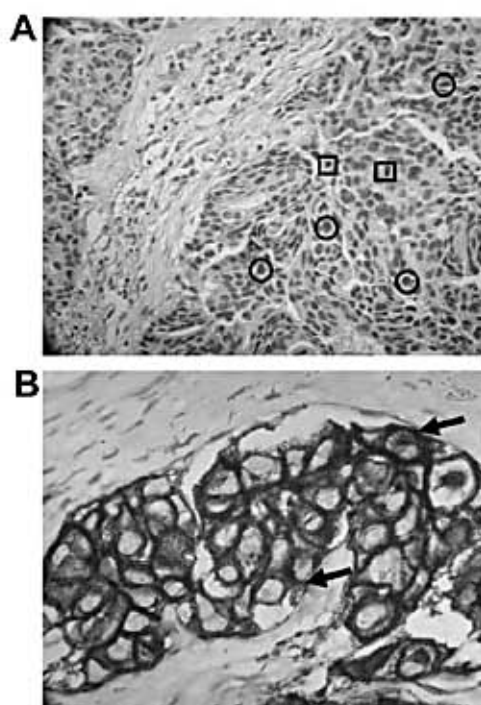


Figure 1. (A) Hematoxylin and eosin stain (H&E) of ductal infiltrating carcinoma. Circles show apparent atypias and squares cellular mitosis (original magnification, x20). (B) Immunohistochemical analysis showing increased HER2 intensity (arrows) in the plasma membrane of HER2⁺ ductal infiltrating breast carcinoma cells (original magnification, x40).

and graphical data were carried out by using the Microsoft SPSS v.20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Microsoft OriginPro 8 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) software, respectively. To validate the results obtained with NPA test, samples were re-analyzed by the Mann-Whitney U test with a P<0.01 (28).

To assess differences of the analyzed proteins among the tumor subtypes HER2⁺/HR⁻; HER2⁺/HR⁺; TP and TN the NPA Kruskal-Wallis test and the parametric analysis ANOVA were applied. To validate the results of the Kruskal-Wallis and ANOVA tests, the Mann-Whitney U test (28) corrected by the Holm-Bonferroni method and Scheffé post hoc test was used. Receiver operative characteristic (ROC) curves were also built for further validation as well as identification of the cut-off values for each protein. All statistical tests were performed at significance level of at least 0.05 as reported for the majority of human biopsy studies (29).

Results

Patient characteristics. Infiltrating ductal breast cancer (IDC) is the most dominant type of breast carcinoma found in the Mexican female population (30). From a total of 116 cases analyzed, 88% (102 biopsies) corresponded to IDC. IDC incidence was identified by standard IHC analyses inspecting hematoxylin-eosin stains for apparent cellular abnormalities (atypias) and cellular mitosis (Fig. 1A). For HER2 positive subtypes, all samples showed HER2 intensity on tumor cell plasma membrane with 3+ score (i.e., >30% of stained cells)

Table I. Clinical characteristics of infiltrating ductal breast carcinoma (IDC) patients.

Patients	Total	Ki67	Her2/		TN	
	n=97	score	TP	HR ⁺		
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Age (years)						
≤45	40	22	11	16	4	9
>45	60	20	12	40	3	5
IDC disease stage						
I	4	8	0	4	0	0
II	36	20	8	24	0	4
III	55	21	13	27	5	10
IV	5	20	2	0	3	0
Tumor size						
T1	3	15	1	2	0	0
T2	32	21	5	20	2	5
T3	30	23	8	16	1	5
T4	34	20	9	16	5	4
Histological grade SBR						
3	7	14	1	6	0	0
4	4	15	0	2	2	0
5	11	9	3	8	0	0
6	20	20	3	15	1	1
7	19	13	7	8	2	2
8	22	8	5	7	3	7
9	18	30	4	11	0	4

TN, triple negative; TP, triple positive; SBR, Scarff-Bloom-Richardson scale. Stage I corresponds to small tumors (<2 cm); stage II corresponds to tumors <5 cm which spread to axillary lymph nodes; stage III corresponds to cancer of any size that has spread to axillary lymph nodes, to lymph nodes near the breastbone or to the chest wall and/or skin; stage IV corresponds to metastatic cancer. The tumor size is based on the size of the tumor and the extent to which it has grown into neighboring breast tissue. The rating scale Scarff-Bloom-Richardson used in histopathological analysis considers the formation of breast tubule formation, nuclear pleomorphism and the number of cells entering mitosis.

(Fig. 1B), whereas the score of all HER2 negative samples was 0 and 1+ (i.e., 100% non-stained cells) (31).

The clinical characteristics of the IDC subtypes are described in Table I. The highest number of IDC patients (57 samples or 56%) corresponded to HER2/HR⁺ followed by 23 samples (22%) of HER2⁺/HR⁺ (triple-positive, TP), 14 samples (14%) of HER2/HR⁻ (triple-negative, TN) and 8 samples (8%) of HER2⁺/HR⁻. The percentages found in the present study for all IDC subtypes correlated with those reported in other clinical studies (32). The TN patients arguably have survival advantages as a result of the absence of HER2 overexpression. However, they lack the benefit of both routinely available targeted therapy and specific biomarkers. It is worth noting that the present prospective study analyzes a small number of IDC samples, as it has been reported for pilot clinical

studies (19), and in contrast to other non-pilot epidemiological studies the IDC sample number is higher (>450 patients) (32); in consequence, in the present study the number of samples analyzed for each IDC subtype was smaller. Therefore, to avoid erroneous interpretations derived from a relative small number of samples, the analyses of the metabolic protein contents and activities were performed without considering the patient's age or menopausal status. Future investigations will be oriented to increase the sample size to further validate the results found in the present study with other analytical methods such as RT-PCR and microarray approaches.

Contents and activity of HIF-1 α glycolytic and mitochondrial proteins in the IDC subtypes. The content of the transcription factor HIF-1 α and its glycolytic targets GLUT1, HK (I and II) and LDH-A of tumor and non-tumor biopsies were normalized against α -tubulin (Fig. 2). The HIF-1 α contents in tumor samples were significantly higher than those in non-tumor biopsies following the Mann-Whitney U test (Table II) and ROC analyses (Fig. 3A). The last test also revealed a cut-off point of 27 (i.e., 27% of the HIF-1 α band intensity respect to the α -tubulin signal) for tumor vs. non tumor samples, where the highest sensibility (>80%) and specificity (>90%) were attained (Table II). These data indicated that, at least, a HIF-1 α band intensity of a 27% is required to ensure that, in the IDC biopsy, <20% of false negatives and 10% of false positives can be found.

The increased HIF-1 α content detected in tumor samples was accompanied by a slight, but non-significant increase in the protein content of its glycolytic target GLUT1. On the contrary, HK (I and II) and LDH-A contents were without change compared to normal breast tissue (Fig. 2). The functional determination of HK and LDH supported the observed western blot analysis. Activity of HK and LDH from tumor biopsies (22 \pm 5 mU/mg protein for total HK; n=23; and 307 \pm 78 mU/mg protein for total LDH; n=23) was similar to those from breast normal tissue (16 \pm 5 mU/mg protein for total HK; n=5; and 474 \pm 196 mU/mg protein for total LDH; n=5).

The contents of HIF-1 α , GLUT1, HKI and LDH-A were similar among the different IDC subtypes (Fig. 4). However, for HKII a significant change, indicated by ANOVA and Scheffé post hoc tests, was determined in HER2⁺/HR⁻ vs. TP, vs. HER2/HR⁻ and vs. TN (Fig. 4; Table III). The ROC for HKII indicated a cut-off of 73.5 with sensitivity and specificity of 86 and 31%, respectively.

For mitochondrial proteins, no apparent changes were observed in the contents of 2OGDH, GA isoforms K and L, and ATP synthase between tumor breast biopsies vs. non-tumor tissue (Fig. 2). On the contrary, COXIV and adenine nucleotide translocase (ANT) levels were significantly higher and lower, respectively, in tumor vs. non-tumor samples by using Mann-Whitney U test (Fig. 2; Table II). However, the ROC tests (Fig. 3A) revealed that only COXIV, but not ANT, was significantly different vs. non-tumor tissue. For this case, the cut-off point was 15 with 100% specificity but low (38%) sensitivity, indicating that COXIV could be considered as a good tumor biomarker but with high probability (>50%) to detect also false positives (Table III). The content of 2OGDH was similar between TP and HER2⁺/HR⁺. On the contrary, in TN samples, the levels of 2OGDH were significantly higher

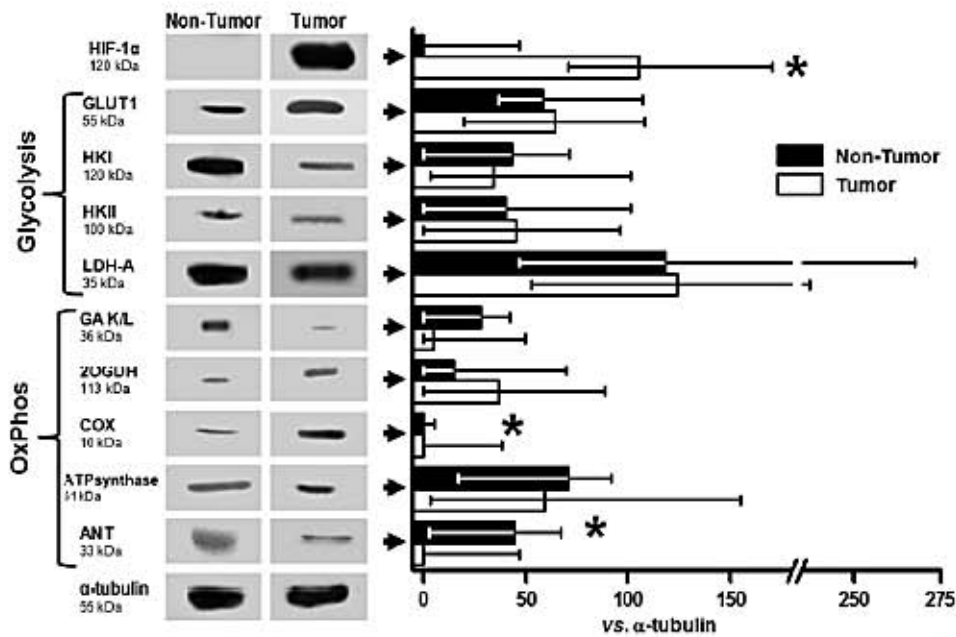


Figure 2. Representative western blotting showing glycolytic and mitochondrial protein contents in tumor and non-tumor breast tissue. The histogram represents the densitometry analysis of the western blotting results, and the values shown are the median \pm the interquartile range; n=102 for tumor biopsies and n=31 for non-tumor biopsies. *P<0.05 by Mann-Whitney U test. HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; GLUT-1, glucose transporter-1; HK, hexokinase; LDH-A, lactate dehydrogenase isoform A; GA K/L, glutaminase isoform kidney or liver; 2OGDH, 2 oxoglutarate dehydrogenase; ANT, adenine nucleotide translocator.

Table II. Statistical analysis revealing significant differences (showed in bold letters) in tumor vs. non-tumor breast tissue samples.

	Protein	Mann-Whitney U test P-value (P<0.01)	ROC analysis		Result vs. non-tumor samples
			AUC	P-value	
Glycolytic	HIF-1 α	<0.001	0.905	0.000	Statistically different
	GLUT1	0.793			Non-statistically different
	HKI	0.578			Non-statistically different
	HKII	0.420			Non-statistically different
	LDH-A	0.874			Non-statistically different
OxPhos	GA	0.698			Non-statistically different
	2OGDH	0.193			Non-statistically different
	ANT	0.004	0.42	0.471	Non-statistically different
	COX	<0.001	0.706	0.001	Statistically different
	ATPsynthase	0.656			Non-statistically different
Canonical	Ki67	<0.001	0.610	0.321	Non-statistically different
	HER2	<0.001	0.825	0.000	Statistically different
	C-MYC	<0.001	0.770	0.000	Statistically different
Oncogenes	HRAS	0.593			Non-statistically different
	KRASs	0.224			Non-statistically different
Metastasis	Vimentin	0.283			Non-statistically different
	E-cadherin	0.871			Non-statistically different
Autophagy	BNIP3	0.008	0.701	0.058	Non-statistically different
	LAMP	0.035	0.700	0.071	Non-statistically different

vs. the pooled subpopulation of the other IDC subtypes (Fig. 4 and Table IV), whereas for HER2⁺/HR⁺ the content of 2OGDH

was lower although non-significantly different vs. TP and HER2⁺/HR⁺ subtypes, by applying ANOVA and Scheffé post

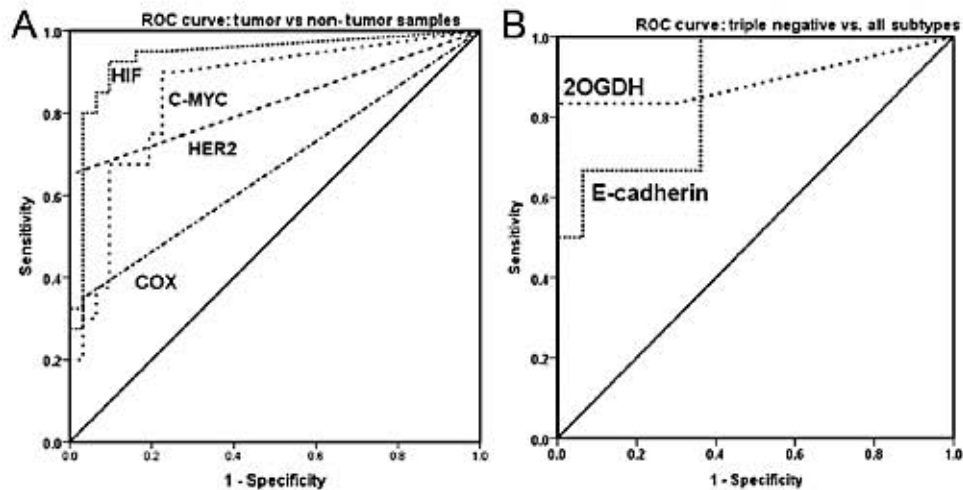


Figure 3. ROC analysis illustrating the performance of several proteins significantly different in (A) tumor vs non-tumor samples and (B) triple negative vs. TP, HER2⁺/HR⁺, and HER2⁺/HR⁻. Sensitivity is related to the true positive samples whereas 1-specificity is related to the false positive samples found in the 102 analyzed IDC samples. This approach reveals that HIF-1 α , C-MYC, HER2 (for TP and HER2⁺/HR⁻) and COX could be considered as predictors of IDC cancer. 2OGDH and E-cadherin could be considered as TN predictors. n=102 for tumor and n=31 for non-tumor biopsies.

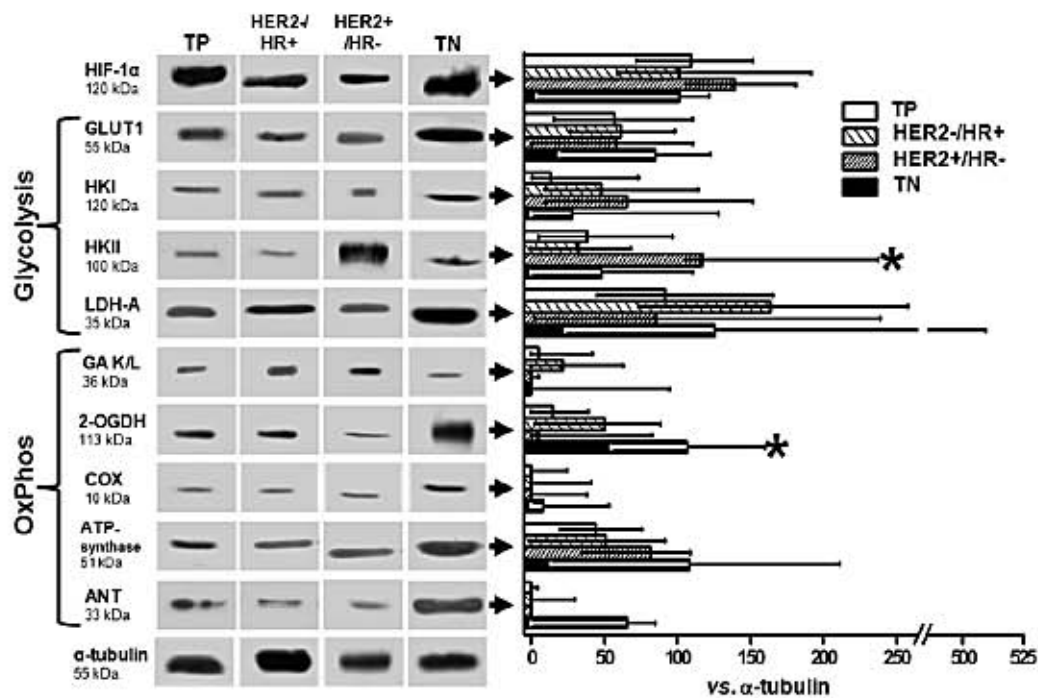


Figure 4. Representative western blotting showing glycolytic and mitochondrial protein contents in different IDC subtypes. The values shown in the histogram represent the median \pm the interquartile range. * $P < 0.05$ by Mann-Whitney U test. TP, triple positive sample (n=23); TN, triple negative sample (n=14); HR⁻/HER2⁺ (n=57); HR⁺/HER2⁺ (n=8). HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; GLUT-1, glucose transport-1; HK, hexokinase; LDH-A, lactate dehydrogenase isoform A; GA K/L, glutaminase isoform kidney or liver; 2OGDH, 2 oxoglutarate dehydrogenase; ANT, adenine nucleotide translocator.

hoc tests (Fig. 4). For 2OGDH, data of cut-off value, sensitivity and specificity (Table V) showed that it is required at least 70% of band intensity (respect to that of tubulin as the loading control) in the biopsy to diminish to 20 and 40% the probability to have false positives or negatives, respectively. Also, a substantial but not significant increase in the ANT content was observed in TN compared to pooled subpopulation of the

other IDC subtypes (Fig. 4), in which the ANT content was similar.

Contents of the proliferation, oncogenes, metastasis and autophagy proteins in IDC subtypes. In tumor breast biopsies, the proliferation protein Ki67, the oncogene c-MYC and the growth factor HER2 (in TP and HER2⁺/HR⁻ subtypes) were

Table III. ROC parameters revealing cut-off points, sensitivity and specificity percentages of different biomarkers in tumor vs. non-tumor samples.

Protein	AUC	P-value	Cut-off	Sensitivity %	Specificity %	RR	PPV %	NPV %
HIF1- α	0.905	0.000	0.5	88.7	77.4	2.95	92.5	68.6
			4.5	87.6	83.9	2.88	93.4	67.6
			27.05	85.6	90.3	2.79	95.4	65.9
HER2	0.825	0.000	3.5	65	100	3.21	100	69
			13.8	60	100	2.94	100	66
			26.2	55	100	2.72	100	63.3
C-MYC	0.770	0.000	0.35	76.7	74.2	1.88	89.6	52.27
			2.1	74.4	77.4	1.85	90.5	51.1
			30.78	61.1	80.6	1.59	90.3	43.1
COX	0.706	0.001	0.5	43.3	96.8	1.51	97.7	35.3
			15.04	38.1	100	1.53	100	34.8

AUC, area under ROC; RR, relative risk; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Table IV. Statistical analysis revealing significant differences among IDC subtypes.

Protein	1st Statistical analysis	P-value	2nd Statistical analysis	P-value	Statistically different between subtypes
HKII	ANOVA test	0.024	Scheffé post hoc test	0.046	Her 2 vs. TP
			Scheffé post hoc test	0.033	Her 2 vs. HR
2OGDH	ANOVA test	0.001	Scheffé post hoc test	0.001	TN vs. TP
			Scheffé post hoc test	0.008	TN vs. HR
			Scheffé post hoc test	0.045	TN vs. Her 2
HER2	ANOVA test	<0.001	Scheffé post hoc test	0.025	Her2 vs. TP
			Scheffé post hoc test	0.00	Her2 vs. HR
			Scheffé post hoc test	0.003	Her2 vs. TN
KRAS	Kruskal-Wallis test	0.023	Mann Whitney U corrected by the Holm-Bonferroni method	No differences	
E-cadherin	Kruskal-Wallis test	0.001	Mann Whitney U corrected by the Holm-Bonferroni method	0.000249	TN vs. HR
				0.009	TN vs. TP

Her2 (Her2 positive), Her2⁺/HR⁺; HR, Her2/HR⁺ (hormone receptor positive); TP, triple positive; TN, triple negative.

Table V. ROC parameters revealing cut-off points, sensitivity and specificity percentages of 2OGDH and E-cadherin in triple negative samples.

Protein	AUC	P-value	Cut-off	Sensitivity %	Specificity %
2OGDH	0.869	0.004	7.95	100	23.4
			43.45	100	40.4
			76.23	83.3	64.8
E-cadherin	0.892	0.002	2.8	83.3	70.2
			36.9	83.3	85.1
			102.3	66.7	100

AUC, area under ROC.

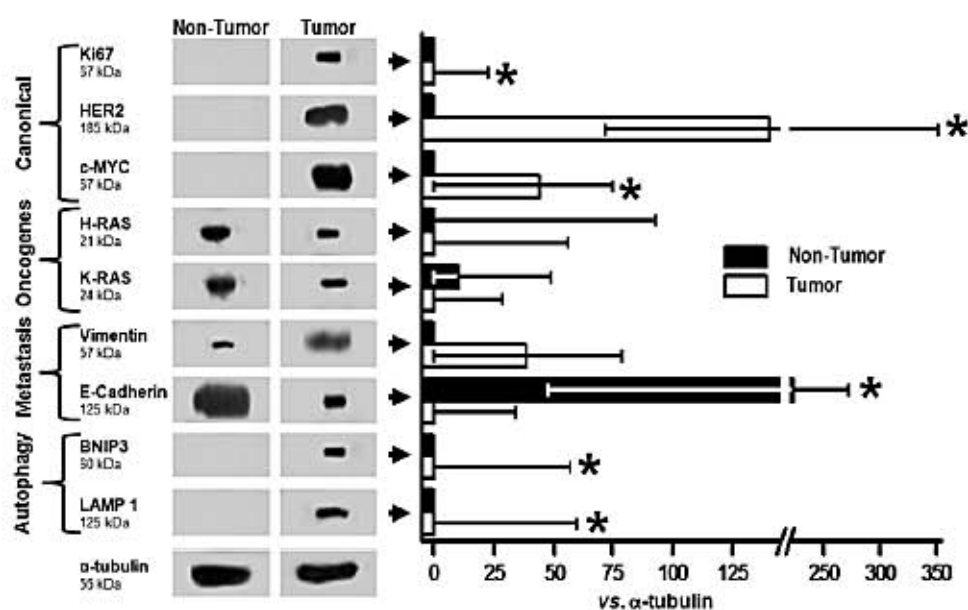


Figure 5 Representative western blotting showing proliferation, oncogenes, metastatic and autophagy proteins in tumor vs. non-tumor cells. The values shown in the histogram represent the median \pm the interquartile range. *P<0.05 by ANOVA test. For tumor samples: Ki67 (n=94); HER2 (n=78); c-MYC (n=95); H-RAS (n=94); K-RAS (n=36); vimentin (n=68); E-cadherin (n=61); BNIP3 (n=68); and LAMP1 (n=60). For non-tumor biopsies: Ki67, HER2, c-MYC and K-RAS (n=31); H-RAS (n=15); vimentin and E-cadherin (n=26); BNIP3 (n=13); LAMP1 (n=19).

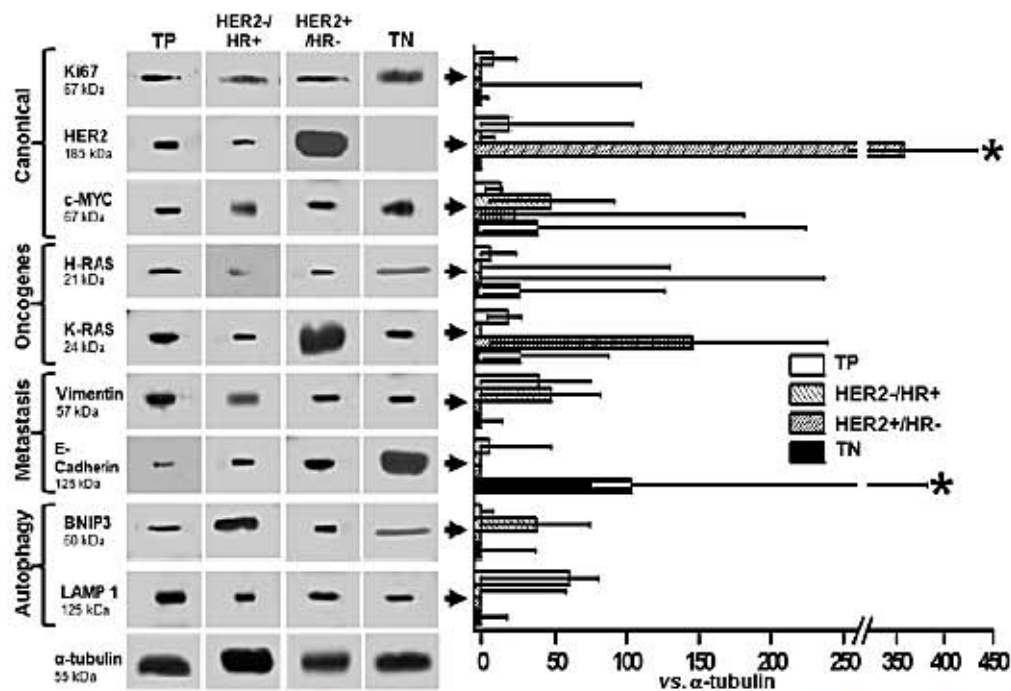


Figure 6. Representative western blotting showing proliferation, oncogenes, metastatic and autophagy proteins in IDC subtypes. The values shown in the histogram represent the median \pm the interquartile range. *P<0.05 by ANOVA test. For TP, H-RAS, K-RAS, Ki67 and c-MYC (n=20-23); HER2 (n=19); vimentin, E-cadherin and BNIP3 (n=13); LAMP1 (n=11). For TN, H-RAS, K-RAS and c-MYC, (n=13); Ki67 (n=12); HER2, vimentin, BNIP3 and LAMP1 (n=7-8); E-cadherin (n=6). For HR⁺/HER2⁻, Ki67, c-MYC, H-RAS and K-RAS (n=53-54); HER2 (n=48); vimentin, E-cadherin, BNIP3 and LAMP1 (n=39-43). For HR⁻/HER2⁺, Ki67, c-MYC and LAMP1 (n=8); HER2, vimentin, H-RAS, K-RAS and BNIP3 (n=5); E-cadherin (n=4).

fully apparent, whereas no presence of these proteins was detected in normal breast tissue (Fig. 5), in agreement with previous reports (33). The Mann-Withney U test (Table II)

showed that Ki67, c-MYC and HER2 were significantly different in TP and HER2⁺/HR⁻ vs. normal biopsies. ROC analysis showed that HER2 and c-MYC exhibited higher

area under curve (AUC) than Ki67 (Table III) indicating that HER2 and c-MYC were indeed significantly different in TP and HER2⁺/HR⁻ vs. normal biopsies (Fig. 3A). For these two proteins, similar cut-off points, sensitivity and specificity were determined (Table III), indicating that only 26-30% of protein signal (respect to the tubulin content) in TP and HER2⁺/HR⁻ samples is required to achieve: i) high probability (80-100%) to discard negative diagnosis (i.e., values lower than 26-30% indicate the absolute certainty of absence of disease), although ii) moderate probability (55-60%) for true positive identification (vs. false positive, i.e., the sample derived from a non-cancer patient having some other health problem).

HER2 presence (TP, HER2⁺/HR⁻) or absence (TN, HER2⁻/HR⁺), as well as HR positivity or negativity, was confirmed for the majority of the samples by western blotting (Fig. 6), further validating the standard IHC clinical approach (Fig. 1B; Table I) currently used at the Instituto Nacional de Cancerología de México. However, 12 out of 71 HER2⁻ samples (17%), and 3 out of 22 HR⁻ samples (14%), as indicated by the IHC assay, yielded positive signal by western blot assay (data not shown). These results clearly indicated that additional support for breast cancer subtype diagnosis such as western blotting should be routinely implemented to decrease the emergence of false negatives and hence to establish the appropriate therapy.

Surprisingly, H- and K-RAS proteins were also found in normal tissue (Fig. 5). This result could not be confirmed by literature data regarding the presence or absence of H- or K-RAS in normal cells. Assessment of Ki67, oncogenes and transcription factor contents among the different IDC subtypes by the Kruskal-Wallis test only revealed significant difference for the HER2 content in TP vs. HER2⁺/HR⁻. However, the Holm-Bonferroni/Mann-Whitney U corrected test showed no significant difference for such datasets.

Proteins involved in the metastatic response of tumor cells such as vimentin and E-cadherin were determined in tumor vs. non-tumor samples to assess the migration and invasion profiles of tumor biopsies. Both proteins were not statistically different between assayed groups (Fig. 5; Table II). Although, both BNIP3 (a key regulator of hypoxia-induced autophagy) as well as LAMP1 (lysosome biogenesis-induced autophagy) were significantly higher in IDC samples vs. non-tumor samples (Fig. 5), according to the Mann-Whitney test, ROC analysis showed no significant differences. Among IDC subtypes, metastasis and autophagy protein contents were similar, except for TN whose E-cadherin content was significantly higher (Fig. 3B; Table IV) to those determined for HER2⁺/HR⁻ and TP. In this regard, an E-cadherin cut-off value of 3-37 was determined (Table V), indicating that this is the required protein expression (respect to the tubulin signal) to reach a high probability (80-100%) to identify true positive samples and discard false positive and false negative results.

Identification of new metabolic biomarkers in IDC subtypes. Identification of significant differences among the contents of all proteins assayed (metabolic proteins, oncogenes, transcription factors, as well as metastatic and autophagic proteins) between tumor and non-tumor tissue was determined by using the stringent non-parametric statistical Mann-Whitney U test

validated by the ROC graphs (Fig. 3A; Tables II, III and V). With these rigorous statistical analyses, significant differences between non-tumor and tumor samples were observed for HIF-1 α > HER2 > c-MYC > COXIV (Fig. 3A; Table II), whereas non-significant changes were detected for the rest of the mitochondrial and glycolytic proteins analyzed. In contrast, for the identification of significant differences on the proteins assayed among the different IDC subtypes, non-parametric statistical Kruskal-Wallis test and the parametric ANOVA validated by the ROC graphs (Figs. 1B and 3B; Tables IV and V) were used. These last analyses showed significant changes in 2OGDH and E-cadherin protein contents in TN vs. TP, HER2⁺/HR⁻ and HER2⁻/HR⁺, thus, providing a differentiated and selective panel of biomarkers constituted by HIF-1 α > c-MYC > 2OGDH > E-cadherin for TN subtype IDC biopsies.

Discussion

Accurate and early detection, and successful treatment of cancer are at present still unsolved challenging clinical problems. This situation most likely derives from the variety of genetic and biochemical strategies a tumor is able to develop to survive under a wide range of environmental stresses such as hypoxia and normoxia, hypoglycemia and normoglycemia, and immune host response. This cellular robustness allows a tumor to efficiently deal with the inhibition of a single kinase, transcription factor or oncogene, as usually thought, designed, and applied in the treatment of cancer in experimental animal models (9,34). Under this context, it is clearly understandable and expected the eventual and frequent emergence of tumor chemo-resistance from these mono-therapy regimes.

Tumor protective mechanisms include the activation of multiple and redundant kinases, transcription factors and oncogenes that readily circumvent the initial therapy directed to a single target (34). Therefore, as a suitable alternative strategy, multisite or combinatory therapy should be considered (9,34,35). Some clinical treatments empirically have employed multisite therapy against well-known overexpressed proteins in tumor cells with moderately higher success rates.

In breast tumor biopsies two overexpressed proteins (HER2 and HR) have frequently been used as biomarkers (36,37). Therefore, a clinical combination treatment of breast cancer with tamoxifen against HR plus trastuzumab against HER2 is commonly used. However, i) positive responses against HER2 or HER2⁺/HR⁺ treatment are not always obtained. For instance, trastuzumab alone or combined with taxol or cisplatin or 5-fluorouracil plus surgery plus hormone therapy showed no effect in 50-75% of cases with metastatic breast cancer (reviewed in ref. 9); ii) the content of this marker is low (15-20%) compared with other highly expressed proteins such as mTOR (40%) and cyclin D1 (50%) in HER2-positive cancer patients (36,38); and iii) HER2 and HR predictive power severely diminishes when they are individually analyzed (39).

It has been demonstrated that the HER2 and HR protein contents change over time affecting the selected clinical treatment (40). One study revealed a severe cancer recurrence after anti-HER2 or anti-HR treatment in more than 1000 women diagnosed with early-stage breast cancer. A puzzling observa-

tion is that tumor recurrence correlates with a diminution in the levels of HER2 (33%) and HR (15%) contents in all biopsies analyzed compared with the initial diagnoses validated by a high HER2 and HR overexpression (40). In other breast cancer patients the status of the HER2 receptor changes from positive to negative or vice versa (40). The inconsistencies described for these canonical markers have led to the search for other molecular biomarkers which may reliably improve cancer diagnosis and prognosis.

HIF-1 α as a suitable cancer biomarker in breast cancer. High HIF-1 α content and glycolysis are indicative of increased malignancy and poor prognosis (41). Therefore, HIF-1 α has been proposed as a biomarker for different metastatic carcinomas (colon, breast, gastric, lung, skin, prostate, ovarian, pancreatic, brain, glioblastoma and renal) (reviewed in refs. 42,43). In all these studies, the HIF-1 α content in cancer samples, solely evaluated by IHC, showed an increase of 30-83% vs. normal tissue (43). Our present data using western blot analyses revealed a substantial increment of HIF-1 α in all cancer subtypes compared with their respective normal tissue (Fig. 2), indicating that this transcription factor can be a reliable biomarker of breast cancer biopsies. The high sensitivity and specificity of the HIF-1 α detection by western blotting (i.e., the antibody selectively detects a target protein in a mixture of several thousand different proteins coming from heterogeneous tissue) compared to the IHC assay makes the former the method of choice for routine clinical use, despite the longer processing time for western blotting (days) than for IHC.

On the other hand, HIF-1 α functional status has not been systematically evaluated to establish a correlation between protein content and transcriptional activity (42,44). In the present study the transcriptional functionality of HIF-1 α was assessed in all IDC biopsies. The data indicated that although a substantial increment in the HIF-1 α levels was observed compared to normal tissue (Fig. 1), all IDC subtypes maintain similar GLUT1, HKII and LDH-A contents and activities to those determined in non-tumor samples. Unfortunately, there are no studies in which the content and activity of these glycolytic proteins have been determined, except for LDH whose activity, determined here, was within the range reported for breast cancer patients (45). Nevertheless, the present data indicated that HIF-1 α , but not the glycolytic proteins can be a striking reliable marker of Mexican breast carcinoma as has been already suggested for human squamous cancer cervix epithelium (46). In other studies performed in breast tumor perinecrotic area and cervical cancer a strong correlation between HIF-1 α and GLUT1 has been found (44,46).

Regarding mitochondrial OxPhos proteins, only the ANT content was detected to be significantly decreased in the cancer biopsies. In PC12 tumor cells, short-term hypoxia (30 min) downregulates the transcription of genes encoding mitochondrial complex I/NADH dehydrogenase as an adaptive response mechanism for adjusting the OxPhos rate to the low O₂ availability (47). A putative regulatory site in the ANT gene for HIF-1 α has not been reported.

Clinical implications in the search of new biomarkers for triple negative breast cancer. Epidemiological studies of

breast cancer in the Mexican female population revealed that approximately 20% of patients develop the TN phenotype (36). Unfortunately until now, the treatment with anti-hormone drugs (tamoxifen) or monoclonal anti-HER2 (trastuzumab) has been ineffective in the majority of these diagnosed cases (48). Therefore, it appears relevant to develop research focused on the identification of specific TN biomarkers. Recently it has been documented that the MAGI3-AKT3 protein may fulfill such as role (49). However, its content is only overexpressed in a scarce number of TN patients (7% or 5/72), disabling its use for all TN patients (49). In the present study, significant changes in some mitochondrial (2OGDH) and metastatic (E-cadherin) proteins were observed in TN samples vs. other IDC subtypes (Figs. 4 and 6). Therefore, an alternative therapeutic strategy may be the use of combined treatment including the usual first line of treatment (tamoxifen or 5-fluorouracil or doxorubicin or cyclophosphamide or trastuzumab) plus some mitochondrially-targeted inhibitor (casiopaina II-gly and vitamin E analogues) (50,51).

In conclusion, all analyzed breast cancer subtypes exhibited high HIF-1 α levels. Therefore, anti-HIF therapy (i.e., echinomycin and bortezomib) combined with canonical drugs (and/or energy metabolism drugs for TN cases) could be a promising alternative treatment against breast cancer. In this regard, it has been documented that HIF-1 α overexpression in cancer cells is linked to a substantial augment in EGFR levels. However, mono-therapy with cetuximab, a monoclonal anti-EGFR antibody or gefitinib yields low efficacy (52), suggesting that combinatory therapy with canonical drugs plus anti-HIF1 α therapy (plus energy inhibitors for TN cases) may be required for effective tumor abolishment.

Acknowledgements

The present study was partially supported by grants from CONACyT-México (nos. 80534, 107183,123636 and 180322) and the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (no. PICS08-5) to S.R.E., R.M.S. and A.M.H. S.C.P.V. was supported by a CONACyT-México fellowship (no. 269212). The present study is part of the PhD thesis of S.C.P.V. in the Doctorado en Ciencias Biomédicas program at the Universidad Nacional Autónoma de México. The authors thank Dr I. Pérez-Neri for his help in the use of the different statistical methods.

References

1. Rakha EA and Ellis IO: Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology* 41: 40-47, 2009.
2. Leone F, Perissinotto E, Cavalloni G, *et al*: Expression of the c-ErbB-2/HER2 proto-oncogene in normal hematopoietic cells. *J Leukoc Biol* 74: 593-601, 2003.
3. McInnes KJ, Andersson TC, Simonyté K, Söderström I, Mattsson C, Seckl JR and Olsson T: Association of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I expression and activity with estrogen receptor β in adipose tissue from postmenopausal women. *Menopause* 19: 1347-1352, 2012.
4. Regil-Hallmann RS, Ibarra-del-Río M and Flores-Hernández L: Correlación citohistológica en el Instituto Nacional de Cancerología en el año 2006. *Patología* 46: 309-314, 2008 (In Spanish).
5. Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, *et al*: Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res* 15: 7381-7388, 2009.
6. Vu T and Claret FX: Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol* 2: 62, 2012.

7. González-Angulo AM, Morales-Vasquez F and Hortobagyi GN: Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 608: 1-22, 2007.
8. Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.
9. Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Quezada H and Westerhoff HV: Metabolic control analysis indicates a change of strategy in the treatment of cancer. *Mitochondrion* 10: 626-639, 2010.
10. Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Gallardo-Pérez JC, *et al*: Multi-biomarker pattern for tumor identification and prognosis. *J Cell Biochem* 112: 2703-2715, 2011.
11. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A and Saavedra E: Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274: 1393-1418, 2007.
12. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A and Gallardo-Pérez JC: The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors* 35: 209-225, 2009.
13. Amon LM, Pitteri SJ, Li CI, *et al*: Concordant release of glycolysis proteins into the plasma preceding a diagnosis of ER⁺ breast cancer. *Cancer Res* 72: 1935-1942, 2012.
14. Yeung SJ, Pan J and Lee MH: Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis: the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 65: 3981-3999, 2008.
15. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S and Moreno-Sánchez R: HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 9: 1084-1101, 2009.
16. Gillies RJ and Gatenby RA: Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr* 39: 251-257, 2007.
17. Xueguan L, Xiaoshen W, Yongsheng Z, Chaosu H, Chunying S and Yan F: Hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor expression are associated with a poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma receiving radiotherapy with carbogen and nicotinamide. *Clin Oncol* 20: 606-612, 2008.
18. Brahim-Horn M and Pouyssegur J: HIF at a glance. *J Cell Sci* 122: 1055-1057, 2009.
19. Leon AC, Davis LL and Kraemer HC: The role and interpretation of pilot studies in clinical research. *J Psychiatr Res* 45: 626-629, 2011.
20. Bartlett JE II, Kotrlík JW and Higgins CC: Organizational research: Determining appropriate sample size in survey. *Off Syst Res J* 19: 43-50, 2001.
21. Ruiz-Godoy L, Meneses-García A, Suárez-Roa L, Enríquez V, Lechuga-Rojas R and Reyes-Lira E: Organization of a tumor bank: the experience of the National Cancer Institute of Mexico. *Pathobiology* 77: 147-154, 2010.
22. Holland R, Peterse JL, Millis RR, Eusebi V, Faverly D, van de Vijver MJ and Zafrani B: Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol* 11: 167-180, 1994.
23. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, *et al*: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101: 736-750, 2009.
24. Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, *et al*: Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1744-1751, 2010.
25. Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M and Moreno-Sánchez R: Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 273: 1975-1988, 2006.
26. Lilliefors HW: On the Kolmogorov-Smirnov Test for normality with mean and variance unknown. *J Am Statistical Assoc* 62: 399-402, 1967.
27. Young DA, Zerbe GO and Hay WW Jr: Fieller's theorem, Scheffé simultaneous confidence intervals, and ratios of parameters of linear and nonlinear mixed-effects models. *Biometrics* 53: 838-847, 1997.
28. Krauth J: The interpretation of significance tests for independent and dependent samples. *J Neurosci Methods* 9: 269-281, 1983.
29. Abba MC, Lacunza E, Butti M and Aldaz CM: Breast cancer biomarker discovery in the functional genomic age: a systematic review of 42 gene expression signatures. *Biomark Insights* 5: 103-118, 2010.
30. Salazar EL, Calzada L and Pedron N: Infiltrating ductal/lobular carcinoma: an evaluation of prognostic factors in primary breast cancer. *Arch AIDS Res* 10: 73-82, 1996.
31. Gown AM: Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 21: S8-S15, 2008.
32. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, *et al*: Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295: 2492-2502, 2006.
33. Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, *et al*: Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer* 93: 162-171, 2001.
34. Xu AM and Huang PH: Receptor tyrosine kinase coactivation networks in cancer. *Cancer Res* 70: 3857-3860, 2010.
35. Al-Lazikani B, Banerji U and Workman P: Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat Biotechnol* 30: 679-692, 2012.
36. Pérez-Sánchez VM, Vela-Chávez TA and Mora-Tiscareño MA: Diagnóstico histopatológico y factores pronósticos en cáncer infiltrante de glándula mamaria. *Cancerología* 3: 7-17, 2008 (In Spanish).
37. Maughan KL, Lutterbie MA and Ham PS: Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician* 81: 1339-1346, 2010.
38. Weigel MT and Dowsett M: Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 17: R245-R262, 2010.
39. Lari S and Kuerer H: Biological markers in DCIS and risk of breast recurrence: a systematic review. *J Cancer* 2: 232-261, 2011.
40. Lindström LS, Karlsson E, Wilking UM, *et al*: Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol* 30: 2601-2608, 2012.
41. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T and Sonveux P: Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2: 49, 2011.
42. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ and Harris AL: The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157: 411-421, 2000.
43. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *et al*: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59: 5830-5835, 1999.
44. Vleugel MM, Greijer AE, van der Wall E and van Diest PJ: Mutation analysis of the HIF-1 α oxygen-dependent degradation domain in invasive breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 163: 168-172, 2005.
45. Balinsky D, Platz CE and Lewis JW: Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res* 43: 5895-5901, 1983.
46. Lee WY, Huang SC, Hsu KF, Tzeng CC and Shen WL: Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence. *Gynecol Oncol* 108: 377-384, 2008.
47. Piruat JI and López-Barneo J: Oxygen tension regulates mitochondrial DNA-encoded complex I gene expression. *J Biol Chem* 280: 42676-42684, 2005.
48. Rexer BN and Arteaga CL: Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications. *Crit Rev Oncog* 17: 1-16, 2012.
49. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, *et al*: Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 486: 405-409, 2012.
50. Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L and Moreno-Sánchez R: Targeting of cancer energy metabolism. *Mol Nutr Food Res* 53: 29-48, 2009.
51. Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Dong LF, Akporiaye ET, Neuzil J, Ralph SJ and Moreno-Sánchez R: Molecular mechanism for the selective impairment of cancer mitochondrial function by a mitochondrially targeted vitamin E analogue. *Biochim Biophys Acta* 1817: 1597-1607, 2012.
52. el Guerrab A, Zegrou R, Nemlin CC, *et al*: Differential impact of EGFR-targeted therapies on hypoxia responses: implications for treatment sensitivity in triple-negative metastatic breast cancer. *PLoS One* 6: e25080, 2011.

7. González-Angulo AM, Morales-Vasquez F and Hortobagyi GN: Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 608: 1-22, 2007.
8. Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.
9. Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Quezada H and Westerhoff HV: Metabolic control analysis indicates a change of strategy in the treatment of cancer. *Mitochondrion* 10: 626-639, 2010.
10. Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Gallardo-Pérez JC, *et al*: Multi-biomarker pattern for tumor identification and prognosis. *J Cell Biochem* 112: 2703-2715, 2011.
11. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A and Saavedra E: Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274: 1393-1418, 2007.
12. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A and Gallardo-Pérez JC: The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors* 35: 209-225, 2009.
13. Amon LM, Pitteri SJ, Li CI, *et al*: Concordant release of glycolysis proteins into the plasma preceding a diagnosis of ER+ breast cancer. *Cancer Res* 72: 1935-1942, 2012.
14. Yeung SJ, Pan J and Lee MH: Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis: the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 65: 3981-3999, 2008.
15. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S and Moreno-Sánchez R: HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 9: 1084-1101, 2009.
16. Gillies RJ and Gatenby RA: Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr* 39: 251-257, 2007.
17. Xueguan L, Xiaoshen W, Yongsheng Z, Chaosu H, Chunying S and Yan F: Hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor expression are associated with a poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma receiving radiotherapy with carbogen and nicotinamide. *Clin Oncol* 20: 606-612, 2008.
18. Brahimi-Horn M and Pouyssegur J: HIF at a glance. *J Cell Sci* 122: 1055-1057, 2009.
19. Leon AC, Davis LL and Kraemer HC: The role and interpretation of pilot studies in clinical research. *J Psychiatr Res* 45: 626-629, 2011.
20. Bartlett JE II, Kotrlík JW and Higgins CC: Organizational research: Determining appropriate sample size in survey. *Off Syst Res J* 19: 43-50, 2001.
21. Ruiz-Godoy L, Meneses-García A, Suárez-Roa L, Enriquez V, Lechuga-Rojas R and Reyes-Lira E: Organization of a tumor bank: the experience of the National Cancer Institute of Mexico. *Pathobiology* 77: 147-154, 2010.
22. Holland R, Peterse JL, Millis RR, Eusebi V, Faverly D, van de Vijver MJ and Zafrani B: Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol* 11: 167-180, 1994.
23. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, *et al*: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101: 756-759, 2009.
24. Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, *et al*: Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1744-1751, 2010.
25. Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M and Moreno-Sánchez R: Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 273: 1975-1988, 2006.
26. Lilliefors HW: On the Kolmogorov-Smirnov Test for normality with mean and variance unknown. *J Am Statistical Assoc* 62: 399-402, 1967.
27. Young DA, Zerbe GO and Hay WW Jr: Fieller's theorem, Scheffé simultaneous confidence intervals, and ratios of parameters of linear and nonlinear mixed-effects models. *Biometrics* 53: 838-847, 1997.
28. Krauth J: The interpretation of significance tests for independent and dependent samples. *J Neurosci Methods* 9: 269-281, 1983.
29. Abba MC, Lacunza E, Butti M and Aldaz CM: Breast cancer biomarker discovery in the functional genomic age: a systematic review of 42 gene expression signatures. *Biomark Insights* 5: 103-118, 2010.
30. Salazar EL, Calzada L and Pedron N: Infiltrating ductal/lobular carcinoma: an evaluation of prognostic factors in primary breast cancer. *Arch AIDS Res* 10: 73-82, 1996.
31. Gown AM: Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 21: S8-S15, 2008.
32. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, *et al*: Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295: 2492-2502, 2006.
33. Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, *et al*: Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer* 93: 162-171, 2001.
34. Xu AM and Huang PH: Receptor tyrosine kinase coactivation networks in cancer. *Cancer Res* 70: 3857-3860, 2010.
35. Al-Lazikani B, Banerji U and Workman P: Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat Biotechnol* 30: 679-692, 2012.
36. Pérez-Sánchez VM, Vela-Chávez TA and Mora-Tiscareño MA: Diagnóstico histopatológico y factores pronósticos en cáncer infiltrante de glándula mamaria. *Cancerología* 3: 7-17, 2008 (In Spanish).
37. Maughan KL, Lutterbie MA and Ham PS: Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician* 81: 1339-1346, 2010.
38. Weigel MT and Dowsett M: Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 17: R245-R262, 2010.
39. Lari S and Kuerer H: Biological markers in DCIS and risk of breast recurrence: a systematic review. *J Cancer* 2: 232-261, 2011.
40. Lindström LS, Karlsson E, Wilking UM, *et al*: Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol* 30: 2601-2608, 2012.
41. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T and Sonveaux P: Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2: 49, 2011.
42. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratsell PJ and Harris AL: The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157: 411-421, 2000.
43. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *et al*: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59: 5830-5835, 1999.
44. Vleugel MM, Greijer AE, van der Wall E and van Diest PJ: Mutation analysis of the HIF-1 α oxygen-dependent degradation domain in invasive breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 163: 168-172, 2005.
45. Balinsky D, Platz CE and Lewis JW: Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res* 43: 5895-5901, 1983.
46. Lee WY, Huang SC, Hsu KF, Tseng CC and Shen WL: Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence. *Gynecol Oncol* 108: 377-384, 2008.
47. Piruat JI and López-Barneo J: Oxygen tension regulates mitochondrial DNA-encoded complex I gene expression. *J Biol Chem* 280: 42676-42684, 2005.
48. Rexer BN and Arteaga CL: Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications. *Crit Rev Oncog* 17: 1-16, 2012.
49. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, *et al*: Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 486: 405-409, 2012.
50. Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L and Moreno-Sánchez R: Targeting of cancer energy metabolism. *Mol Nutr Food Res* 53: 29-48, 2009.
51. Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Dong LF, Akporiaye ET, Neuzil J, Ralph SJ and Moreno-Sánchez R: Molecular mechanism for the selective impairment of cancer mitochondrial function by a mitochondrially targeted vitamin E analogue. *Biochim Biophys Acta* 1817: 1597-1607, 2012.
52. el Guerrab A, Zegrour R, Nemlin CC, *et al*: Differential impact of EGFR-targeted therapies on hypoxia responses: implications for treatment sensitivity in triple-negative metastatic breast cancer. *PLoS One* 6: e25080, 2011.

4 Discusión

En el primer apartado de esta tesis se mostró que la combinación de un perfil de biomarcadores involucrados en diferentes procesos celulares (factores de transcripción, proteínas glucolíticas, proteínas mitocondriales, oncogenes y proteínas de migración) puede ofrecer un panorama más amplio para la clasificación del CaMa [Pacheco-Velázquez *et al.*, 2014]. Cabe aclarar que al ser un estudio piloto, para el cálculo del tamaño de la muestra se empleó el estadístico de Cochran, el cual nos permitió determinar el número mínimo (≥ 96) de muestras para hacer el análisis y las comparaciones entre las biopsias tumorales y el tejido no tumoral así como realizar las comparaciones entre los subtipos [Charles *et al.*, 2009].

Las pruebas estadísticas para determinar la normalidad (Kolmogórov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene) dentro de una muestra nos permitieron identificar el enfoque de los análisis posteriores [Young *et al.*, 1977; Henderson *et al.*, 2006; Shapiro *et al.*, 1965; Hines *et al.*, 2000]. Dada la heterogeneidad de las muestras, un análisis empleando pruebas estadísticas no paramétricas fue la opción que nos permitió obtener las mejores significancias [Vickers *et al.*, 2005].

Para la comparación entre las muestras tumorales y el tejido no tumoral se empleó la prueba U Mann-Whitney (la cual es el homólogo no paramétrico de la prueba T de Student) Mann-Whitney, 1947; [Vickers *et al.*, 2005]. Mientras que para la comparación entre los 4 subtipos tumorales se empleó el análisis de varianza (ANOVA) [Shine 1971, Hartman 1974] y la prueba de Kruskal Wallis [Kruskal 1952; Breslow 1970]. Posteriormente, se empleó la prueba de Dunnet como prueba post hoc para identificar los subtipos tumorales que presentaban diferencias en el contenido de proteína de las enzimas analizadas [Dunnet 1955, Dimitrienko 2006].

Las proteínas que tuvieron diferencias fueron seleccionadas posteriormente para realizar el análisis de curvas ROC [Hanley 1982, Zweig 1993; Perkins 2011,]. Este análisis permite seleccionar un punto de corte de una variable que permita distinguir dentro de una población a individuos enfermos de sanos. Cuando se somete un nuevo biomarcador a validación, es necesario que este biomarcador pueda discernir con eficacia los verdaderos positivos (sensibilidad) de un falso positivo (especificidad) a partir de un punto de corte (i.e. el punto de corte es un valor asignado para una característica. Un biomarcador se considera eficaz cuando a valores bajos de este se pueda discernir individuos enfermos con sensibilidades y especificidades altas.

Cabe aclarar que al homogenizar toda la muestra se incluye un porcentaje de tejido no tumoral. En este sentido, la cantidad de tejido tumoral superó el 80% en todas las muestras. Sin embargo en estudios más rigurosos se debe discernir entre estos dos tipos de tejido.

Este trabajo aportó información relacionada al empleo de una firma de biomarcadores en carcinoma mamario como una propuesta para la combinación de varios marcadores biológicos que involucren procesos como; la angiogénesis, la proliferación, la metástasis y el metabolismo energético [Rodríguez-Enríquez et al., 2011]. Esta firma global, incluyendo HIF-1 α , y algunos de sus blancos glucolíticos, en combinación con los biomarcadores canónicos pueden ofrecer una mejor alternativa para: 1) la identificación de presencia de células cancerosas; 2) el pronóstico del desarrollo del cáncer; 3) la detección de blancos antineoplásicos contra células tumorales y, 4) la evaluación de la sobrevida ante un tratamiento. Esto con la intención de apoyar en las decisiones clínicas considerando un panorama más amplio de las vías que están involucradas en el desarrollo del fenotipo tumoral.

Finalmente este trabajo nos dio la pauta para proponer el siguiente estudio. El aumento de la enzima 2OGDH en el subtipo TN, al ser una enzima clave en la regulación del ciclo de Krebs y por lo tanto del metabolismo energético tumoral, nos permite proponer una estrategia terapéutica para este subtipo de cáncer. La 2OGDH sintetiza succinil coenzima-A a partir de α -cetoglutarato. Este complejo enzimático está regulado finamente por varios metabolitos, entre ellos el calcio, el magnesio y la relación ATP/ADP. La reacción que cataliza es de las pocas reacciones irreversibles dentro del ciclo de Krebs (con un ΔG° de -33.5 kJ/mol), por lo que se propone como uno de los principales puntos de control [Tretter et al., 2005]. Entonces, un aumento en el contenido de proteína de este complejo enzimático en el carcinoma mamario subtipo TN podría sugerir un aumento en su metabolismo mitocondrial.

5. Conclusiones

- Para el carcinoma mamario ductal infiltrante las proteínas HIF-1 α + COXIV + C-MYC (+ HER2 para el subtipo HER2 positivo) pueden ser empleados como biomarcadores diagnóstico
- El perfil de proteínas HIF-1 α + C-MYC + 2OGDH + E-cadherina pueden emplearse como biomarcadores para el pronóstico del carcinoma mamario ductal infiltrante subtipo triple negativo.

Capítulo 2. Análisis del metabolismo energético en carcinoma mamario triple negativo*

* Este artículo se encuentra en preparación y se pretende enviar a una revista con un factor de impacto mayor a 3.

1 Introducción

1.1 Epidemiología del carcinoma ductal mamario triple negativo

El carcinoma mamario subtipo TN ha cobrado un interés reciente dado que al tratarse de una enfermedad heterogénea, la ausencia de un biomarcador específico limita las estrategias de tratamiento y disminuye la sobrevida. [Lehmann *et al.*, 2011]. Como se menciona en el primer capítulo de esta tesis el subtipo TN carece de la expresión del receptor RE, RP y HER2, además tiene una mayor prevalencia en la población hispana y afro-americana que en la población caucásica (Tabla 1). Este subtipo consiste de tumores más agresivos que presentan un mayor número de metástasis distantes (hacia hígado, pulmón y cerebro) en comparación con los otros subtipos; además, presenta recurrencias tempranas y la sobrevida general disminuye (*i.e.* la sobrevida puede ser menor a 4 años) [Dent *et al.*, 2007]. Los factores de riesgo que se asocian a este subtipo incluyen la obesidad, la post-menopausia y un número de partos mayor a tres [Zaharia *et al.*, 2010]. A pesar de la agresividad del TN, cuando se presenta una remisión completa con quimioterapia neoadyuvante, la sobrevida puede ser semejante a la de los subtipos Luminal A y B [Liedtke *et al.*, 2008]. Respecto a la población mexicana, un estudio con 100 pacientes TN en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) mostró que la mayor prevalencia de este subtipo (60%) está en el intervalo de 40 a 60 años, el tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal infiltrante (89%) y sólo el 28% presentó metástasis (15% hacia pulmón y 10% hacia sistema nervioso central) [Hernández-Paz *et al.*, 2010]

1.2 Estrategias terapéuticas/ Clasificación molecular

En aras de desarrollar estrategias terapéuticas particulares para este subtipo, en un estudio reciente se analizó la expresión de genes de 600 pacientes lo cual condujo a dividir al subtipo TN en 6 grupos [Lehman *et al.*, 2011] (Tabla 2). El grupo *basal 1* tiene aumentadas las vías de ciclo y división celular. Se caracteriza por presentar tumores altamente proliferativos por lo que responden mejor a la terapia con compuestos antimetabólicos (*i.e.* en terapia neoadyuvante con taxanos se observó una mejor respuesta de la enfermedad (63%) en comparación con el subtipo mesenquimal (31 %) y el subtipo receptor andrógenos luminal (LAR) (14%). Por su parte, el grupo *basal 2* tiene aumentada las vías de señalización de factores de crecimiento, así como las vías

glucolítica y gluconeogénica. Este subtipo tiene características que sugieren un origen basal/mioepitelial [Lehmann *et al.*, 2011]. El subtipo inmunomodulatorio (IM) sobreexpresa genes del procesos de sistema inmune (señalización de citocinas, procesamiento de antígenos). Además esta firma genética coincide con un subtipo raro de CaMa TN (CaMa medular) el cual se asocia con un pronóstico favorable [Bertucci *et al.*, 2006] [Lehmann *et al.*, 2011]. El subtipo Mesenquimal (M) expresa una variedad de genes involucrados en movilidad celular, receptores de matriz extracelular, rutas de diferenciación. Por su parte el subtipo mesenquimal tipo célula troncal (MSL) presenta además un aumento en genes relacionados en diferenciación y crecimiento celular (en estos se incluye el metabolismo del inositol fosfato, señalización de calcio, receptores acoplados a proteínas G y transportadores ABC), angiogénesis y genes de transición epitelio-mesénquima. Otra diferencia importante entre estos subtipos es que el tipo MSL presenta una disminución de los genes de proliferación y un aumento de genes asociados a pluripotencialidad. Ambos subtipos presentan una mayor quimioresistencia y están asociados a CaMa metaplásicos [Gibson *et al.*, 2005]. El último subtipo, el receptor luminal de andrógenos (LAR), a pesar de tener un fenotipo ER negativo tiene sobreexpresados genes del metabolismo de hormonas, incluyendo metabolismo de porfirinas y de andrógenos y estrógenos [Lehmann *et al.*, 2011]

Sin embargo, esta clasificación únicamente incluye la expresión a nivel de transcritos de mRNA, y por lo tanto nuevamente se excluyen las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales que puedan estar modulando la actividad de las proteínas.

Tipo	Vías activas	Tratamientos	Resultados
Basal 1 Proliferación celular	Ciclo celular (Fase G1, S y G2), Maquinaria del reactoma de replicación, RNA polimerasa, vía ATR/BRCA	Cisplatino y paclitaxel,	Sobrevida alta
Basal 2 Factores de crecimiento	Vías activadas por EGF, NGF, MET, WNT/ β -catenina, IGF1R, activación de la glucólisis y la gluconeogénesis	Cisplatino	Sobrevida alta
Inmunomodulatorio (IM) Inmunidad celular	Activación de vías de inmunidad: CTLA4, IL12, célula NK, Th1/Th2, IL7, presentación y procesamiento de antígenos, vías NF κ B, TNF, transducción de señales de células T, vía DC, BCR, JAK/STAT, ATR/BCRA.		Pronóstico favorable
Mesenquimal (M) Movilidad celular	Activación de las vía IGF/mTOR, ECM, WNT, ALK, TGF- β , regulación de la actina mediada por RHO.	NVP-BEZ235 (inhibidor de PI3K/mTOR) Dasatinib (inhibidor de abl/src)	
Mesenquimal tipo célula pluripotencial (MSL)	Activación de las vías: TCR, WNT/ β -catenina, NF κ B, EGF, ALK, GH, RAC1, GPCR. ERK1/2, RHO, PDGF, TGF- β , señalización de adipocitocina. Adhesión focal mediada por la interacción con receptores de matriz extracelular e integrinas. Metabolismo del inositol fosfato. Citotoxicidad mediada por células NK. Transportadores de drogas ABC. Contracción del músculo liso y señalización mediada por calcio.	NVP-BEZ235 (inhibidor de PI3K/mTOR) Dasatinib (inhibidor de abl/src)	
Receptor luminal de andrógeno (LAR)	Metabolismo de; glutatión, alanina, arginina, aspartato, , fenilalanina, porfirina, prolina, tirosina, triptófano, biosíntesis de esteroides síntesis de andrógenos, estrógenos y glicoesfingolípidos, metabolismo de fructosa, manosa, almidón y sacarosa, ciclo del ácido cítrico, síntesis de ATP, metabolismo de ácidos grasos, síntesis de eicosanoides, ensamblaje flagelar, activación de la vía CHREB y metabolismo del citocromo p450	Bicalutamida (antagonista del receptor de andrógeno)	Mayor sobrevida libre de enfermedad

Tabla 2. Características moleculares de las clasificaciones de subtipo triple negativo Referencias: Lehmann *et al.*, 2011

Con esta información se han implementado nuevas estrategias. Actualmente se han explorado la terapia contra factores de proliferación (*i.e.* inhibidores de receptores de citoqueratinas, hormonas o factores de crecimiento, tirosinas cinasas), inhibidores de la poli-ADP ribosa polimerasa, e inhibidores de la angiogénesis [Olaya-Guzmán 2010] Sin embargo todavía no hay una terapia específica que resulte efectiva.

1.3 Metabolismo energético en el carcinoma mamario triple negativo

A lo largo de esta tesis hemos comentado la heterogeneidad del CaMa, en especial del subtipo TN. El subtipo basal 2 presenta a nivel transcripcional un aumento de las proteínas de glucólisis y gluconeogénesis (sin embargo en el trabajo de Lehmann *et al.*, 2011 no indican cuáles son las enzimas aumentadas), mientras que el subtipo LAR presenta un aumento de las enzimas del ciclo de Krebs, del sistema fosforilante y del metabolismo de aminoácidos (Tabla 2) lo que sugiere un comportamiento metabólico distinto dentro de este subtipo. Sin embargo, estudios en diferentes modelos (biopsias, xenotransplantes y cultivos en monocapa (Tabla 4) sugieren que este subtipo tendrá un metabolismo mitocondrial incrementado. Con esto en mente consideramos que el carcinoma mamario con subtipo TN, por su potencial de invasión, podría ser extremadamente dependiente del metabolismo energético. Esta característica puede aprovecharse para la identificación de biomarcadores específicos y para el diseño de terapias.

Además, un estudio completo donde se compare el aporte energético de las vías glucolítica y mitocondrial para el subtipo TN no se ha realizado. Existe un trabajo [Pelicano *et al.*, 2014] donde analizan el metabolismo energético en 4 líneas celulares TN. Sin embargo en este estudio únicamente midieron la tasa de consumo de oxígeno total (OCR) y la tasa de extracidificación celular (ECAR). Como conclusiones generales observaron que las 4 líneas presentaban un ECAR mayor en comparación con la OCR (Tabla 4) y con estas mediciones concluyen que las líneas TN tienen una glucólisis acelerada y un metabolismo mitocondrial reducido. Sin embargo, no se hicieron los controles adecuados para el cálculo de la glucólisis (incubaciones con 2-desoxiglucosa) ni la FO (titulación con oligomicina). La importancia de este análisis radica en el diseño de estrategias terapéuticas enfocadas en el metabolismo mitocondrial que permitan atacar de manera específica a este subtipo de CaMa

Modelo	Parámetro	Resultados
Biopsias		
Biopsias CaMa TN (n=14)	WB	2OGDH ↑ de 2 a 10 vs. otros subtipos
162 biopsias, 38 TN	IHC Tinción positiva >30%	GDH, SDH, ATP-sintasa en metástasis a cerebro, pulmón, hígado y hueso GLUT 1, HKII, CAIX, MCT4 en metástasis a cerebro y pulmón
Xenotrasplantes		
4T1	PCR en tiempo real Consumo de oxígeno	Células periféricas tumorales vs. tumor primario ↑ 6 veces de PGC-1 α , PGC-1 β , NRF1, y ERR α y de CytC, Cox5b, Cox4i, ATP-sintasa ↑ 2 veces de consumo de oxígeno mitocondrial
MDA-MB-231	Crecimiento tumoral Metástasis	↑ 2.5 veces del tamaño del tumor con 3-hidroxi-butilato ↑ 10 veces en metástasis hacia pulmón con l-lactato
Líneas celulares en monocapa		
MDA-MB-436	Consumo de glucosa, piruvato y glutamina Producción de lactato	vs. MCF-7 ↓ 3 veces el consumo de glucosa ↓ 10 veces la producción de lactato ↑ 15 consumo de piruvato
TP: BT474 ER: MCF-7, BT20, T47D, ZR751, HER2: SKBR3, TN: BT20, MDA231, MDA468, MDA436	OCR ECAR	Las líneas celulares ER+ presentan una mayor OCR y una menor ECAR. Las líneas celulares TN presentan un menor OCR y una mayor ECAR .

Tabla 4. Metabolismo energético en carcinoma mamario triple negativo y metastático. Abreviaturas: 2OGDH; 2-oxoglutarato deshidrogenasa, CAIX; anhidrasa carbónica IX, CaMa; cáncer de mama, CytC; citocromo C, Cox5b; subunidad 5 b de la citocromo oxidasa, Cox4i; subunidad 4, isoforma 1 de las citocromo oxidasa, ECAR; tasa de acidificación extracelular, ER; receptor de estrógeno, ERR α ; Receptor relacionado a estrógenos α , GDH; Glutamato deshidrogenasa, GLUT1; transportador de glucosa isoforma 1, HKII; Hexocinasa isoforma II, IHC; inmunohistoquímica, MCT4; transportador de monocarboxilatos isoforma 4; NRF1; factor nuclear respiratorio 1, OCR; tasa de consumo de oxígeno, PCR; reacción en cadena de la polimerasa, PGC-1 α ; coactivador 1 α del receptor gama para la activación de la proliferación peroxisomal, PGC-1 β ; coactivador 1 β del receptor gama para la activación de la proliferación peroxisomal, PR; receptor de progesterona, SDH; succinato deshidrogenasa, TN; triple negativo, TP; triple positivo, WB; western blot. Referencias. Pacheco-Velázquez *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Pelicano *et al.*, 2014; Mazurek *et al.*, 1997; Bonuccelli *et al.*, 2010; LeBleu *et al.*, 2014

2 Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La fosforilación oxidativa representa un aporte importante en la síntesis de ATP para el carcinoma mamario triple negativo por lo que el uso de drogas antimitocondriales disminuirá sus funciones celulares.

Objetivo Principal

Determinar el aporte energético de la glucólisis y la fosforilación oxidativa en líneas celulares derivadas de carcinoma mamario triple negativo.

Objetivos particulares

- 1) Análisis del contenido de proteínas glucolíticas, mitocondriales, marcadores canónicos, proteínas asociadas a procesos de metástasis y autofagia en carcinoma mamario triple negativo
- 2) Análisis de los flujos glucolítico y de fosforilación oxidativa
- 3) Evaluación del efecto sobre la proliferación de inhibidores glucolíticos, mitocondriales y fármacos canónicos.
- 4) Evaluación del efecto de inhibidores glucolíticos, mitocondriales y fármacos canónicos sobre la migración y la metástasis

3 Material y métodos

Cultivo Celular

Las líneas celulares de carcinoma mamario TN metastático, (MDA-MB-231, MDA-MB-468) y de carcinoma mamario RH+/HER2-, estadio III (MCF-7) fueron incubadas en medio DMEM (Dublecco's modified Eagle's medium) con 25mM de glucosa, 10% de suero fetal bovino, 200 u/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomycin. Las condiciones de incubación fueron a 37° y 5% CO₂. La hipoxia se generó en una cámara modular (Billups-Rothenberg) con una mezcla de 0.1% de O₂, 5% de CO₂ y 99.9 % de nitrógeno durante 24 horas [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010]

Western Blot (WB)

Para la obtención de los extractos las células fueron lavadas con buffer de fosfatos (PBS), raspadas y centrifugadas a 3000 rpm durante 2.5 minutos. El botón celular fue mezclado en 250 µl de amortiguador de Tris (Tris-HCl 25mM pH 7.6 con DTT 5mM, EDTA 1mM y PMSF 1mM) y se empleó presión mecánica para extraer las proteínas totales [Stacey *et al.*, 1992]. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se cuantificó el contenido de proteína por el método de Lowry y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Para el ensayo de WB se cargaron 50 µg de proteína en un gel de SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida y se electrotransfieron a membranas de PVDF (BioRad; Hercules, CA, USA). Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales (Santa Cruz; CA, USA, dilución 1:1000) contra humano para las siguientes proteínas de interés: GLUT 1 , HK (I,II), LDH-A, GA, 2OGDH , ND1, COX VI, ATP-sintasa, ANT, HER2, ERα, Vimentina, E-caderina, metaloproteinas 9, HIF-1α y α-tubulina,. Las bandas de hibridación se revelaron conjugándolos con anticuerpos secundarios (isotipo IgG de ratón y de cabra) acoplados con peroxidasa de rábano y se detectó la señal de la proteína con el sistema ECL-plus (Amersham; Buckinghamshire, UK) [Gallardo-Pérez *et al.*, 2009].

El análisis densitométrico se realizó con el software Scion Image (Scion Corp.; Frederic, MD, USA) en el cual el valor en pixeles se interpretó como porcentaje de intensidad de la banda. Cada banda se normalizó con respecto a un control de carga (α-tubulina), a la cual se le asignó el valor de 100%.

Obtención de suspensiones celulares para la medición de flujos energéticos.

Las células fueron lavadas con buffer Ringer Krebs (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 1.4 mM CaCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, pH 7.4 ajustado con NaOH) y tripsinizadas con una mezcla de tripsina de cerdo al 0.05% y EDTA al 0.02% (Sigma) para separarlas de la caja. La suspensión obtenida fue centrifugada a 3000 rpm durante 2.5 minutos. Nuevamente el botón celular fue suspendido en 1 ml de buffer Ringer Krebs y se centrifugó en las mismas condiciones para eliminar los rastros de tripsina. Finalmente, el botón fue suspendido en 500 µl de Ringer Krebs y se midió la concentración de proteína por el método de biuret [Gornall *et al.*, 1949]. Las células obtenidas se emplearon inmediatamente para las mediciones de los flujos.

Flujo Glucolítico

Las células (2-5 mg/ml) se incubaron en buffer Ringer Krebs a 37°C en agitación constante (150 rpm). Con el propósito de obtener la producción de lactato total, se adicionó glucosa (5 mM), mientras que para calcular la producción de lactato dependiente de la glucólisis se adicionó 2-desoxiglucosa (20 mM) antes de agregar la glucosa. La reacción fue detenida con 10% de ácido perclórico frío al minuto 0, al minuto 10 y al minuto 15 de haber iniciado el ensayo. Las muestras ácidas se neutralizaron con una solución de KOH (3M) y Tris (0.1 mM) y se almacenaron a -70°C hasta su uso. El lactato formado se cuantificó midiendo espectrofotométricamente la aparición de NADH a 340 nm en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH). Para este ensayo, en un volumen total de 2 ml de hidrazina (0.4 M) y glicina (0.5M) pH 9.0, se agregó 1 mM de NAD⁺ y 40 µl de una dilución 1:4 de LDH (Roche). Una vez que se obtuvo una línea basal se adicionaron 50 µl de la muestra ácida neutralizada. La velocidad de glucólisis se calculó considerando la diferencia de absorbancias, el coeficiente de extinción molar del NADH (6.22 mM⁻¹), el volumen de la muestra y el tiempo de reacción [Marín-Hernández *et al.*, 2006]

Flujo Mitocondrial

Las células (5 mg/ml) se agregaron a una cámara de reacción (en 1.9 ml de Ringer Krebs, saturado con aire a 37°C) acoplada a un electrodo tipo Clark donde se midió el consumo de oxígeno polarográficamente. Para las mediciones del efecto

crabtree, la FO y la sensibilidad a cianuro, se obtuvieron las pendientes en presencia de 5 mM de glucosa, 4 μ M de oligomicina y 1mM de cianuro, respectivamente. El cero químico se consiguió reduciendo todo el oxígeno con ditionita. Los cálculos de velocidad de consumo de oxígeno se realizaron considerando que a la altura de la ciudad de México a 37° C hay disueltos 380 nano átomos gramo de oxígeno (nAtgO) por ml de Ringer Krebs. [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000]

Potencial mitocondrial transmembranal

El potencial mitocondrial transmembranal ($\Delta\Psi_m$) fue determinado en células (0.25 mg/ml) incubadas con Rodamina 6G (0.25 μ M) a 37°C en buffer Ringer Krebs (2ml) saturado con aire. La fluorescencia fue monitoreada con el espectrofotómetro de fluorescencia marca Shimadzu a 480 nm de emisión y 565 nm de excitación [Mandala *et al.*, 1999]. Al final de cada trazo se agregó el desacoplante CCCP (5 μ M) para establecer la magnitud de la señal de fluorescencia derivada de la mitocondria.

Ensayos de proliferación

Las células MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF-7 fueron sembradas en placas de 96 pozos (20, 000 a 50,000 células por pozo). Al alcanzar la fase exponencial de crecimiento (1-3 días) Se cambió el medio agregando concentraciones logarítmicas y crecientes (0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M) de los siguientes inhibidores mitocondriales: casiopeína II-gly, MitoVes, Oligomicina, MitoxyTea, α -Tea, α -Tos; inhibidores glucolíticos: 2-Desoxiglucosa, Iodoacetato, Gossipol; fármacos canónicos: Paclitaxel, Doxorubicina, Cisplatino, 5-Fluorouracilo; y compuestos antiinflamatorios: Sulindac, Celecoxib, Simvastatina y se dejaron incubar 24 horas. Una vez finalizado cada tratamiento se agregó a cada pozo 20 μ l de una solución de bromuro de tetrazolio (MTT) en PBS (5 mg/ml) y se dejaron incubar durante 3 horas. Posteriormente, se desechó el medio y el precipitado de formazán se disolvió en 100 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO). Se midió la concentración de formazán en el espectrofotómetro iMark, microplate reader (Bio Rad) a una longitud de onda de 595 nm. El porcentaje de proliferación se calculó considerando las células sin tratamiento como el 100%. La IC50 en proliferación se obtuvo ajustando los porcentajes de proliferación a una ecuación de decaimiento exponencial con el programa Microsoft OriginPro 8 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

Ensayos de migración

Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 fueron sembradas en placas de 6 pozos en medio DMEM 25 mM de glucosa y 10% de suero fetal bovino. Cuando obtuvieron una confluencia del 90% a cada caja se le realizó una herida con una punta azul para micropipetas de 1 ml. Se hicieron dos lavado con PBS para eliminar las células despegadas y se dejaron toda la noche en medio sin suero fetal bovino (para detener la duplicación celular) y con concentraciones logarítmicas de casiopeína II-gly, Iodoacetato, 2-desoxiglucosa y Celecoxib.

Se tomaron las fotografías al tiempo de 0 horas y a las 24 horas. Por cada réplica se contaron el número de células que migraron dentro del área de la herida, seleccionando 3 campos al azar y se consideró como el 100% la migración de las células sin inhibidor a las 24 hrs [Liang *et al.*, 2007].

Ensayos de invasión

Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 fueron incubadas 24hrs. previas al experimento en medio DMEM 25 mM de glucosa sin suero fetal bovino. Posteriormente, fueron sembradas en el compartimiento superior de la cámara de Boyden (Trevigen, USA) a una concentración final de 50,000 células en medio sin suero fetal bovino y con concentraciones logarítmicas de casiopeína II-gly, Iodoacetato, 2-desoxiglucosa y Celecoxib. En la parte inferior de la cámara, se agregó medio DMEM sin suero fetal bovino. Después de 24 horas el número de células que lograron migrar hacia el compartimiento inferior de la cámara de Boyden fue determinado incubándolas con calceína durante 1 hora. Posteriormente la fluorescencia fue detectada a 485 nm de excitación y 520 nm de emisión en el lector de microplacas (Nunclon TM). Se asignó un valor arbitrario de 100% a la muestra control [Arnaoutova, *et al.*, 2010].

Análisis estadístico.

Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. Para cada experimento se realizaron un mínimo de 3 pruebas independientes. Las muestras y sus controles fueron comparados estadísticamente empleando la prueba t-de Student de dos colas no pareadas. Se consideraron como significativos los valores de P menores a 0.05.

4 Resultados

Curvas de crecimiento

La línea celular humana de CaMa estadio III, positiva al RE MCF-7 tiene un tiempo de duplicación (28 horas) mayor en comparación con las líneas metastásicas y TN MDA-MB-231 y MDA-MB-468, las cuales tienen una velocidad de crecimiento semejante entre ellas (alrededor de 40 horas). Para las tres líneas, la condición de hipoxia (a las 120 horas) frena la proliferación (Figura 2). Sin embargo, la viabilidad se mantiene entre 90-95% (datos no mostrados).

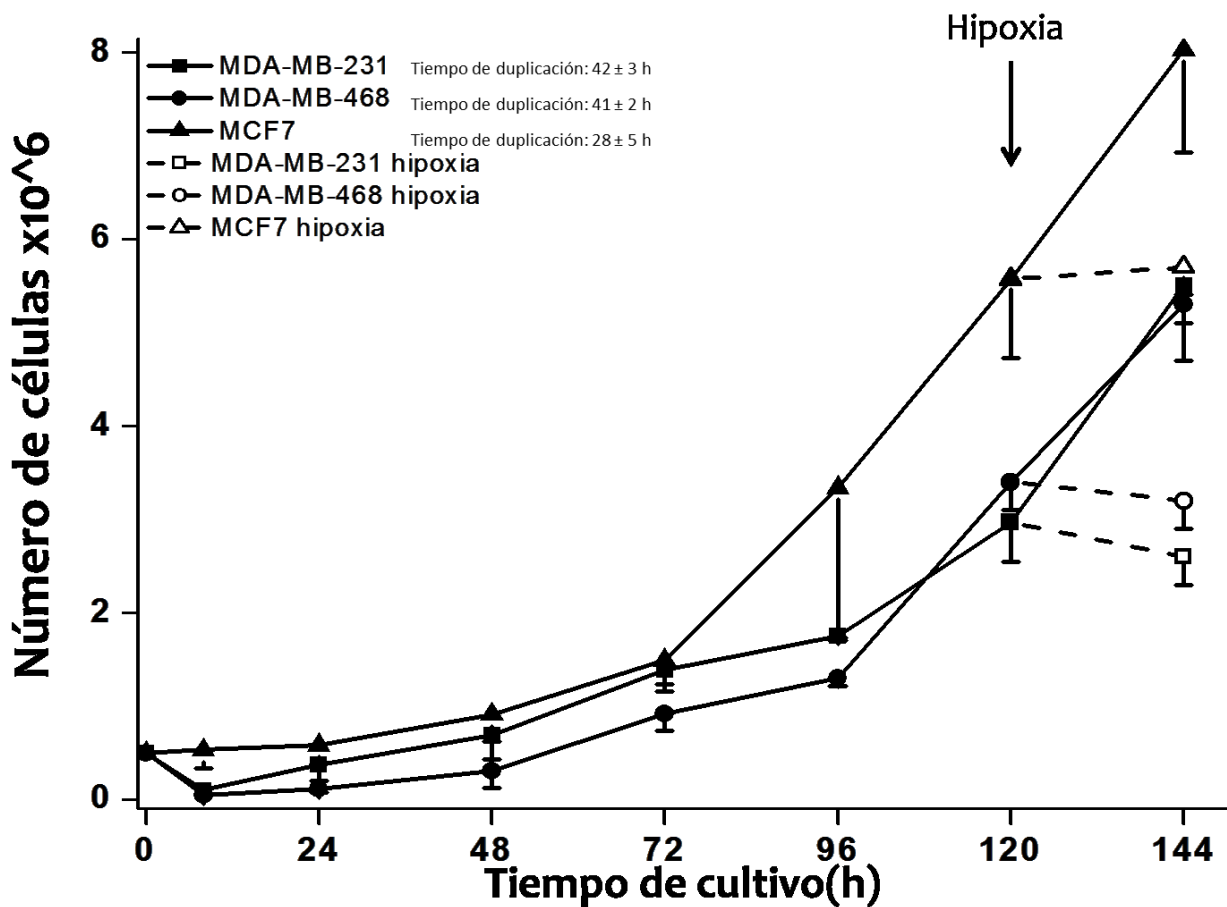


Figura 2. Curva de crecimiento de MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF-7 en condiciones de normoxia e hipoxia. MDA-MB-231 (■) MDA-MB-468 (●) y MCF-7 (▲) (5×10^5 células) fueron cultivadas en medio Dulbecco-MEM a 37 °C, 21% O_2 y 5% CO_2 . A las 120 h (flecha negra), los cultivos celulares fueron sometidos a hipoxia (0.1% O_2 , símbolos abiertos), o mantenidos en normoxia por 24 horas más. La viabilidad para ambas condiciones se mantuvo entre 90-95%. $n=3$ para todas las líneas y todas las condiciones. El tiempo de duplicación fue calculado usando la siguiente fórmula: $n = \frac{1}{[3.32(\log N_F - \log N_I)] / (t_F - t_I)}$ donde N_F representa el número de células cultivadas al final de la fase de crecimiento, N_I representa el número de células al inicio de la curva de crecimiento, t_F es el tiempo final al cual las células fueron cosechadas y t_I es el tiempo inicial de cultivo [McAtter *et al.*, 1994].

Contenido de proteínas glucolíticas

En la Figura 3 se muestra el contenido de proteínas glucolíticas, para las tres líneas celulares en las condiciones de normoxia e hipoxia. En esta figura se agregó al factor de transcripción HIF1- α ya que está reportado que su estabilización aumenta la transcripción de las proteínas glucolíticas analizadas [Semenza *et al.*, 2008]. En este sentido, la condición de hipoxia permitió la estabilización de HIF1- α en las tres líneas celulares, aumentando su contenido alrededor de 2000 veces. La estabilización de HIF1- α indujo un aumento de todas las proteínas glucolíticas para las tres líneas celulares. Sin embargo cabe resaltar que el aumento de las proteínas glucolíticas fue mayor (20 a un 50%) en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 en comparación con la línea celular MDA-MB-468. Esto es un primer indicio de las modificaciones a nivel metabólico que sufren cada línea celular de manera individual.

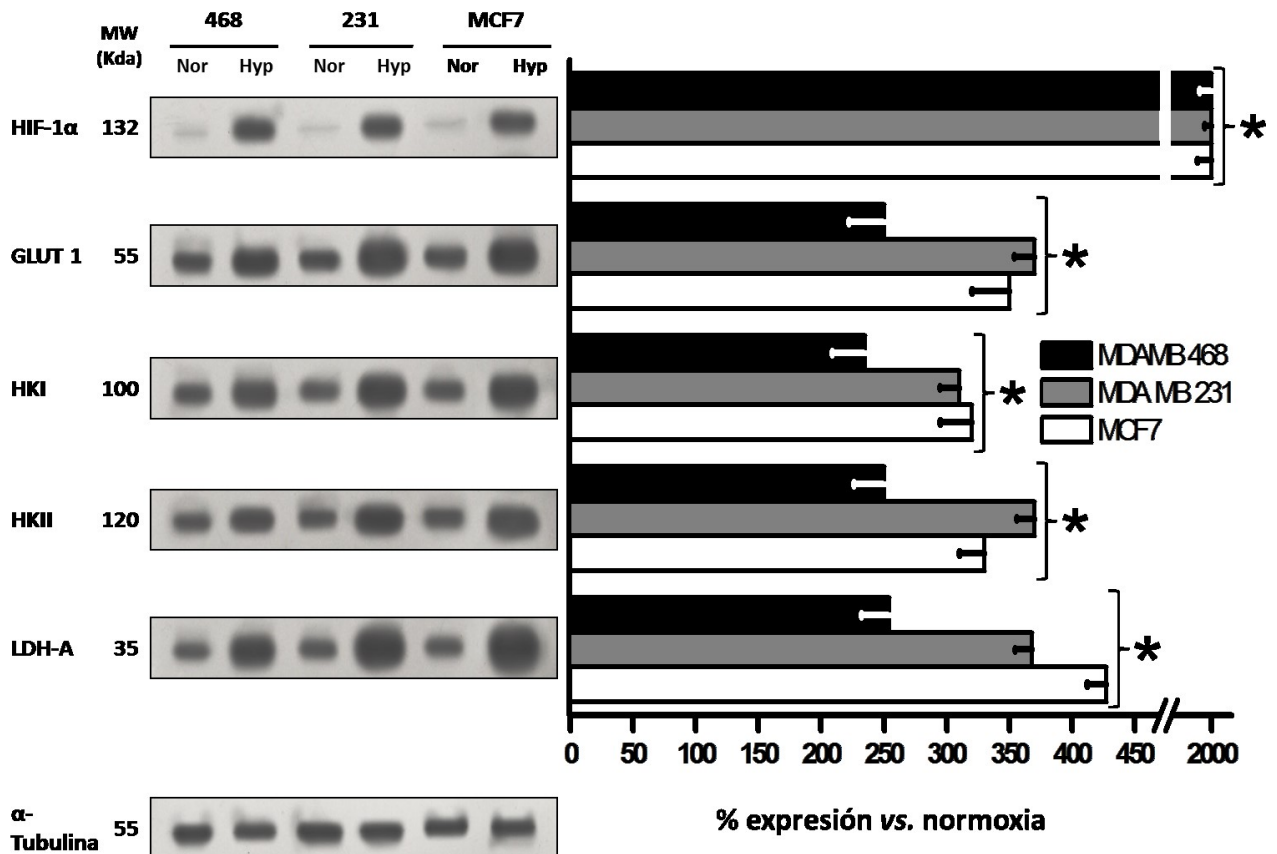


Figura 3. Contenido de proteína de HIF 1 α y proteínas glucolíticas en MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF-7 en condiciones de normoxia (21% O₂) e hipoxia (0.1% O₂, 24 hrs). A la izquierda se muestra el WB representativo de cada proteína analizada, a la derecha se muestra los resultados del análisis densitométrico. Para éste se realizó una doble normalización contra el control de carga (α -tubulina) y contra la condición de normoxia. Los datos se muestran como promedio \pm desviación estándar.* P < 0.05 versus normoxia, prueba t de Student, $n \geq 3$. Abreviaturas: GLUT1, transportador de glucosa 1; HIF-1 α , Factor inducible por hipoxia 1-alpha; HKI, hexocinasa-I; HKII, hexocinasa-II; LDH-A, lactato deshidrogenasa-A.

Contenido de proteínas mitocondriales

En la Figura 4 se muestra el contenido de proteínas mitocondriales, para las tres líneas celulares en las condiciones de normoxia e hipoxia. Así como en condiciones de hipoxia se observa un aumento de las proteínas glucolíticas, podemos observar una disminución de las proteínas mitocondriales para las tres líneas. Sin embargo, la glutaminasa se mantiene a niveles semejantes que la condición de normoxia. La 2OGDH presenta una disminución drástica en la condición de hipoxia para la línea celular 468 (60%) mientras que en las otras líneas la disminución no fue significativa. De igual forma la disminución de las proteínas mitocondriales en la línea celular 468 es mayor que para las otras líneas.

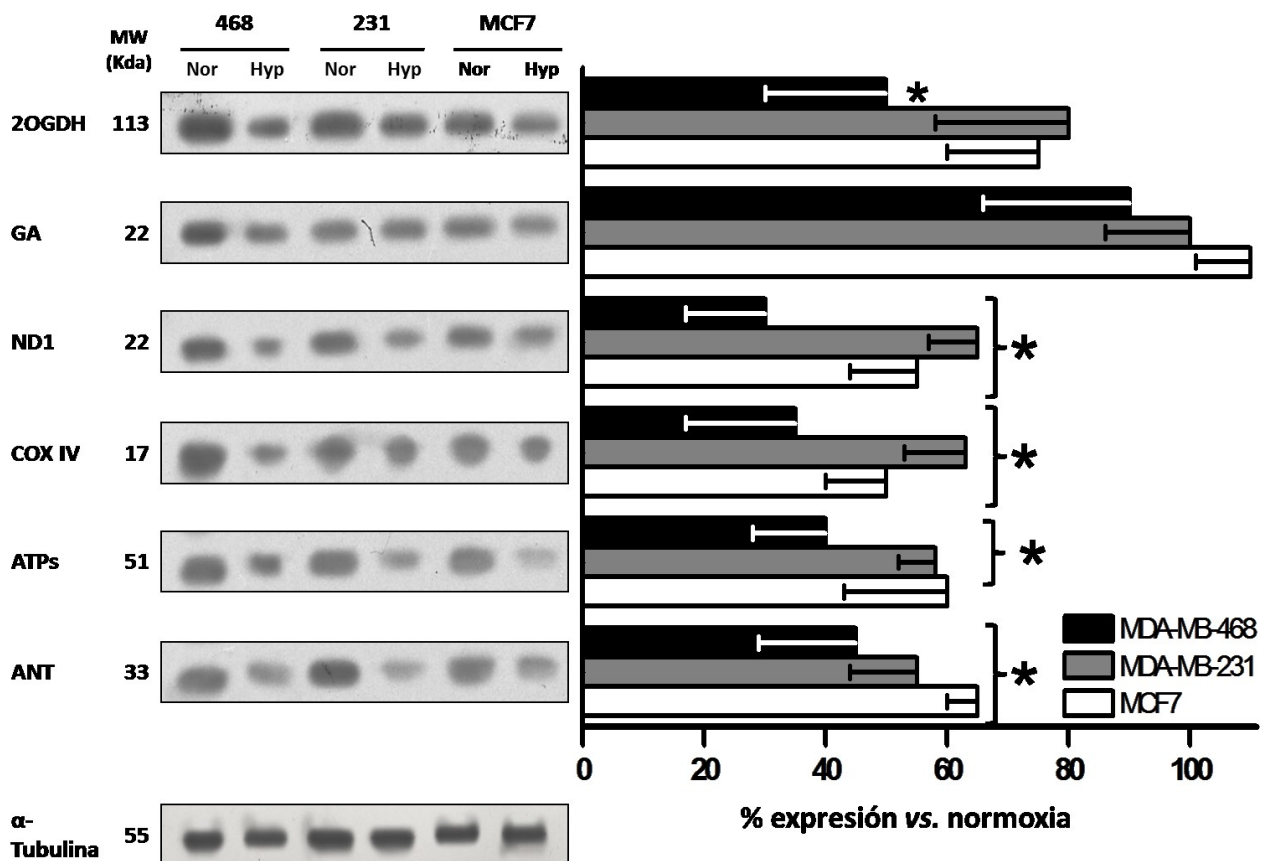


Figura 4. Contenido de proteína de proteínas mitocondriales en MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF-7 en condiciones de normoxia (21% O₂) e hipoxia (0.1% O₂, 24 hrs). A la izquierda se muestra el WB representativo de cada proteína analizada, a la derecha se muestra los resultados del análisis densitométrico. Para éste se realizó una doble normalización contra el control de carga (α-tubulina) y contra la condición de normoxia. Los datos se muestran como promedio ± desviación estándar. **P* < 0.05 versus normoxia, prueba *t* de Student, *n* ≥ 3. Abreviaturas: ATPs, ATP-sintasa; ANT, translocador de nucleótidos de adenina; COXIV, citocromo c oxidasa; GA-L, glutaminasa- L; ND1, NADH deshidrogenasa; 2OGDH, 2-oxoglutarato deshidrogenasa.

Flujos metabólicos

Ya que los datos de contenido de proteína sugerían que la hipoxia propiciaba un aumento del flujo glucolítico y una disminución del metabolismo mitocondrial, se prosiguió a evaluar si la función también se encontraba modificada (Figura 5). En este sentido se observó que la hipoxia aumenta la producción de lactato total en las tres líneas celulares mientras que disminuye el consumo de oxígeno total. Sin embargo el aumento en la producción de lactato total es mayor para las líneas 231 y MCF-7 (aumento de 70%) que para la 468 (aumento del 40%), mientras que la disminución del consumo de oxígeno es mayor para 468 y la 231 (disminución del 50%) que para MCF-7 (10 %). Para identificar el aporte en la producción de lactato por parte de la glucólisis total se hicieron experimentos con 2 desoxiglucosa. Este compuesto inhibe al transportador de glucosa, a la hexocinasa y a la HPI con una preferencia por esta última [Wick *et al.*, 1957; Kipnis *et al.*, 1959]. Con la inhibición de estas tres enzimas se frena el aporte de lactato proveniente de la glucólisis y de la glucogenólisis por lo que el lactato remanente lo producirá la glutaminólisis. Para las tres líneas celulares la glucólisis aumenta en la condición de hipoxia, sin embargo MCF-7 presenta un aumento al doble del flujo glucolítico, mientras que 231 presenta un aumento del 80% y 468 presenta un aumento apenas del 30%. Por otro lado, la glutaminólisis se ve aumentada en las tres líneas celulares en la condición de hipoxia de un 80 a un 160%.

La FO disminuye en la condición de hipoxia para las tres líneas celulares, aunque la línea celular 468 presenta una disminución del 80% mientras que 231 presenta una disminución del 75% y MCF-7 del 50%. Los porcentajes de disminución se relacionan con la disminución del contenido de proteínas mitocondriales.

Los datos de glucólisis y FO nos permiten calcular el aporte de ATP para cada condición en las tres líneas celulares, considerando que cada lactato producido por la glucólisis equivale a una molécula de ATP mientras que cada ngAtO_2 consumido por la FO equivale a 2.5 moléculas de ATP [Nicholls *et al.*, 2013]. De tal forma, la FO es la principal vía de aporte energético (56-75%) en la condición de normoxia, mientras que en la condición de hipoxia esta relación se invierte siendo la glucólisis la principal vía energética con valores que oscilan desde el 67 al 80%

Potencial mitocondrial transmembranal

El potencial mitocondrial transmembranal es una forma indirecta de evaluar la estabilidad de la membrana interna mitocondrial, y el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y el sistema fosforilante. En condiciones de normoxia 468 presenta el mayor potencial transmembranal, seguida de la MCF-7 y por último la 231. Semejante a la disminución de la FO, la hipoxia disminuye el potencial mitocondrial transmembranal de un 60 a un 80%

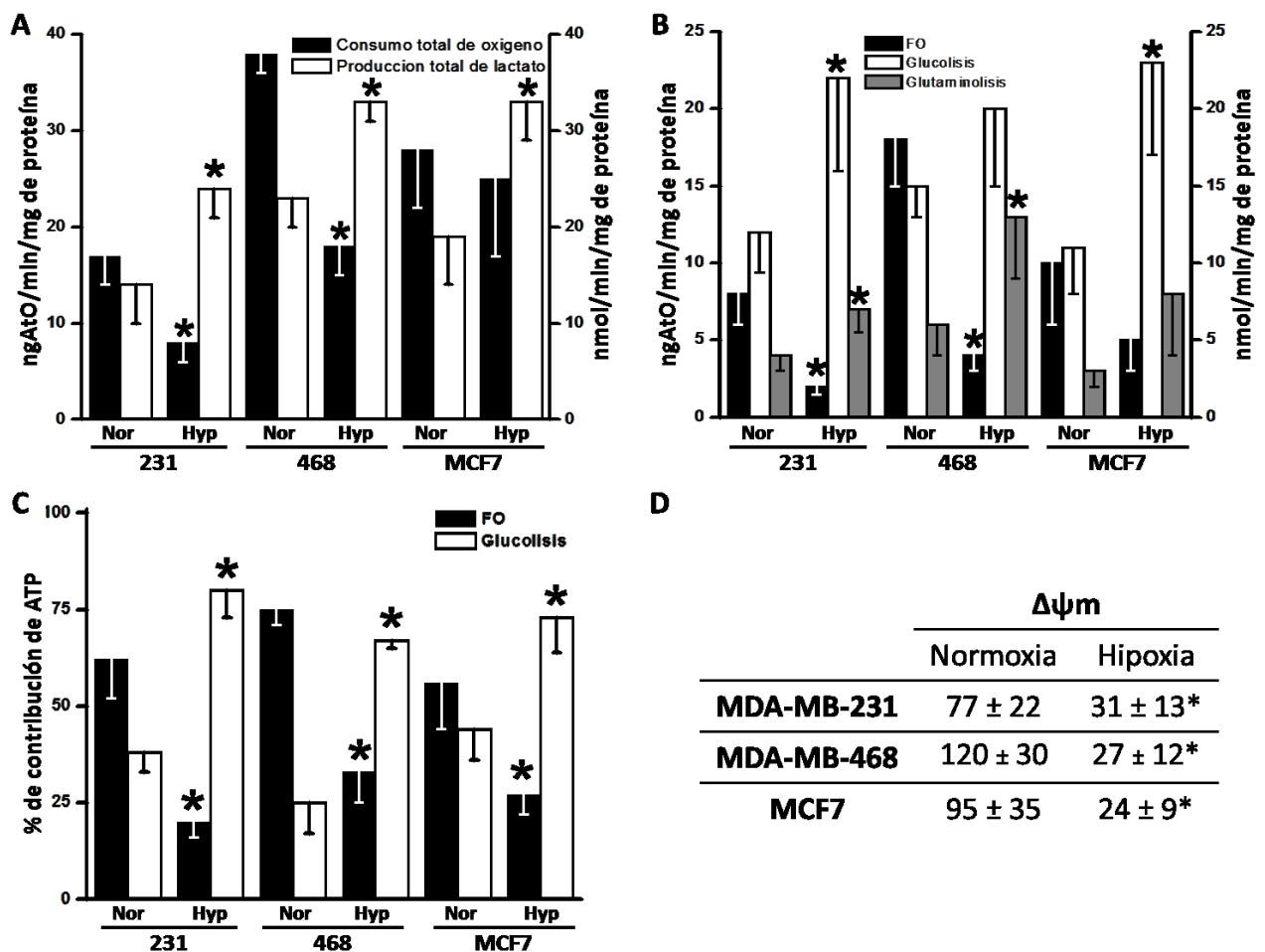


Figura 5. Perfil del metabolismo energético en MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF-7 en condiciones de normoxia (21% O₂) e hipoxia (0.1% O₂, 24h). A) Consumo total de oxígeno (barras negras) y producción total de lactato (barras blancas). B) Flujos de FO (barras negras), glucólisis (barras blancas) y glutaminólisis (barras grises). El flujo de FO representa el consumo de oxígeno sensible a 4 μ M de oligomicina. El flujo glucolítico fue calculado estimando la producción de lactato sensible a 20 mM de 2-desoxyglucosa (la concentración de glucosa en el medio de incubación fue de 5 mM) mientras el flujo de la glutaminólisis se calculó observando la producción de lactato resistente a 2-desoxyglucosa. C) Aporte de ATP. Para los cálculos se consideró que 1 mol de lactato producido mediante la glucólisis es equivalente a 1 mol de ATP, mientras que el flujo de FO fue multiplicado 2.5 (cociente P/O). D) El $\Delta\psi_m$ fue determinado como el cambio en la fluorescencia sensible a 5 μ M CCCP (carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona) en células incubadas con rodamina 6 G (0.25 μ M). Los datos se muestran como promedio \pm desviación estándar. **P* < 0.05 versus normoxia, prueba *t* de Student, *n* \geq 3.

Ensayos de proliferación

Considerando que la FO es la principal vía de aporte de ATP para las tres líneas celulares con condiciones de normoxia (Figura 5), el siguiente acercamiento fue evaluar, en la proliferación celular, la sensibilidad de estas líneas a inhibidores mitocondriales, glucolíticos, fármacos empleados comúnmente en la clínica y compuestos antiinflamatorios (considerando que funcionan como inhibidores de la FO o desacoplantes de la misma [Moreno-Sánchez *et al.*, 1999; Ralph *et al.*, 2015]).

La casiopeína II-gly logró disminuir la proliferación a bajas dosis (IC_{50} de 2 μ M) mientras que el MitoVes, la oligomicina, y el MitoxyTEA presentaron IC_{50} menores a 50 μ M. Sorprendentemente el α TEA y el α TOS afectaron en mayor medida a la línea celular MCF-7 en comparación a las líneas TN (IC_{50} de 3 y 50 μ M vs. >100 μ M) lo que podría estar sugiriendo la presencia de una elevada actividad de esterasas en el citosol de las líneas TN o tal vez un mecanismo de inhibición diferente entre los subtipos.

Por otro lado, el iodoacetato fue el único inhibidor glucolítico con una IC_{50} atractiva (menor a 50 μ M) mientras que el gossipol presenta una IC_{50} mayor a 100 μ M y la 2-desoxiglucosa presenta una IC_{50} alrededor de 10 mM.

Salvo para la casiopeína II-gly, las IC_{50} de los inhibidores mitocondriales y del iodoacetato son semejantes a las IC_{50} de los inhibidores canónicos. En este caso la doxorubicina presentó la IC_{50} más atractiva (menor a 10 μ M) mientras que el 5 fluoracilo es la que tiene la mayor IC_{50} .

Por último el celecoxib es un compuesto antiinflamatorio no esteroideo que presentó una IC_{50} baja, afectando principalmente a la línea celular MCF-7, seguida de la línea celular 468 y por último la línea 231 (con IC_{50} de 1, 6 y 20 μ M respectivamente).

Blanco(s)	Inhibidor/fármaco	IC50 (μM)		
		MDA.MB 231	MDA-MB 468	MCF-7
SDH, HK, alquilante de ADN	Cas II-gly	2 ± 0.3	2 ± 0.6	2 ± 0.06
SDH	MitoVes	11 ± 1	12 ± 1	15 ± 0.4
ATP-sintasa	Oligomicina	38 ± 5	28 ± 3	49 ± 2
SDH	MitoxyTea	22 ± 6	19 ± 2	22 ± 0.3
SDH	α-Tea	> 100	> 100	54 ± 9
SDH	α-Tos	58 ± 7	> 100	3 ± 0.6
HPI	2-Desoxyglucosa	≈ 10 mM	≈ 10 mM	≈ 10 mM
GAPDH, Cistein-peptidasas	Iodoacetato	32 ± 5	17 ± 5	56 ± 17
GAPDH, LDH, MDH, IDH	Gossipol	308 ± 26	157 ± 54	517 ± 157
Beta Tubulina	Paclitaxel	20 ± 5	23 ± 8	5 ± 0.4
Topoisomerasa II	Doxorubicina	7 ± 1	13 ± 2	9 ± 0.5
Alquilante ADN	Cisplatino	30 ± 7	24 ± 5	51 ± 37
Timidilato sintetasa	Fluorouracilo	>1mM	>1mM	708 ± 61
Ciclooxigenasa 2	Celecoxib	20 ± 4	6 ± 2	1 ± 0.4
Ciclooxigenasa 2	Sulindac	212 ± 87	270 ± 131	188 ± 72
3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa.	Simvastatina	12 ± 4	92 ± 12	41 ± 7

Tabla 5. Valores de IC50 en proliferación de inhibidores glucolíticos, mitocondriales y fármacos canónicos para MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF-7 en condiciones de normoxia (21% O₂). Células proliferando en fase exponencial fueron incubadas 24 hrs con los inhibidores. (0.1-10 μM para Cas II-gly; 1-100 μM para MitoVes, Oligomicina, MitoxyTea, Iodoacetato, Paclitaxel, Doxorubicina, Cisplatino, Celecoxib y Simvastatina; 0.001-1 mM para α-Tea, α-Tos 2, Gossipol y Sulindac; 0.001-10 mM para 2-desoxyglucosa y Fluorouracilo. La concentración de inhibidor necesaria para frenar el 50% de la proliferación celular (IC50) fue calculada mediante el ensayo de MTT. La concentración de glucosa externa en el medio fue de 25mM. Los datos se muestran como promedio ± desviación estándar. *P < 0.05 versus normoxia, prueba *t* de Student, n≥3. Abreviaturas: CasII-gly; casiopeina II-gly, GAPDH; Glicer aldehído 3 fosfato deshidrogenasa, HK; Hexocinasa, HPI; Hexosa fosfato isomerasa, IDH; isocitrato deshidrogenasa, LDH; lactato deshidrogenasa, MDH; Malato deshidrogenasa, MitoVES; Vitamina E succinato dirigida hacia la mitocondria; SDH; Succinato deshidrogenasa, α-TEA, α-tocoferiloxiacetato; α-TOS, α-tocoferilsuccinato.

Ensayos de migración

Considerando que el carcinoma mamario TN está asociado con una mayor metástasis y una peor sobrevida del paciente (la sobrevida con metástasis para el subtipo TN es de 27 meses vs. >70 meses para los subtipos Liminal A y B [Savci-Heijink *et al.*, 2015]), el siguiente acercamiento consistió en evaluar el efecto de estos inhibidores sobre los procesos de migración e invasión (Fig. 6). De estos sólo se escogió un inhibidor de cada grupo que presentara la IC₅₀ en proliferación más baja para ambas líneas celulares los cuales fueron la casiopeína II-gly, el iodoacetato y la doxorubicina.

El ensayo de migración, medido por la prueba de la herida mostró que la casiopeína II-gly nuevamente presenta la menor IC₅₀ (100nM) mientras que el iodoacetato presentó una IC₅₀ menor a 1 µM. Por su parte, la doxorubicina presentó una IC₅₀ menor a 10 µM. Esta inhibición de la migración puede ser consecuencia de la disminución de la glucólisis o la fosforilación oxidativa, procesos que deben ser evaluados en estas condiciones. Sin embargo se observa una disminución de las proteínas asociadas a procesos de migración como son la vimentina y la E-caderina, las cuales se observan que disminuyen en comparación con las muestras control.

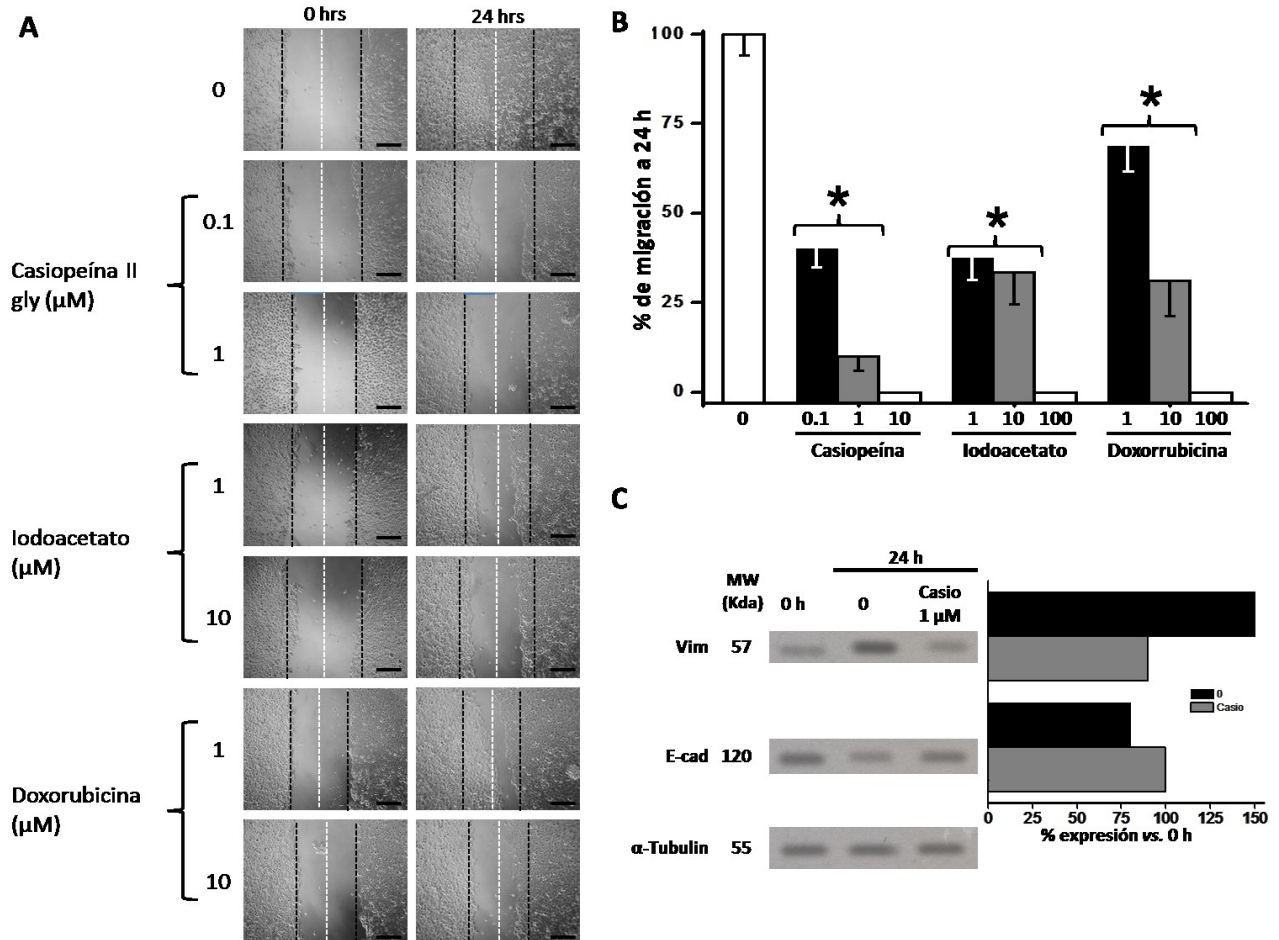


Figura 6. Ensayo de migración de MDA-MB-231 en condiciones de normoxia (21% O₂). A) Prueba de la herida. Se muestra la migración a 0 hrs y 24 hrs. Los inhibidores se agregaron al realizar la herida y se dejaron incubar 24 hrs. B) Porcentajes de migración: El porcentaje de migración fue determinado cuantificando la distancia total de las células que se desplazaron desde el borde de la herida (líneas negras) hacia el centro de esta (líneas blancas) [Liang *et al.*, 2007]. Se consideró el desplazamiento de las células sin inhibidor como el 100%. C) Perfil de proteínas de migración y metástasis. A la izquierda se muestra el WB representativo de cada proteína analizada a las 0 hrs de migración y a las 24 hrs, sin inhibidores y con 0.1 μM de Casio, 1 μM de Iodo y 10 μM de Doxo. A la derecha se muestran los resultados del análisis densitométrico. Para éste se realizó una doble normalización contra el control de carga (α -tubulina) y contra la condición 0 hrs. Los datos se muestran como promedio \pm desviación estándar. * $P < 0.05$ versus control, prueba *t* de Student, $n \geq 3$ Abreviaturas: Casio; casiopeína II-gly- E-cad; E-caderinda, Vim; vimentina, Doxo; Doxorubicina, Iodo; Iodoacetato.

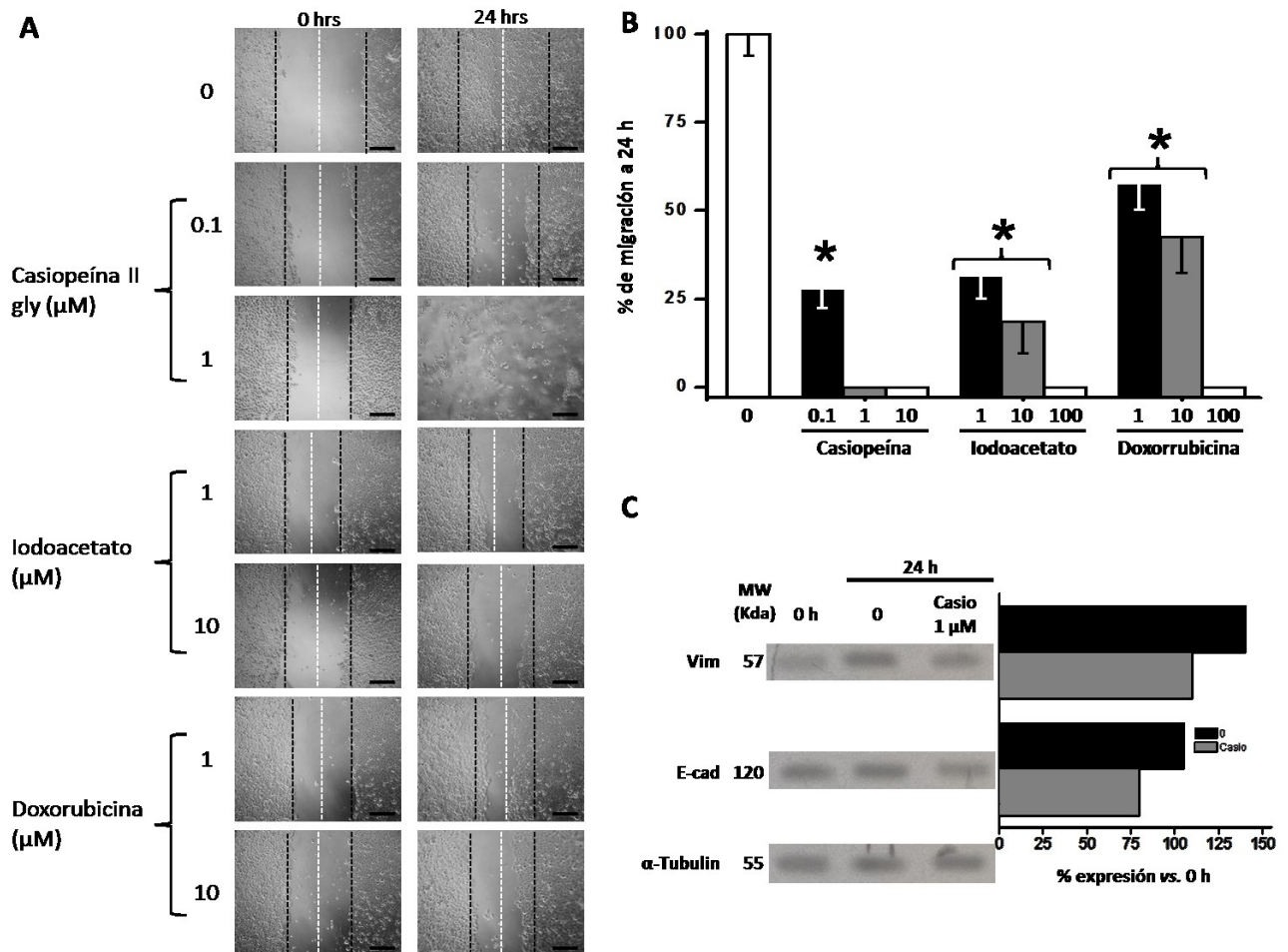


Figura 7. Ensayo de migración de MDA-MB-468 en condiciones de normoxia (21% O₂). A) Prueba de la herida. Se muestra la migración a 0 hrs y 24 hrs. Los inhibidores se agregaron al realizar la herida y se dejaron incubar 24 hrs. B) Porcentajes de migración: El porcentaje de migración fue determinado cuantificando la distancia total de las células que se desplazaron desde el borde de la herida (líneas negras) hacia el centro de esta (líneas blancas) [Liang *et al.*, 2007]. Se consideró el desplazamiento de las células sin inhibidor como el 100%. C) Perfil de proteínas de migración y metástasis. A la izquierda se muestra el WB representativo de cada proteína analizada a las 0 hrs de migración y a las 24 hrs, sin inhibidores y con 0.1 μM de Casio, 1 μM de Iodo y 10 μM de Doxo. A la derecha se muestran los resultados del análisis densitométrico. Para éste se realizó una doble normalización contra el control de carga (α-tubulina) y contra la condición 0 hrs. Los datos se muestran como promedio ± desviación estándar. **P* < 0.05 versus control, prueba *t* de Student, n≥3. Abreviaturas: Casio; casiopeína II-gly; E-cad; E-caderinda, Vim; vimentina, Doxo; Doxorubicina, Iodo; Iodoacetato.

Ensayos de invasión.

Por último se evaluó el efecto de los mismos inhibidores sobre la invasión en las líneas celulares, el cual fue semejante al observado para la proliferación.

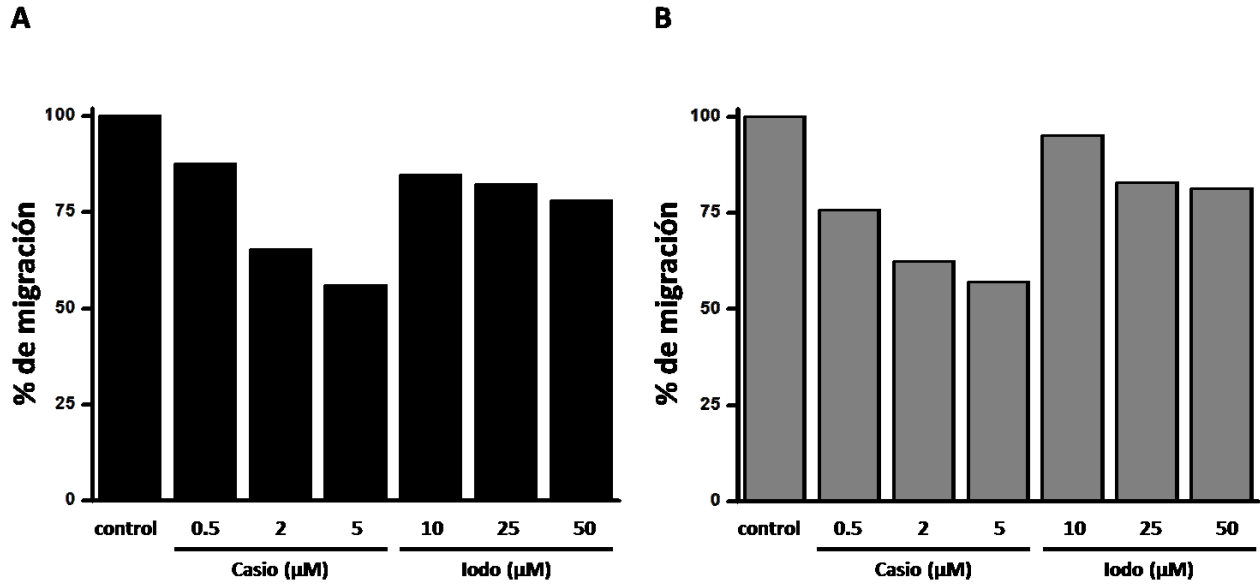


Figura 8. Ensayos de invasión en MDA-MB-231, MDA-MB-468 en condiciones de normoxia (21% O₂). Las células fueron incubadas en medio sin suero durante 24 hrs y posteriormente se sembraron en las placas de migración durante 24 hrs en medio sin suero con o sin inhibidores. A) MDA-MB-231, B) MDA-MB-468

5 Discusión

Los resultados generales de este segundo estudio muestran un aumento en el contenido de proteína de las enzimas glucolíticas en la condición de hipoxia como ya está reportado en los estudios de Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010 y Semenza *et al.*, 2008. Del mismo modo la disminución de las proteínas mitocondriales en la condición de hipoxia coincide con lo reportado en otros estudios [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010, Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015].

Las modificaciones en el contenido de proteína se ven reflejadas en los flujos metabólicos donde en la condición de hipoxia se aumentan las proteínas glucolíticas, el consumo de glucosa y la producción de lactato [Marín-Hernández *et al.*, 2006; Semenza *et al.*, 2008]. Por otra parte, está ampliamente documentado que la hipoxia disminuye la FO, además de aumentar las especies reactivas de oxígeno [Fukuda *et al.*, 2007, Papandreou *et al.*, 2006]

Asimismo, las tres líneas celulares presentan un comportamiento metabólico diferente. Para la línea positiva al receptor de estrógeno (MCF-7) el aporte energético se mantiene equitativo, pues ambas vías aportan alrededor del 50% del ATP. En el caso de las líneas con fenotipo TN el aporte principal proviene de la FO, aunque para MDA-MB-468 la FO aportó alrededor de tres cuartas partes del ATP celular, mientras que para MDA-MB-231 este aporte fue del 65%. Este resultado se contrapone con el estudio de Pelicano [Pelicano *et al.*, 2014] en el que se analizó el metabolismo energético de 4 líneas TN y las comparó con 4 líneas positivas a RE. En ese estudio los autores concluyeron que las líneas TN presentaban un metabolismo glucolítico preponderante y un bajo metabolismo mitocondrial en comparación con líneas RH y HER2 positivo. Sin embargo, una revisión más profunda de este artículo indica que 1) no se hicieron los controles adecuados para el cálculo de la glucólisis (incubaciones con 2-desoxiglucosa para descartar la glutaminólisis en la acidificación total del medio) y la FO (titulación con oligomicina para obtener el aporte de la FO en el consumo total de oxígeno), 2) el número de mitocondrias y el potencial mitocondrial transmembranal es mayor en las líneas TN en comparación con los otros subtipos.

Por otro lado la hipoxia, además de incrementar la producción de lactato, disminuye la FO, lo que modifica la distribución del aporte de ATP, haciendo que en las tres líneas celulares esta dependencia aumente arriba del 60%. En el caso de la línea celular 231 el aporte de ATP por parte de la glucólisis llega a ser del 80%, mientras que en 469 y MCF-7 es alrededor del 70%. En este punto es importante resaltar que (1) la

hipoxia no es un fenómeno crónico sino que durante el desarrollo de un tumor surgirán oleadas intermitentes de suministro de sangre. Entonces, la dependencia energética por parte de ambas vías será fluctuante; (2) aunque en este estudio se generó una condición de hipoxia severa 0.1%, la disminución del aporte de ATP por parte de la FO no se eliminó. Los reportes que han evaluado este fenómeno han podido observar que por más disminución de oxígeno que se presente la FO nunca se inhibirá, lo que sugiere que existe un mínimo aporte por parte del metabolismo mitocondrial para mantener actividad celular [revisado en Moreno-Sánchez *et al.*, 2014]. Parte de la explicación se encuentra en el complejo IV ya que durante la hipoxia la baja concentración de oxígeno (3-14 μM) no es una limitante para la FO debido a que la K_m de la citocromo oxidasa por el O_2 es de $1\mu\text{M}$ [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007]; en consecuencia la hipoxia representa una concentración saturante de oxígeno para la FO [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007].

Al conocer la contribución de cada vía, la siguiente aproximación y lo que es el enfoque de este segundo estudio fue sugerir al metabolismo mitocondrial como una alternativa para el desarrollo de una terapia. En este caso decidimos evaluar el efecto de inhibidores metabólicos (glucolíticos y mitocondriales) para el tratamiento del carcinoma mamario ductal con fenotipo TN. El efecto de los inhibidores se evaluó a dos niveles; la proliferación y la capacidad de migración e invasión de las líneas metastásicas.

Es interesante observar que la casiopeína II-gly fue, de todos los compuestos, la molécula que logró un mayor efecto inhibitorio tanto en la proliferación como en la migración. A pesar de haber sido diseñada como un sustituto del cisplatino, los efectos a dosis bajas se centran principalmente en la inhibición del metabolismo energético, glucolítico y mitocondrial [Marín Hernández 2012]. La naturaleza dual de esta molécula y el efecto tan potente sugiere que los tratamientos clínicos no sólo deben de enfocarse a una vía de señalización o fenómeno (como la proliferación, la movilidad o el metabolismo) si no deben de ser una combinación de drogas que ataquen diferentes vías celulares para disminuir la cito-toxicidad.

El siguiente compuesto en presentar una mejor IC_{50} fue el celecoxib. El celecoxib presentó un mejor efecto en MCF-7 donde la IC_{50} fue semejante a la casiopeína y en MDA-MB-468 donde fue de $6\mu\text{M}$. En 231 tuvo una IC_{50} semejante a algunos inhibidores mitocondriales, glucolíticos y canónicos lo que sugiere una diferente actividad de la cicloxigenasa 2, la cual es el blanco de este inhibidor (Tabla 6)

La metástasis es el causante de más del 90% de las muertes en pacientes con cáncer [Mehlen *et al.*, 2006]. En las pacientes de CaMa con fenotipo TN es más probable que se presente metástasis y de ahí que la supervivencia es muy baja (i.e. 10 meses en comparación con 25 meses en el grupo RE positivo [Kast *et al.*, 2015; Savci-Heijink *et al.*, 2015]). Con esto en consideración evaluamos el efecto de los mejores inhibidores de cada rubro en el proceso de migración. Nuevamente la casiopeína II-gly presentó una menor IC50 para la migración, sugiriendo un papel importante en la producción de ATP para el proceso de migración.

Los otros inhibidores también se observa que frenan la migración salvo con la doxorubicina, donde la IC50 aumentó. Esto puede deberse a que el sitio de acción de este compuesto es la división celular más que la migración. Se ha observado que las células resistentes a la quimioterapia desarrollan frecuentemente un fenotipo metastásico [Kast *et al.*, 2015; Savci-Heijink *et al.*, 2015] por lo que esta terapia podría ser dirigida para estadios tempranos en el tratamiento.

El análisis del metabolismo energético para el diseño de una terapia antitumoral es un área de creciente estudio. Si bien en esta tesis no se evaluó el efecto de las drogas e inhibidores empleados en un modelo no tumoral (el cual está considerado como una perspectiva para próximos estudios) otros estudios han abordado esta temática. Por ejemplo, los estudios con casiopeína II-gly en modelos de rata y perro muestran que este compuesto tiene efectos hematotóxicos y cardiotoxicos. Sin embargo, las concentraciones a las que puede resultar nocivo son mayores que las que se reportan en esta tesis (i.e. la dosis letal en perros es de 8 mg/kg, mientras que en rata una dosis de 5 mg/kg produce daños hematológicos que son reversibles tras 15 días de administrado el compuesto) [Leal-García *et al.*, 2007; De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2003]. De igual forma los fármacos empleados en clínica (i.e. cisplatino, paclitaxel, doxorubicina) tienen efectos secundarios que están ampliamente descritos. La alternativa para disminuir la toxicidad y potenciar el efecto antineoplásico de estos inhibidores puede ser la terapia combinada empleando dosis menores de diferentes fármacos con diferentes blancos en las células tumorales.

Capítulo 6. Conclusiones

- En condiciones de normoxia la fosforilación oxidativa representa el principal aporte en el suministro de ATP para las líneas celulares triple negativo.
- La terapia anti-mitocondrial es una estrategia atractiva para el tratamiento del carcinoma mamario independientemente del subtipo inmunohistoquímico o el nivel de malignidad.

Perspectivas

- Evaluar el efecto de la terapia combinada sobre los procesos de migración, invasión y metástasis en carcinomas mamario triple negativo.

Referencias

- Allred DC. Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. *Oncologist*. 2008 Nov;13(11):1134-6.
- Anuario de morbilidad 1984-2014. *Epidemiologia.salud.gob.mx*. 2016. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. Revisado en Junio 16, 2016.
- Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc*. 2010 Apr;5(4):628-35.
- Balinsky D, Platz CE, Lewis JW. Enzyme activities in normal, dysplastic, and cancerous human breast tissues. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Feb;72(2):217-24.
- Balinsky D, Platz CE, Lewis JW. Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res*. 1983 Dec;43(12 Pt 1):5895-901.
- Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle*. 2010 Sep 1;9(17):3506-14.
- Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Feb 21;93(4):309-14.
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *J Cell Sci*. 2009 Apr 15;122(Pt 8):1055-7.
- Breast cancer: prevention and control. World Health Organization. 2016. Disponible en at: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. Revisado en: Junio 16, 2016.
- Brenner C, Subramaniam K, Pertuiset C, Pervaiz S. Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer. *Oncogene*. 2011 Feb 24;30(8):883-95.
- Breslow N. A Generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship. *Biometrika* 1970 57(3): 579-94
- Brown RS, Goodman TM, Zasadny KR, Greenson JK, Wahl RL. Expression of hexokinase II and Glut-1 in untreated human breast cancer. *Nucl Med Biol*. 2002 May;29(4):443-53.
- Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, Daley FM, Noble S, Pittam M, Wright D, Allen SA, Dove J, Wilson GD. Evaluation of ER, PgR, HER2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer*. 2005 Jan 17;92(1):147-55.
- Burt BM, Humm JL, Kooby DA, Squire OD, Mastorides S, Larson SM, Fong Y. Using positron emission tomography with [(18)F]FDG to predict tumor behavior in experimental colorectal cancer. *Neoplasia*. 2001 May-Jun;3(3):189-95.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
- Ceballos-Cancino G, Hernández-Rodríguez NA. Moduladores de Progresión en CaMa. *Cancerología* 2008 3:41-9
- Chávarri-Guerra Y, Villarreal-Garza C, Liedke PE, Knaul F, Mohar A, Finkelstein DM, Goss PE. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol*. 2012 Aug;13(8):e335-43.
- Chen M, Kianifard F. A multiple comparison procedure to control the strong stagewise family error rate in comparing test treatments and a control. *J Biopharm Stat*. 1997 Jul;7(3):355-67.
- Chung FY, Huang MY, Yeh CS, Chang HJ, Cheng TL, Yen LC, Wang JY, Lin SR. GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2009 Jul 20;9:241.
- Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul;7(7):505-16.

De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Müller A, Ruiz-Ramirez L, Howarth JA, Dobrota M. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology*. 2003 Dec 15;194(1-2):103-13.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34.

Dmitrienko A, Offen W, Wang O, Xiao D. Gatekeeping procedures in dose-response clinical trials based on the Dunnett test. *Pharm Stat*. 2006 Jan-Mar;5(1):19-28.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):966-78.

Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007 Apr 6;129(1):111-22.

Gajria D, Chandralapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011 Feb;11(2):263-75.

Gibson GR, Qian D, Ku JK, Lai LL. Metaplastic breast cancer: clinical features and outcomes. *Am Surg*. 2005 Sep;71(9):725-30.

Goldman NA, Katz EB, Glenn AS, Weldon RH, Jones JG, Lynch U, Fezzari MJ, Runowicz CD, Goldberg GL, Charron MJ. GLUT1 and GLUT8 in endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2006 Nov;19(11):1429-36.

Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 1949 Feb;177(2):751-66.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*. 1997 Apr 1;16(7):1647-55.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982 Apr;143(1):29-36.

Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. *Clin Chim Acta*. 2006 Apr;366(1-2):112-29.

Hernández-Paz JR. CaMa triple negativo. Experiencia en pacientes del INCAN. Incan-mexicoorg. 2016. Disponible en: <http://www.incan-mexico.org/incan/docs/tesis/2014/altaespecialidad/Tesis%20RX%20Hernandez%20Paz%20CMTN.pdf>. Fecha de revision: June 16, 2016.

Hernández-Reséndiz I, Román-Rosales A, García-Villa E, López-Macay A, Pineda E, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Alvarez-Ríos E, Gariglio P, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Dec;1853(12):3266-78.

Hines WG, Hines RJ. Increased power with modified forms of the Levene (Med) test for heterogeneity of variance. *Biometrics*. 2000 Jun;56(2):451-4.

Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Feb 21;93(4):266-76.

Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7455-60.

Isidoro A, Martínez M, Fernández PL, Ortega AD, Santamaría G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J*. 2004 Feb 15;378(Pt 1):17-20.

- Iurlaro R, León-Annicchiarico CL, Muñoz-Pinedo C. Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. *Methods Enzymol.* 2014;542:59-80.
- Jensen SS, Aaberg-Jessen C, Christensen KG, Kristensen B. Expression of the lysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP-1) in astrocytomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013 Jun 15;6(7):1294-305.
- Kast K, Link T, Friedrich K, Petzold A, Niedostatek A, Schoffer O, Werner C, Klug SJ, Werner A, Gatzweiler A, Richter B, Baretton G, Wimberger P. Impact of breast cancer subtypes and patterns of metastasis on outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Apr;150(3):621-9.
- Kim HM, Jung WH, Koo JS. Site-specific metabolic phenotypes in metastatic breast cancer. *J Transl Med.* 2014 Dec 14;12:354.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):177-85.
- King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science.* 1985 Sep 6;229(4717):974-6.
- Kipnis DM, Cori CF. Studies of tissue permeability. V. The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the rat diaphragm. *J Biol Chem.* 1959 Jan;234(1):171-7.
- Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Amer Statist Assoc* 1952 47:583-621
- Lari SA, Kuerer HM. Biological Markers in DCIS and Risk of Breast Recurrence: A Systematic Review. *J Cancer.* 2011 May 1;2:232-61.
- Leal-García M, García-Ortuño L, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I, Luna-Delvillar J, Sumano H. Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeinas in anaesthetized dogs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007 Sep;101(3):151-8.
- LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, de Carvalho FM, Damascena A, Domingos Chinen LT, Rocha RM, Asara JM, Kalluri R. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2014 Oct;16(10):992-1003, 1-15.
- Lee WY, Huang SC, Hsu KF, Tzeng CC, Shen WL. Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence. *Gynecol Oncol.* 2008 Feb;108(2):377-84.
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011 Jul;121(7):2750-67.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 10;26(8):1275-81.
- Liu Y, Li YM, Tian RF, Liu WP, Fei Z, Long QF, Wang XA, Zhang X. The expression and significance of HIF-1 α and GLUT-3 in glioma. *Brain Res.* 2009 Dec 22;1304:149-54.
- Mabjeesh NJ, Amir S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol.* 2007 May;22(5):559-72.
- Mandalà M, Serck-Hanssen G, Martino G, Helle KB. The fluorescent cationic dye rhodamine 6G as a probe for membrane potential in bovine aortic endothelial cells. *Anal Biochem.* 1999 Oct 1;274(1):1-6.
- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, López-Ramírez SY, García-García JD, Rodríguez-Zavala JS, Ruiz-Ramírez L, Gracia-Mora I, Zentella-Dehesa A, Sosa-Garrocho M, Macías-Silva M, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Arch Toxicol.* 2012 May;86(5):753-66.

- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem*. 2009 Aug;9(9):1084-101.
- Matés JM, Segura JA, Campos-Sandoval JA, Lobo C, Alonso L, Alonso FJ, Márquez J. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Oct;41(10):2051-61.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilo O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. 2006 Jun 16;312(5780):1650-3.
- Mayer A, Schneider F, Vaupel P, Sommer C, Schmidberger H. Differential expression of HIF-1 in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Oncol*. 2012 Oct;41(4):1260-70.
- Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx*. 2004 Apr;1(2):182-8.
- Mazurek S, Michel A, Eigenbrodt E. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *J Biol Chem*. 1997 Feb 21;272(8):4941-52.
- McAffer JA, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines, in Davis JM (Ed), *Basic Cell Culture. A practical approach*, IRL Press at Oxford University Press, New York 1994, pp. 93-147
- McLain AL, Szweda PA, Szweda LI. α -Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor. *Free Radic Res*. 2011 Jan;45(1):29-36.
- Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jun;6(6):449-58.
- Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Dawood S, Esteva FJ, Buzdar AU, Chen H, Eksambi S, Hortobagyi GN, Baselga J, Gonzalez-Angulo AM. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 1;15(23):7381-8.
- Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007 Oct 4;26(45):6469-87.
- Moreno-Sánchez R, Bravo C, Vásquez C, Ayala G, Silveira LH, Martínez-Lavín M. Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. *Biochem Pharmacol*. 1999 Apr 1;57(7):743-52.
- Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Saavedra E, Pardo JP, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S. Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 May;50:10-23.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007 Mar;274(6):1393-418.
- Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjanek FD, Rodríguez-Enríquez S. Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. *FEBS J*. 2016 Jan;283(1):54-73.
- Mori Y, Tsukinoki K, Yasuda M, Miyazawa M, Kaneko A, Watanabe Y. Glucose transporter type 1 expression are associated with poor prognosis in patients with salivary gland tumors. *Oral Oncol*. 2007 Jul;43(6):563-9.
- Mortalidad general. Inegi.org.mx. 2016. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/Proyectos/bd/continuas/mortalidad/MortalidadGeneral.asp?s=est&c=11144&proy=mortgral_mg. Revisado en Junio 16, 2016.
- Nicholls DG, Ferguson S. *Bioenergetics*. Academic Press; 2013.
- Olaya-Guzmán EJ. CaMa triple negativo, estado actual *Rev Esp Méd-Quir* 2010 15(4):228-36
- Pacheco-Velázquez SC, Gallardo-Pérez JC, Aguilar-Ponce JL, Villarreal P, Ruiz-Godoy L, Pérez-Sánchez M, Marín-Hernández A, Ruiz-García E, Meneses-García A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Identification of a metabolic and canonical biomarker signature in Mexican HR+/HER2-, triple positive and triple-negative breast cancer patients. *Int J Oncol*. 2014 Dec;45(6):2549-59.
- Papandreou I, Lim AL, Laderoute K, Denko NC. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ*. 2008 Oct;15(10):1572-81.

- Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, Kim SI, Park BW. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012 Feb;21(1):50-7.
- Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapy target. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13 Suppl 1:S61-75.
- Pedersen PL. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr*. 1999 Aug;31(4):291-304.
- Pelicano H, Zhang W, Liu J, Hammoudi N, Dai J, Xu RH, Pusztai L, Huang P. Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Res*. 2014 Sep 11;16(5):434.
- Pérez-Rodríguez G, Aranda-Moreno C, Olivares-Corichi IM, Garcia-Sanchez JR. The association of subtypes of breast cancer with tumour characteristics and reproductive factors in 1326 Mexican women. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2015;19(6):462-6.
- Pérez-Sánchez VM, Vela-Chávez TA, Mora-Tiscareño MA. Diagnóstico Histopatológico y Factores Pronóstico en Cáncer Infiltrante de Glándula Mamaria. *Cancerología* 2008; 3: 7-17.
- Perkins NJ, Schisterman EF, Vexler A. ROC curve inference for best linear combination of two biomarkers subject to limits of detection. *Biom J*. 2011 May;53(3):464-76.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslén LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
- Quinsay MN, Thomas RL, Lee Y, Gustafsson AB. Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy*. 2010 Oct;6(7):855-62.
- Ralph SJ, Pritchard R, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Ralph RK. Hitting the Bull's-Eye in Metastatic Cancers-NSAIDs Elevate ROS in Mitochondria, Inducing Malignant Cell Death. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015 Feb 13;8(1):62-106.
- Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2008 Apr;15(4):678-85.
- Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandoval V, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Oct;42(10):1744-51.
- Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Aguilar-Ponce JL, Ruiz-García E, Ruizgodoy-Rivera LM, Meneses-García A, Moreno-Sánchez R. Multi-biomarker pattern for tumor identification and prognosis. *J Cell Biochem*. 2011 Oct;112(10):2703-15.
- Rodríguez-Enríquez S, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Mar 1;375(1):21-30.
- Rudlowski C, Moser M, Becker AJ, Rath W, Buttner R, Schroder W, Schurmann A. GLUT1 mRNA and protein expression in ovarian borderline tumors and cancer. *Oncology*. 2004;66(5):404-10.
- Sarafian V, Jadot M, Foidart JM, Letesson JJ, Van den Brûle F, Castronovo V, Wattiaux R, Coninck SW. Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int J Cancer*. 1998 Jan 5;75(1):105-11.
- Savci-Heijink CD, Halfwerk H, Hooijer GK, Horlings HM, Wesseling J, van de Vijver MJ. Retrospective analysis of metastatic behaviour of breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Apr;150(3):547-57.
- Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):548-52.
- Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest*. 2008 Dec;118(12):3835-7.
- Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples) *Biometrika* 1965 52(3/4):591-611.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

Smith DG, Sturmev RG. Parallels between embryo and cancer cell metabolism. *Biochem Soc Trans*. 2013 Apr;41(2):664-9.

Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol*. 2009 Apr;20(4):628-35.

Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, Rotter V. Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ*. 2006 Dec;13(12):2140-9.

Subramanian J, Simon R. What should physicians look for in evaluating prognostic gene-expression signatures? *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Jun;7(6):327-34.

ter Kuile BH, Westerhoff HV. Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *FEBS Lett*. 2001 Jul 6;500(3):169-71.

Tretter L, Adam-Vizi V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Dec 29;360(1464):2335-45.

Vallejos CS, Gómez HL, Cruz WR, Pinto JA, Dyer RR, Velarde R, Suazo JF, Neciosup SP, León M, de la Cruz MA, Vigil CE. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin Breast Cancer*. 2010 Aug 1;10(4):294-300.

van't Veer LJ, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):564-70.

Vickers AJ. Parametric versus non-parametric statistics in the analysis of randomized trials with non-normally distributed data. *BMC Med Res Methodol*. 2005 Nov 3;5:35.

Vu T, Claret FX. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol*. 2012 Jun 18;2:62.

Warbug O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956 Aug 10;124(3215):269-70.

Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*. 2008 Apr;15(4):621-7.

Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem*. 1957 Feb;224(2):963-9.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013.

Young DA, Zerbe GO, Hay WW Jr. Fieller's theorem, Scheffé simultaneous confidence intervals, and ratios of parameters of linear and nonlinear mixed-effects models. *Biometrics*. 1997 Sep;53(3):838-47.

Zaharia M, Gómez H. [Triple negative breast cancer: a difficult disease to diagnose and treat]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2013 Oct-Dec;30(4):649-56.

Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ, Hu W, Feng Z. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 27;108(39):16259-64.

Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*. 1993 Apr;39(4):561-77.

Arch Toxicol (2014) 88:1327–1330
 DOI 10.1007/s00204-014-1246-2

REVIEW ARTICLE

Canonical and new generation anticancer drugs also target energy metabolism

Sara Rodríguez-Enríquez · Juan Carlos Gallardo-Pérez ·
 Ileana Hernández-Reséndiz · Alvaro Martín-Hernández · Silvia C. Pacheco-Velázquez ·
 Sayra Y. López-Ramírez · Franklin D. Rumjanek · Rafael Moreno-Sánchez

Received: 3 April 2014 / Accepted: 13 April 2014 / Published online: 4 May 2014
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Significant efforts have been made for the development of new anticancer drugs (protein kinase or proteasome inhibitors, monoclonal humanized antibodies) with presumably low or negligible side effects and high specificity. However, an in-depth analysis of the side effects of several currently used canonical (platin-based drugs, taxanes, anthracyclines, etoposides, antimetabolites) and new generation anticancer drugs as the first line of clinical treatment reveals significant perturbation of glycolysis and oxidative phosphorylation. Canonical and new generation drug side effects include decreased (1) intracellular ATP levels, (2) glycolytic/mitochondrial enzyme/transporter activities and/or (3) mitochondrial electrical membrane potentials. Furthermore, the anti-proliferative effects of these drugs are markedly attenuated in tumor rho (0) cells, in which functional mitochondria are absent; in addition, several anticancer drugs directly interact with isolated mitochondria affecting their functions. Therefore, several anticancer

drugs also target the energy metabolism, and hence, the documented inhibitory effect of anticancer drugs on cancer growth should also be linked to the blocking of ATP supply pathways. These often overlooked effects of canonical and new generation anticancer drugs emphasize the role of energy metabolism in maintaining cancer cells viable and its targeting as a complementary and successful strategy for cancer treatment.

Keywords Energy metabolism · Humanized monoclonal antibodies · Metabolic therapy · Protein kinase inhibitors · Tumor cells

Abbreviations

ETC Electron transport chain
 OxPhos Oxidative phosphorylation
 2-OGDH 2-Oxoglutarate dehydrogenase complex

Introduction

Despite considerable advances in biomedical research and clinical applications in the field, cancer remains a leading cause of mortality worldwide. The severe side effects caused by the frequent use of conventional chemotherapeutics diminish, unfortunately, the patients' quality of life. Therefore, the development of safe and efficacious alternatives with well-known mechanism of action is mandatory. First-line anticancer drugs such as antibody–drug conjugates and protein kinase (PK) small-molecule inhibitors have become widely used in the clinical treatment of cancer presumably because they are designed to be selective for one protein or cellular process (Ott and Adams 2011; Li et al. 2013; Miller et al. 2013). However, as occurs with other canonical and traditional chemotherapy drugs

S. Rodríguez-Enríquez (✉) · J. C. Gallardo-Pérez ·
 I. Hernández-Reséndiz · A. Martín-Hernández ·
 S. C. Pacheco-Velázquez · S. Y. López-Ramírez ·
 R. Moreno-Sánchez (✉)
 Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología,
 Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 México,
 México
 e-mail: saren960104@hotmail.com

R. Moreno-Sánchez
 e-mail: rafael.moreno@cardiologia.org.mx

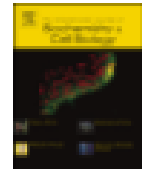
S. Rodríguez-Enríquez
 Laboratorio de Medicina Tradicional, Instituto Nacional de
 Cancerología, San Fernando, México

F. D. Rumjanek
 Centro de Ciências de Saúde, Instituto de Bioquímica Médica,
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbc

Mitochondrial free fatty acid β -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells



Sara Rodríguez-Enríquez^{a,b,*}, Luz Hernández-Esquivel^a, Alvaro Marín-Hernández^a, Mohammed El Hafidi^c, Juan Carlos Gallardo-Pérez^a, Ileana Hernández-Reséndiz^a, José S. Rodríguez-Zavala^a, Silvia C. Pacheco-Velázquez^a, Rafael Moreno-Sánchez^a

^a Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Col. Sección 16, Tlalpan, México D.F. 14080, México

^b Laboratorio de Medicina Tradicional, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, D.F., México

^c Departamento de Medicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2015

Received in revised form 29 May 2015

Accepted 8 June 2015

Available online 11 June 2015

Keywords:

Cancer cells

Tumor mitochondria

Perhexiline

β -Oxidation

Anti-mitochondrial therapy

ABSTRACT

Oxidative phosphorylation (OxPhos) is functional and sustains tumor proliferation in several cancer cell types. To establish whether mitochondrial β -oxidation of free fatty acids (FFAs) contributes to cancer OxPhos functioning, its protein contents and enzyme activities, as well as respiratory rates and electrical membrane potential ($\Delta\psi_m$) driven by FFA oxidation were assessed in rat AS-30D hepatoma and liver (RLM) mitochondria. Higher protein contents (1.4–3 times) of β -oxidation (CPT1, SCAD) as well as proteins and enzyme activities (1.7–13-times) of Krebs cycle (KC: ICD, 2OGDH, PDH, ME, GA), and respiratory chain (RC: COX) were determined in hepatoma mitochondria vs. RLM. Although increased cholesterol content (9-times vs. RLM) was determined in the hepatoma mitochondrial membranes, FFAs and other NAD-linked substrates were oxidized faster (1.6–6.6 times) by hepatoma mitochondria than RLM, maintaining similar $\Delta\psi_m$ values. The contents of β -oxidation, RC and KC enzymes were also assessed in cells. The mitochondrial enzyme levels in human cervix cancer HeLa and AS-30D cells were higher than those observed in rat hepatocytes whereas in human breast cancer biopsies, CPT1 and SCAD contents were lower than in human breast normal tissue. The presence of CPT1 and SCAD in AS-30D mitochondria and HeLa cells correlated with an active FFA utilization in HeLa cells. Furthermore, the β -oxidation inhibitor perhexiline blocked FFA utilization, OxPhos and proliferation in HeLa and other cancer cells. In conclusion, functional mitochondria supported by FFA β -oxidation are essential for the accelerated cancer cell proliferation and hence anti- β -oxidation therapeutics appears as an alternative promising approach to deter malignant tumor growth.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: AAT, aspartate aminotransferase; AcAc, acetoacetyl; ANT, adenine nucleotide translocase; COX, cytochrome c oxidase; CPT1, carnitine palmitoyl transferase 1; LCHAD, long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase; GA, glutamylase; GDH, glutamate dehydrogenase; Gln, glutamine; Glut, glutamate; ICD, isocitrate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; Mal, malate; ME, malic enzyme; ND, NADH-ubiquinone oxidoreductase; OxPhos, oxidative phosphorylation; PDH, pyruvate dehydrogenase; Pyr, pyruvate; RLM, rat liver mitochondria; ROS, radical oxygen species; SCAD, short-chain acyl CoA dehydrogenase; SDH, succinate dehydrogenase; 3OG, 3-oxoglutarate; 2OGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase; β OXf1at, β -hydroxybutyrate.

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Bioquímica, Juan Badiano No. 1, Col. Sección 16, Tlalpan, 14080 México, México. Tel.: +52 55 55 79 29 11.

E-mail address: saren001048@hotmail.com (S. Rodríguez-Enríquez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbc.2015.06.010>

1357-2725/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Enhanced glycolysis is one of the most important cancer metabolic hallmarks (Cantor and Sabatini, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011). It has been suggested that tumor cells permanently maintain an impaired oxidative phosphorylation (OxPhos) which promotes an increased glycolysis (Warburg, 1956). In consequence, OxPhos flux, and mitochondrial enzyme activities and contents are not usually determined in studies of cancer energy metabolism (Owens et al., 2011; Putignani et al., 2012). Several proposals on the possible mechanisms associated with the OxPhos impairment in cancer cells have emerged. Some of these proposed mechanisms are: mutations in the Krebs cycle enzymes (fumarate hydratase, succinate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase) (Xekouki and Stratakis, 2012; Yang et al., 2012); absence (Mayr et al., 2008) of one of the principal enzyme controlling