



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Efecto de la concentración de glucosa en la expresión del receptor CXCR4, proliferación y migración en células de cáncer pulmonar.

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

presenta

Ileana Patricia Castañeda Reyes



Director de Tesis:

Dra. Selma Celina Rivas Fuentes

Asesor Interno:

Dr. Jorge Hernández Montes



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA

VOCAL: Dra. SELMA CELINA RIVAS FUENTES

SECRETARIO: Dr. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

SUPLENTE: Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE: M. en C. MARÍA DEL CARMEN LAGUNAS CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. SELMA CELINA RIVAS FUENTES

SUSTENTANTE: ILEANA PATRICIA CASTAÑEDA REYES

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Selma Celina Rivas Fuentes por permitirme participar en el presente proyecto de investigación, a la Dra. Patricia Gorocica Rosete por facilitarme el uso de las instalaciones y material del departamento de Bioquímica, al Dr. Noé Alvarado Vásquez por las determinaciones de lactato y piruvato, y a la química Eduarda Cerón por el apoyo técnico y atenciones brindadas durante mi estancia en el laboratorio.

Dedicatoria.

A Dios por todas las bendiciones que me ha otorgado a lo largo de mi vida y por esta segunda oportunidad que me brindó para poder llegar a cumplir un sueño más.

A mis padres.

Mamá gracias por haberme obsequiado una vida llena de ensueño, por educarme con principios y valores pero sobre todo con mucho amor. Las palabras son pocas para describir cuán agradecida estoy por tu apoyo incondicional y por darme la fuerza necesaria para levantarme en cada tropiezo, los cuales sabemos que no fueron pocos. Gracias por tus cuidados, por sostener mi mano todos y cada uno de aquellos días que pasé en el INER. Gracias por los consejos que me has dado, pero sobre todo porque eres ese gran ejemplo de mujer perseverante y exitosa que siempre guiará mis pasos durante toda la vida.

Gracias papá por ser el hombre sensible y cariñoso que todo hijo quisiera tener. Por tus eternas pláticas sobre la vida, por apoyarme en los momentos difíciles, por tratar de entenderme siempre, porque me has enseñado a tener paciencia cuando más la he necesitado. Gracias por demostrarme que lo importante es saber llegar y nunca dejarse vencer. Sobre todo, gracias infinitas por desear siempre estar al lado de tus hijos.

A mi hermano.

Gracias hermano por ser mi principal motivación, mi primer bendición, mi compañero de juegos, de risa, de pláticas y de discusiones científicas sin final. Porque sé que contigo la vida es más bonita y divertida. Estaremos siempre juntos.

Gracias a mi familia por ser el motor de mi vida y por siempre estar a mi lado. ¡Los amo mucho!

Agradecimientos.

Abuelita Alejandra gracias por todos tus cuidados, por inspirarme el gusto hacia la naturaleza y por ser un pilar importante en mi vida. Siempre estás en mi pensamiento.

Tía Paty este logro te lo dedico. Gracias por enseñarme a pensarme en grande, por ser un ejemplo de fortaleza y tenacidad. Gracias por todos los consejos y el cariño que me brindaste. Te llevo siempre en mi corazón.

Gracias a mi abuelita María Luisa y a Mamá Andrea por su apoyo incondicional.

Gracias a mis tíos; Isaías, David y Ulises por los consejos que en su momento tuvieron para mí y por el apoyo brindado durante toda mi carrera.

Gracias a mis primos; Diego, David, Anita, Juan Manuel, Luisita y Santiago por acompañarme a lo largo del camino.

Gracias a mis amigos; Beto, Ara, Óscar, Tayra, Fernando, Arturo, Shaid y Diana por ser mis compañeros de aventuras y locuras. Gracias por llenar de risas cada uno de mis días en la facultad, pero sobre todo, gracias por ser los mejores amigos que la carrera y la vida me pudo dar... Los amo.

Gracias a Saúl y a Pablo por enseñarme tanto entre risas y uno que otro desamor, pero sobre todo gracias por permitirme formar parte de los tres mosqueteros.

Gracias Elena por recibirme en el INER como si fuera tu amiga de años. Gracias por las tardes de café, por escucharme cuando más te necesitaba, por esos consejos en el laboratorio. En pocas palabras, gracias por ser "mi chula". Te quiero mucho.

A la Doctora Selma Rivas por sus consejos y paciencia, pero sobre todo, por brindarme la confianza para realizar este proyecto de tesis.

¡Gracias a todos!

Y cuando vuelva a mirar al cielo, sonreiré. Porque ahora lo sé, los átomos que conforman mis células y tus células están formados de polvo de estrellas...

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. Cáncer pulmonar.	3
2.2. Metabolismo de la glucosa en el cáncer.	5
2.3. Quimiocinas.	10
3. ANTECEDENTES	13
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVOS	
6.1. Objetivo general.	21
6.2. Objetivos particulares.	21
7. METODOLOGÍA	
7.1. Cultivo celular.	22
7.2. Tinción de antígenos extracelulares para citometría de flujo.	23
7.3. Ensayo de herida.	25
7.4. Análisis de herida por ImageJ.	26
7.5. Ensayo de proliferación celular con CFSE.	27
7.6. Determinación de la concentración de piruvato y lactato.	29
7.7. Análisis estadístico.	30

8. RESULTADOS	
8.1. Morfología y viabilidad en células H292 cultivadas en condiciones de normoglucosa y alta glucosa.	31
8.2. Inmunotinción para CXCR4 en sangre completa (monocitos y linfocitos) como control de calidad del anti-CXCR4.	34
8.3. Inmunotinción para HLA-ABC en células H292 como control técnico de tinción.	35
8.4. Expresión basal de CXCR4 en células H292 cultivadas en normoglucosa y alta glucosa.	35
8.5. Inmunotinción para CXCR4 en células H292 estimuladas con SDF-1 y cultivadas en normoglucosa y alta glucosa.	38
8.6. Porcentaje de cierre de herida en células H292 estimuladas con SDF-1 y cultivadas en concentraciones de normoglucosa y alta glucosa.	41
8.7. Evaluación del porcentaje de proliferación con CFSE en células H292 cultivadas en concentraciones de normoglucosa y alta glucosa.	47
8.8. Evaluación de la relación piruvato/lactato en células H292 cultivadas en condiciones de normoglucosa y alta glucosa.	50
9. DISCUSIÓN	51
10. CONCLUSIONES	55
11. LITERATURA CITADA	56
12. ANEXOS	63

ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

ATCC. Colección Americana de tipos celulares (del inglés *American Type Collection*).

ATP. Trifosfato de adenosina (del inglés *adenosine triphosphate*).

BT. Buffer de tinción.

CF. Carboxifluoresceína.

CFDA-SE. Carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (del inglés *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*).

CFSE. Carboxifluoresceína succinimidil éster (del inglés *carboxyfluorescein succinimidyl ester*).

CINVESTAV. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

CXCL12. Quimiocina con motivo C-X-C ligando 12, también conocida como SDF-1 (Factor derivado de células estromales 1, del inglés *stromal cell-derived factor-1*).

CXCR4. Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4.

FADH. Dinucleótido de flavina y adenina en su forma reducida.

FK. Fractalcina (del inglés *fractalkine*).

GLUT1. Transportador de glucosa 1.

GLUT3. Transportador de glucosa 3.

GLUT4. Transportador de glucosa 4.

GPCRs. Receptores de siete pasos transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (del inglés *G protein-coupled receptor*).

HKI. Hexocinasa I.

HKII. Hexocinasa II.

HIF-1. Factor inducido por hipoxia 1.

LDHA. Lactato deshidrogenasa.

MAP cinasa. Proteína cinasa activada por mitógeno (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MCP-1. Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*).

NADH. Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida.

NF-kappaβ. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células b activadas (del inglés *nuclear factor kappa β*).

PBS. Solución amortiguadora de fosfatos (del inglés *phosphate buffered saline solution*).

PDH. Piruvato deshidrogenasa.

PDK-1. Piruvato deshidrogenasa cinasa 1.

RNA. Ácido ribonucleico.

ROS. Especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*).

SFB. Suero Fetal Bovino.

1. RESUMEN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte a nivel mundial. Se ha reportado que la unión de la quimiocina CXCL12 (SDF-1) con su receptor CXCR4 regula la proliferación, migración, invasión y metástasis en células de cáncer de pulmón. Adicionalmente, estudios previos realizados en células Jurkat han mostrado un aumento en la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 cuando se cultivan en concentraciones altas de glucosa. Por otra parte, se ha reportado que en células mesangiales de ratón y rata, HUGECs, y HUVECs cultivadas bajo concentraciones altas de glucosa existe un aumento en la expresión de las quimiocinas: CCL2, CX3CL1 y CCL5, lo cual se correlaciona con el aumento en el crecimiento y la proliferación celular de algunos de estos tipos celulares. Nuestro objetivo fue medir la expresión del receptor CXCR4 en células de cáncer pulmonar en condiciones de cultivo con alta glucosa extracelular, además de evaluar e identificar alguna correlación en la proliferación y migración de estas células. Para lo cual se utilizó como modelo de estudio la línea celular H292 derivada de células de carcinoma mucoepidermoide de pulmón. Se determinó por citometría de flujo la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 en células H292, a partir de un cultivo de 24 horas bajo condiciones de normoglucosa (5.5 mM) y alta glucosa (11 mM y 25 mM), con y sin la presencia del ligando SDF-1. Para definir el porcentaje de proliferación en células H292; se cultivaron en condiciones de normoglucosa y alta glucosa, se marcaron con CFSE, y se evaluaron por citometría de flujo los días 1, 3 y 6. Asimismo, se determinó por herida el porcentaje de migración en células H292 estimuladas con SDF-1 (0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml y 100 ng/ml), bajo condiciones de normoglucosa y alta glucosa extracelular. Por último, con el objetivo de

evaluar el flujo glucolítico en células H292, se determinó la relación piruvato/lactato a partir de cultivos de 24 horas bajo condiciones de normoglucosa y alta glucosa.

Los resultados obtenidos muestran que sólo un porcentaje reducido de células H292 expresan el receptor CXCR4, lo cual indica que la expresión de dicho receptor no se encuentra regulado por glucosa extracelular. Además, al estimular las células H292 con SDF-1 se encontró que el receptor CXCR4 no se encuentra regulado positivamente por la quimiocina SDF-1. Resultados obtenidos a partir de los experimentos de herida no presentan cambios significativos en los porcentajes de cierre en cultivos con alta glucosa extracelular; sin embargo, la diferencia que se muestra de porcentaje de cierre de herida entre la condición con 5.5 mM y 11 mM de glucosa bajo el estímulo con 10 ng/ml de SDF-1, sí presenta relevancia estadística ($p= 0.023$). Los porcentajes de proliferación celular no muestra diferencias entre condiciones de cultivo en ningún tiempo evaluado. La relación piruvato/lactato se ve favorecida en cultivos con alta glucosa (11 mM y 25 mM) con respecto a cultivos con normoglucosa (5.5 mM), aunque los resultados no presentaron significancia estadística. Como conclusión tenemos que en células H292 se encuentra activada la vía glucolítica bajo condiciones de cultivo en alta glucosa extracelular, esta situación podría estar favoreciendo su migración, la cual parece estar correlacionada con el estímulo de la quimiocina SDF-1, pero no así, con la expresión del receptor CXCR4.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer pulmonar.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer se define como un amplio grupo de enfermedades que pueden aparecer y afectar cualquier parte del organismo (OMS, 2015). Un tumor maligno se encuentra determinado por ciertas características denominadas sellos distintivos, en los que se encuentran: el potencial replicativo ilimitado, la auto-suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis, capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis, además de la inflamación promovida por tumores, inestabilidad genómica y mutación, desregulación de la energía celular y la evasión de la destrucción inmune (Figura A) (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

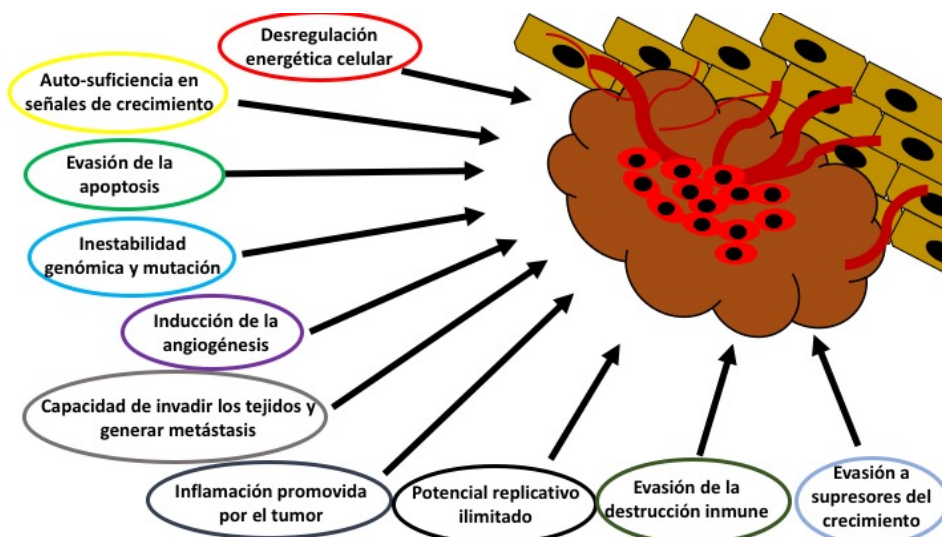


Figura A . Sellos distintivos del cáncer. (Modificada de: Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

Se sabe que el cáncer es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad (OMS, 2015). Estadísticamente se han registrado 7.9 millones de muertes por cáncer en el año 2007 a nivel mundial (Van-Meerbeeck J y Surmont V, 2009), particularmente se ha reportado que el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte tanto en hombres como en mujeres (Cheng ZH *et al.*, 2016). En Estados Unidos se diagnosticaron aproximadamente 170 000 casos nuevos en el año 2003 (Van-Meerbeeck J y Surmont V, 2009). Mientras que en México la incidencia por cáncer de pulmón entre los años 1984 a 1992 fue de 1 019 pacientes los cuales fueron reportados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (Medina MF *et al.*, 1996).

El cáncer de pulmón se clasifica histopatológicamente en dos tipos: el cáncer pulmonar de células pequeñas (microcítico) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (no microcítico) (Cerecedo-Zapata CM *et al.*, 2009); éste último representa cerca del 85% de todos los casos de cáncer pulmonar (Zhang L *et al.*, 2016). Los tipos más comunes de cáncer de pulmón de células no pequeñas son: el carcinoma de células escamosas o epidermoide, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma, aunque existen varios tipos adicionales que se presentan con menos frecuencia; y todos los tipos se presentan con variantes histológicas poco habituales (NIH, 2016) (Cerecedo-Zapata CM *et al.*, 2009).

El tipo de cáncer de pulmón más frecuente en mujeres, hombres jóvenes y no fumadores, es el adenocarcinoma pulmonar con una incidencia de alrededor del 40% (Zappa C y Mousa S, 2016). Este tipo de cáncer se origina de las células broncoalveolares, el cual es definido como una neoplasia epitelial maligna con fenotipo neumocito, o producción de moco y su diferenciación es glandular. Se ubica preferentemente en las regiones más externas del

pulmón y se caracteriza por su crecimiento lento. (Zappa C y Mousa S, 2016; Dorantes-Heredia R *et al.*, 2016).

El carcinoma mucoepidermoide representa únicamente un 0.1-0.2% de los tumores primarios malignos del pulmón (Martínez Y *et al.*, 2007). Típicamente se originan a partir de las glándulas submucosas del árbol traqueobronquial, con un origen común en las glándulas salivares (Abu WK *et al.*, 2015; Sae-Won H *et al.*, 2008). El carcinoma mucoepidermoide se divide histológicamente en tumores de bajo y alto grado (Martínez Y *et al.*, 2007), además, se caracteriza por un crecimiento incesante, así como, por su agresividad, debido a su resistencia a la terapia sistémica y radioterapia (Mochizuki D *et al.*, 2015).

La mayoría de los carcinoma mucoepidermoides son de bajo grado y con buen pronóstico, sin embargo, cuando se presenta un tumor de alto grado la tasa de metástasis es alta, el pronóstico es pobre y puede indicar características aún más agresivas que las primarias (Huang Y *et al.*, 2016; Singh A *et al.*, 2010). Algunos reportes han observado que se puede dar metástasis hacia órganos como el intestino delgado, cerebro, colon, médula ósea, ganglios linfáticos regionales y distantes, otras partes del pulmón, glándula suprarrenal, riñón, pleura y piel. (Moreno-Aguilera *et al.*, 2017; Saito T *et al.*, 2015; Franco I *et al.*, 2016; Pan Z *et al.*, 2014; Singh A *et al.*, 2010).

2.2 Metabolismo de la glucosa en el cáncer.

Las células necesitan un aporte energético constante para realizar y mantener las funciones biológicas que las mantiene vivas. Para que las células puedan utilizar la energía proveniente de moléculas como: proteínas, lípidos y polisacáridos, que constituyen la mayor

parte de los alimentos que ingerimos, el organismo debe degradar estas moléculas en moléculas más pequeñas con las que se obtiene CO_2 y energía, a este proceso se le denomina catabolismo (Alberts B *et al.*, 2010).

Por otra parte, el anabolismo es la fase constructiva o de síntesis del metabolismo, donde a partir de moléculas pequeñas se generan moléculas más complejas en procesos de biosíntesis, por ejemplo: ácidos grasos, aminoácidos y glucosa (Alberts B *et al.*, 2010; Teijón JM *et al.*, 2006).

El ATP es obtenido a partir de la degradación de la molécula de glucosa y es la principal molécula requerida en el organismo para el intercambio de energía, actúa como mensajero intra y extracelular jugando un papel importante como mediador fisiológico, además de ser es una de las unidades principales de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), se obtiene a partir de la glucólisis y de la respiración celular (Rosas S *et al.*, 2010).

Se le denomina glucólisis a la serie de reacciones que transforman una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH, la palabra glucólisis proviene del griego *glykos*, "azúcar", y *lysis*, "rotura". La glucólisis se lleva a cabo en el citosol de la mayoría de las células, el proceso es realizado en ausencia de oxígeno molecular e implica una secuencia de 10 reacciones, produciendo un carbohidrato intermediario diferente por reacción, donde cada molécula de carbohidrato es catalizada por enzimas diferentes (Alberts B *et al.*, 2010). El piruvato generado a partir de la glucólisis tiene dos caminos: entrar en la mitocondria y convertirse en CO_2 y H_2O , o puede permanecer en el citosol y fermentarse en el caso de los organismos anaerobios como las levaduras convirtiéndose en etanol y CO_2 o en lactato en el músculo (Audesirk T *et al.*, 2003).

El ciclo de Krebs, ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o ciclo del ácido cítrico, tiene lugar en la mitocondria de las células eucariotas y las reacciones se realizan en presencia de oxígeno. En la etapa de preparación, el piruvato es descarboxilado por un complejo gigante de tres enzimas, denominado complejo piruvato deshidrogenasa. Los productos resultantes de la descarboxilación del piruvato son: la pérdida de una molécula de CO₂, la producción de una molécula de NADH y una de acetil coenzima A (acetil CoA) (Alberts B *et al.*, 2010). Posteriormente la acetil coenzima A entra en la mitocondria y se desprende del grupo acetilo, en seguida el grupo acetilo se combina con un compuesto de seis átomos de carbono llamado ácido oxaloacético, dando lugar al ácido cítrico (1er paso del ciclo de Krebs), iniciado el proceso en la mitocondria se realizan una serie de ocho reacciones de oxidación y descarboxilación diferentes, que dan como resultado oxalacetato o ácido oxaloacético, molécula esencial en la reacción inicial del ciclo. El ciclo de Krebs produce dos ATP, ocho NADH (dos de la síntesis de acetil CoA, seis del ciclo de Krebs) y dos FADH₂ por cada molécula de glucosa (Alberts B *et al.*, 2010; Audesirk T *et al.*, 2003).

Finalmente los electrones energéticos producidos por el ciclo de Krebs son conducidos a sistemas de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna donde son transformados en ATP, cada NADH produce tres moléculas de ATP y cada FADH genera dos moléculas de ATP, donde el total de las reacciones de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria suman un total de 36 a 38 ATP (Audesirk T *et al.*, 2003).

En 1923 Otto Warburg observó por primera vez que al cultivar células cancerosas en 13 mM de glucosa, las células producían 70 veces más lactato que las células normales. Por consiguiente Warburg determinó que las células cancerosas tienen acelerada la glucólisis y que a su vez producen una gran cantidad de ácido láctico incluso en condiciones

aeróbicas (Warburg O *et al.*, 1923). Según sus cálculos iniciales, la captación arterial de glucosa en las células tumorales fue hasta del 70% en comparación con los tejidos normales que captan del 2% al 18% de glucosa, adicionalmente observó que de la glucosa captada por el tumor era transformada a lactato en un 66% (San-Millán I y Brooks GA, 2017). Inicialmente Warburg sospechó que la razón de que las células cancerosas captaran mayor cantidad de glucosa y produjeran un gran porcentaje de lactato era porque estas células mostraban la respiración alterada debido a defectos funcionales en las mitocondrias (Tran Q *et al.*, 2016).

Estudios más recientes han esclarecido y reportado un sinnúmero de mutaciones en genes y enzimas que son importantes en la activación de mecanismos que regulan el funcionamiento adecuado de las células normales, estas alteraciones contribuyen en la proliferación exacerbada y el desarrollo de células cancerosas. Además, se considera que las células cancerosas no necesariamente tienen alteradas las funciones mitocondriales y que la glucólisis exacerbada se debe principalmente a una estrategia metabólica que es realizada por las células con el fin de regular la síntesis de biomasa: ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos grasos (Chen X *et al.*, 2015).

Aunque aún no se ha esclarecido completamente cuáles son los factores clave subyacentes al fenotipo metabólico del cáncer, se ha reportado al factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1), c-Myc y p53 como la triada más importante en el desarrollo del cáncer (Figura B).

Por ejemplo HIF-1 regula la expresión de genes y enzimas como: PDH, HKI, HKII, PDK-1, LDHA, GLUT1, GLUT3 y GLUT4, lo que favorece la angiogénesis, invasión, metástasis, dediferenciación y aumento en el metabolismo glucolítico de las células tumorales (Simon

MC, 2006; Boticario C y Cascales M, 2010; Labak CM *et al.*, 2016; Berg JM *et al.*, 2007; Marín-Hernández A, 2009; Brooks GA, 2009; Chen X *et al.*, 2015).

Por otra parte, el proto-oncogén MYC (c-Myc) es uno de los miembros de la familia oncogénica del factor de transcripción MYC que tiene la función de modular positivamente la biogénesis ribosómica, el metabolismo de la glucosa y la respiración mitocondrial en la mayoría de los tipos celulares, además de estimular el crecimiento y proliferación celular, también regula 18 genes mitocondriales, incluyendo citocromo C (Zwaans BM y Lombard DB, 2014).

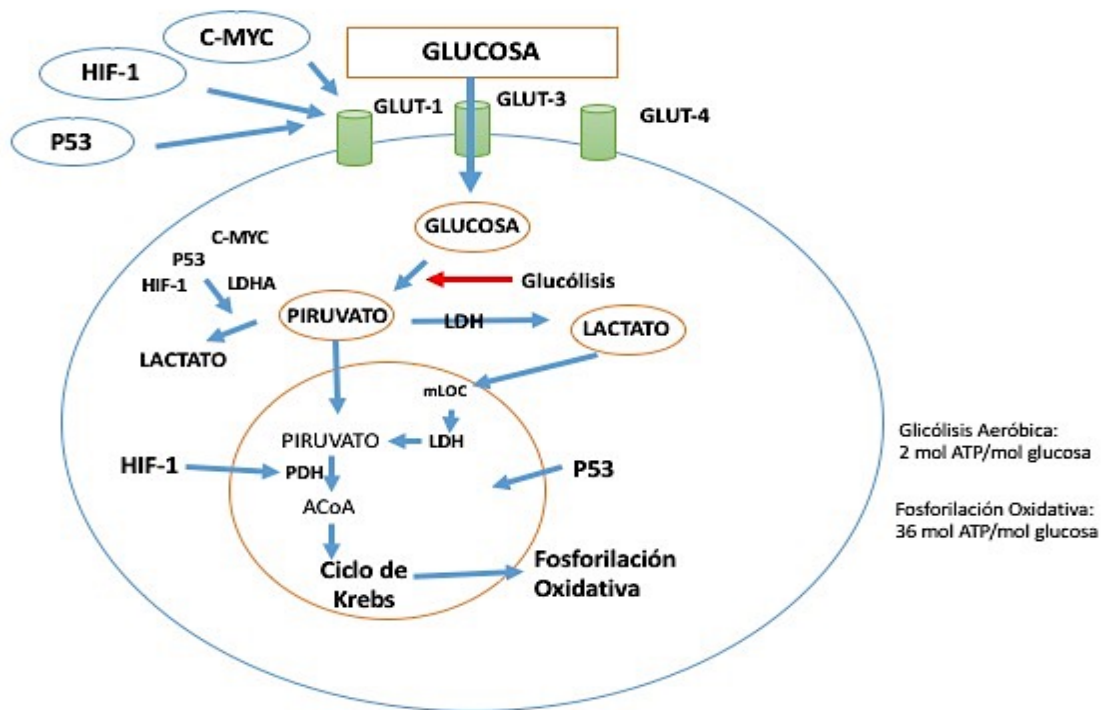


Figura B . Metabolismo de la glucosa (Tomado de: San-Millán I y Brooks GA, 2017).

2.3 Quimiocinas.

Las quimiocinas forman parte de una gran familia de proteínas de bajo peso molecular que varía de 7 a 15 kDa. Hasta la fecha han sido descritas al menos 50 quimiocinas, las cuales se encuentran definidas en función de la presencia y disposición de residuos de cisteína localizados en el extremo amino de la molécula (Torres DC y Marti LC, 2015; Bonecchi R y Graham GJ, 2016). Están divididas en cuatro subfamilias: la primera subfamilia se denominan de tipo CC debido a que presentan dos residuos de cisteína adyacentes, las quimiocinas CXC se caracterizan por tener un aminoácido que separa las dos cisteínas que la integran, las XC sólo tienen un residuo de cisteína en el extremo amino-terminal, y por último las de tipo CX3C se diferencian de las demás por poseer 3 aminoácidos que separan las dos primeras cisteínas (Bonecchi R y Graham GJ, 2016; Bachelierie F *et al.*, 2014).

Las quimiocinas son una familia de citocinas que son capaces de inducir la quimiotaxis de células diana (Singha B *et al.*, 2015). Inicialmente fueron descubiertas debido a que tienen la habilidad de dirigir de forma selectiva la migración de leucocitos (Raman D *et al.*, 2011) y otros tipos celulares; además de controlar el establecimiento de todas las células inmunes (Torres DC y Marti LC, 2015).

La acción de las quimiocinas se ejerce mediante la unión a receptores de siete pasas transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) presentes en membranas celulares (Gao D *et al.*, 2016), estos receptores son expresados en células del sistema inmune, células epiteliales y endoteliales, fibroblastos y queratinocitos, células no hematopoyéticas y células cancerosas (Rivas-Fuentes S *et al.*, 2015).

Los receptores de quimiocinas se pueden dividir en dos grupos: receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G, los cuales son activados por proteínas G del tipo G_i , y receptores de quimiocinas atípicos, los cuales le dan forma a los gradientes de quimiocinas y regulan la inflamación mediante la eliminación de quimiocinas de manera independiente de proteínas G (Torres DC y Marti LC, 2015). Una diferencia estructural determinante entre ambos receptores es la secuencia del motivo DRYLAIV que se encuentra localizado al final del motivo transmembrana 3, el cual se encuentra bien conservado en la mayoría de los receptores de quimiocina acoplados a proteínas G y pobremente conservada en receptores de quimiocinas atípicos (Bachelierie *et al.*, 2013).

Los receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G comprenden el grupo más numeroso de receptores de quimiocinas y se encuentran subdivididos dentro de cuatro subgrupos, definidos por cada uno de los cuatro subgrupos de quimiocinas a los que se unen. Además, pueden ser clasificados funcionalmente en homeostáticos, inflamatorios, e inflamatorios/homeostáticos (Bachelierie *et al.*, 2013).

La unión de las quimiocinas con sus receptores permite cambios conformacionales y la posterior activación de vías de señalización; las cuales juegan un rol importante permitiendo la activación constitutiva de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores, o la expresión alterada de factores de transcripción tanto en los casos donde las reacciones inflamatorias son normales, como en casos de reacciones aberrantes (Cheng ZH, 2016). Además, la relación entre quimiocinas y receptores de quimiocinas es compleja a consecuencia de la escasa selectividad entre una quimiocina y un receptor, debido a la estimulación de varios receptores por distintas quimiocinas, las cuales, a su vez, pueden unirse a diferentes receptores (Llorián M, 2016).

Recientemente se ha esclarecido la participación de las quimiocinas en la promoción de la progresión del cáncer. Por ejemplo, las quimiocinas en unión con sus receptores son capaces de inducir la proliferación de las células tumorales, la transición epitelio mesénquima, la angiogénesis y la metástasis (Cheng ZH *et al.*, 2016; Singha B *et al.*, 2015).

3. ANTECEDENTES.

Las quimiocinas y sus receptores participan de manera importante en el desarrollo del proceso neoplásico. En las últimas décadas el estudio de las funciones que regulan las quimiocinas en la progresión del cáncer ha ido en aumento, aunque en un principio su estudio fue debido a su función quimiotáctica. Uno de los ejes que más se ha reportado y estudiado es el conformado por la quimiocina CXCL12 (SDF-1) y el receptor CXCR4.

Se ha demostrado que la quimiocina CXCL12 es una quimiocina homeostática, la cual es expresada constitutivamente por varios órganos incluyendo pulmón, hígado, músculo esquelético, cerebro, riñón, corazón, piel y médula ósea, además está asociada con algunos tipos de daños tisulares, como el provocado por la quimioterapia (Teicher BA y Fricker SP, 2010). Por otro lado, el receptor de quimiocinas CXCR4 es ampliamente expresado en células progenitoras hematopoyéticas CD34+ (Möhle R *et al.*, 1998), leucocitos mononucleares (Oberlin E *et al.*, 1996), células T naïve y de memoria CD4+ (Mo H, *et al.* 1998), linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos (Teicher BA y Fricker SP, 2010), células epiteliales (Murdoch C *et al.*, 1999) y células endoteliales (Molino M *et al.*, 2000), así como también por cerebro, pulmón, colon, corazón, riñón e hígado (Teicher BA y Fricker SP, 2010).

En la línea celular PC-3 de cáncer de próstata se ha documentado que la quimiocina SDF-1 α regula de manera positiva la expresión de CXCR4, a través de NF- κ B. Además, se reportó que la unión SDF-1/CXCR4 favorece la migración transendotelial de las células de cáncer de próstata PC-3 hacia el estroma de la médula ósea (Kurkreja P *et al.*, 2005). También, se ha reportado que la unión del ligando CXCL12 al receptor de quimiocinas

CXCR4 promueve la activación de la cascada MAP cinasa y la movilización del calcio intracelular lo cual regula la migración y metástasis en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549 y Calu-1 (Phillips RJ *et al.*, 2003). Asimismo, se ha documentado que en células Ishikawa de cáncer de endometrio se encuentra regulada la proliferación, migración e invasión, y la reducción de la apoptosis, a través de la unión del ligando CXCL12 con el receptor CXCR4 (Liu P *et al.*, 2016). Además, otro estudio que se realizó en las líneas celulares H1299, A549 y H460 que corresponden a cáncer de pulmón de células no pequeñas reveló que la radiación aumenta la metástasis y la invasión en estas células cuando se une el ligando CXCL12 con el receptor de quimiocinas CXCR4, a través de la inducción de HIF-1 α , el cual regula de manera positiva la expresión de CXCR4 (Gu Q *et al.*, 2015).

Se sabe que la quimiocina SDF-1 (CXCL12) puede unirse no sólo con el receptor de quimiocinas CXCR4, sino también con CXCR7. En este contexto se ha documentado que la unión SDF-1/CXCR7 tiene una función clave en la promoción del desarrollo y progresión del tumor, puesto que se sugiere que esta unión favorece la migración de las células tumorales (Franco R *et al.*, 2012; Miao Z *et al.*, 2007). Además, se ha reportado la sobreexpresión de los receptores de quimiocinas CXCR7 y CXCR4 en células y tejidos tumorales provenientes de cáncer pulmonar (Iwakiri S *et al.*, 2009).

Una de las características más importantes en el desarrollo del cáncer es la alteración en el metabolismo energético de cada célula, el cual le permitirá a la célula proliferar rápida y descontroladamente, por esta razón es fundamental la incorporación de grandes cantidades de glucosa al microambiente tumoral.

Kruse CR y col. realizaron recientemente experimentos en los cuales aislaron queratinocitos primarios y fibroblastos de tejido humano que cultivaron en alta glucosa

(queratinocitos: 26 y 50 mmol/L; fibroblastos: 23 y 26 mmol/L) y normoglucosa (queratinocitos y fibroblastos 5.6 y 10 mmol/L), los resultados señalan que la viabilidad disminuye al cultivar ambos tipos celulares en concentraciones de alta glucosa durante un periodo de 5 días, además reportan que en el día 5 de cultivo, los fibroblastos aumentan su porcentaje de proliferación celular cuando son cultivados en concentraciones de 10 mM de glucosa con respecto a cultivos de 0, 5.6 y 23 mM. También, se reportó que existe inhibición en la migración de queratinocitos y fibroblastos cuando se cultivan en alta glucosa (26 mM y 23 mM, respectivamente) (Kruse CR *et al.*, 2016).

Por otra parte, en células endoteliales aórticas humanas (HAEC) se encontró que puede inhibirse la migración cuando son cultivadas en altas concentraciones de glucosa (10 o 30 mmol/L de glucosa) por medio de la inducción de la activación del factor nuclear kappa β (NF-kappa β) (Hamuro M *et al.*, 2002).

Además, otro estudio determinó que al cultivar células de cáncer gástrico en alta glucosa (17.5 mmol/L) se puede inhibir fuertemente la migración e invasión celular a través de la supresión de la transición epitelio-mesenquima cuando son tratadas con metformina (Valaee S *et al.*, 2017).

Adicionalmente, Qiao L y colaboradores realizaron estudios donde se muestra que células endoteliales microvasculares dérmicas humanas cambian su morfología cuando son cultivadas en alta glucosa. Las células cultivadas en normoglucosa (5 mM) tienen una morfología ovalada en forma de adoquín, sin embargo, cuando se cultivan en alta glucosa (30 mmol/L) su morfología es alargada en forma de adoquín. Además, mencionan que la proliferación en estas células aumenta cuando son expuestas por periodos cortos de tiempo (2-5 días) en alta glucosa, pero si se exponen más tiempo en esta concentración las células disminuyen su tasa proliferativa (7 días). También, se menciona que la migración de estas

células disminuye cuando son cultivadas en altas concentraciones de glucosa (Qiao L *et al.*, 2017).

Dicho lo anterior, cabe resaltar que en los últimos años se han realizado experimentos en que los resultados apuntan a que existe una relación entre la concentración de glucosa en cultivos celulares y la expresión de ciertas quimiocinas en algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha confirmado que en células endoteliales glomerulares humanas (HUGECS) la expresión de MCP-1 se encuentra altamente estimulada por altas concentraciones de glucosa (25 mmol/L), la sobreexpresión se consiguió a partir de las 8 horas hasta obtener un pico de expresión a las 16 horas de estimulación con glucosa, la elevada expresión de MCP-1 favorece la producción de factores quimiotácticos en monocitos (Ding HL *et al.*, 2004). Asimismo, estudios en ratones demuestran que el cultivo en alta glucosa de células mesangiales puede potenciar la proliferación y la expresión de MCP-1 activando la vía ROS/NF- κ B (Yang X *et al.*, 2016).

También, se ha descrito que las células endoteliales de cordón umbilical (HUVECS) cultivadas en alta glucosa (33.3 mmol/L de glucosa) inducen la expresión de la quimiocina Fractalkine/CX3CL1 (Li FQ *et al.*, 2015). Por otra parte, se han realizado estudios que determinan que en células mesangiales de rata cultivadas en altas concentraciones de glucosa (30 mmol/L) se estimula la expresión de MCP-1 y se activa NF-kappaB, lo cual favorece la proliferación de estas células, sin embargo, esta estimulación puede ser disminuida aplicando partenolida al cultivo (Xu Z *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se confirmó que en células endoteliales de cordón umbilical (HUVECS) se da una sobreexpresión de la quimiocina CCL5 y su receptor CCR5 cuando son cultivadas en alta glucosa (Li G *et al.*, 2013). Aunado a este resultado, Zhang JC y colaboradores reportaron sobreexpresión de CCL5 en células de linfoma difuso de linfocitos B grandes

cuando son cultivadas en concentraciones de glucosa altas (30 mmol/L), además la exposición en alta glucosa promueve el crecimiento tumoral en estas células (Zhang JC *et al.*, 2015).

También se ha reportado que al cultivar células madre mesenquimales óseas (BMSCs) en alta glucosa se inhibe la expresión de CXCR4 mediante la activación de GSK3 β , además, de la proliferación y migración celular (Zhang B *et al.*, 2016).

Asimismo, se ha reportado que en células Jurkat cultivadas durante 24 horas en alta glucosa extracelular (15, 20, 25 y 30 mM) se regula positivamente la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4, además la sobreexpresión de CXCR4 se encuentra favorecida por HIF-1 α bajo las mismas condiciones de cultivo en alta glucosa extracelular (Lan X *et al.*, 2013). También se ha documentado que la quimiocina SDF-1 α regula de manera positiva la expresión del receptor CXCR4 en células VSMCs de rata cultivadas en alta glucosa (25 mM), y que a su vez, la unión de SDF-1 α con CXCR4 favorece la proliferación y migración de estas células bajo condiciones de alta glucosa extracelular (Jie W *et al.*, 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es la principal causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Particularmente, el carcinoma mucoepidermoide se caracteriza por un crecimiento incesante, así como también, por su agresividad, debido a su resistencia a la terapia sistémica y radioterapia.

Para satisfacer las demandas energéticas, las células cancerosas presentan una serie de mutaciones en genes y enzimas, las cuales favorecen la captación de glucosa y promueven la producción de una gran cantidad de ácido láctico incluso en condiciones aeróbicas, acelerando el metabolismo glucolítico. El aceleramiento de la glucólisis es uno de los mecanismos que contribuye a la proliferación exacerbada y el desarrollo de células tumorales.

Las quimiocinas pertenecen a una gran familia de proteínas que al unirse con su receptor de membrana inducen la proliferación de las células tumorales, la transición epitelio mesénquima, la angiogénesis y la metástasis. En las últimas décadas uno de los ejes de quimiocinas que más se ha estudiado es el conformado por CXCL12 y su receptor CXCR4. Se ha reportado que la unión de esta quimiocina con el receptor CXCR4 promueve la proliferación de células tumorales, así también su migración, invasión y metástasis.

Recientemente se han realizado estudios enfocados al metabolismo energético de células cancerosas y su relación con las quimiocinas. Algunos de estos estudios han confirmado que en células Jurkat se presenta un aumento en la expresión del receptor de quimiocinas

CXCR4 cuando son cultivadas en alta glucosa extracelular, Además, en células endoteliales glomerulares humanas, y células mesangiales de ratón y rata se encuentra una sobreexpresión de la quimiocina CCL2 , también en células endoteliales de cordón umbilical se promueve la expresión de CX3CL1 y CCL5, todo lo anterior bajo condiciones de cultivo en alta glucosa.

Dado que hasta el momento no se han generado estudios que reporten el efecto de la concentración de glucosa en la expresión y función de las quimiocinas en cultivos de células de cáncer de pulmón, el presente trabajo pretende determinar si el cultivo en alta glucosa modifica la expresión del receptor CXCR4 en células de carcinoma mucoepidermoide de pulmón y si el efecto resultante se correlaciona con la proliferación y migración de este tipo celular, respuestas funcionales asociadas a dicho receptor. Para ello se utilizará la línea H292 derivadas de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón.

5. HIPÓTESIS.

El cultivo en alta glucosa incrementa la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 y el fenotipo agresivo de las células de carcinoma mucoepidermoide de pulmón (H292), la cuales incrementarán su proliferación y migración.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General.

Determinar si las células de carcinoma mucoepidermoide de pulmón H292 modifican la expresión del receptor CXCR4 en condiciones de cultivo de alta glucosa y si existe alguna asociación con las respuestas funcionales: proliferación y migración, asociadas a dicho receptor.

6.2. Objetivos particulares.

Las células de cáncer pulmonar H292 se cultivarán en diferentes concentraciones de glucosa (5.5, 11, 25 mmol), en estas condiciones se evaluarán los siguientes objetivos:

1. Evaluar la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4.
2. Evaluar los niveles de expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 en presencia de CXCL12.
3. Evaluar la migración celular regulada por CXCR4 mediante ensayos de herida.
4. Evaluar la tasa de proliferación.
5. Evaluar la activación de la vía glucolítica a través de la relación piruvato/lactato.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Cultivo celular.

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular H292 derivada de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón. Las células H292 son originarias de una mujer de 32 años, presentan una morfología epitelial y son adherentes al plástico (ATCC, 2017). Esta línea celular fue proporcionada por el laboratorio de inmunopatogénesis celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), la cual fue previamente adquirida del ATCC (ATCC, 2017).

La línea celular fue mantenida y crecida en medio RPMI 1640 1X D(-)-glucosa (Gibco/BRL Life Technologies, Grand Island, New York, EUA) suplementado con HEPES 10mM (Gibco/BRL Life Technologies, Grand Island, New York, EUA), piruvato de sodio 10 mM (Gibco/BRL Life Technologies, Grand Island, New York, EUA), suero fetal bovino al 10%, antibióticos y 5.5 mM de D(+)-glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) en incubadora a 37°C con una mezcla de 5% de CO₂/95% de humedad relativa y en condiciones de esterilidad.

Durante los ensayos se trataron las células H292 con diferentes concentraciones de glucosa: 5.5 mM (normoglucosa), 11 mM y 25 mM (alta glucosa). Para definir cada condición se tomó en consideración el rango de concentración de glucosa plasmática normal en personas sanas y la concentración de glucosa a partir de la cual se determina a

un paciente diabético según la OMS; el primero se encuentra entre 4.4 a 5.5 mM de glucosa, y el segundo es considerado a partir de los 7 mM de glucosa (OMS, 2017).

7.2 Tinción de antígenos extracelulares para citometría de flujo.

Para evaluar los niveles de expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 en condiciones de alta glucosa se realizó tinción de antígenos extracelulares.

Las células fueron sembradas en una placa de 12 pozos con el objetivo de obtener el 80% de confluencia el día de la tinción, se cultivaron 150 000 células por pozo, éstas células fueron cultivadas con medio RPMI suplementado bajo las condiciones previamente descritas con una concentración de 5.5 mM de glucosa. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturante durante 24 horas.

Después del tiempo de incubación las células fueron lavadas con 500 µL de PBS y posteriormente fueron estimuladas con 400 µL de la quimiocina SDF-1 (CXCL12) (BioLegend, EUA) en concentraciones de: 0, 10, 50 y 100 ng/ml bajo condiciones de normoglucosa y alta glucosa (5.5, 11 y 25 mM). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturante durante 24 horas más.

Finalizado el tiempo de incubación y con el objetivo de determinar en un ensayo posterior el nivel de metabolitos (lactato y piruvato), se colectaron los medios de los pozos en tubos eppendorf de 2 ml, los cuales fueron centrifugados en una microcentrífuga (Eppendorf N° 5415 C, Brinkmann Instruments Inc, EUA) a 900 x g durante 10 minutos a temperatura

ambiente, al término de la centrifugación el sobrenadante fue recolectado en tubos eppendorf nuevos para finalmente ser etiquetados y almacenados a -40°C .

Posteriormente las células fueron lavadas con $400\ \mu\text{L}$ de PBS y se adicionaron $250\ \mu\text{L}$ de buffer de disociación celular no enzimático (Gibco/BRL Life Technologies, EUA), dejándolas incubar a 37°C durante 12 minutos, posteriormente las células fueron despegadas por pipeteo (evitando maltratarlas o formar burbujas) y colectadas en un tubo eppendorf de 2 ml al cual se le adicionó previamente 1 ml de medio RPMI 1640 1X (Gibco/BRL Life Technologies, EUA) sin suplemento.

Las células fueron centrifugadas a $250\ \times\ g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente, al finalizar el tiempo de centrifugado se colectó el sobrenadante y se deshizo el botón celular. Posteriormente se resuspendieron las células en 1ml de buffer de tinción (BT) (BioLegend, EUA) y de la suspensión se tomaron $10\ \mu\text{L}$, los cuales fueron mezclados homogéneamente en Parafilm con $10\ \mu\text{L}$ de azul tripano, finalmente se colocaron $10\ \mu\text{L}$ de la mezcla en una cámara Neubauer para realizar conteo celular.

Después de realizar el conteo, las células fueron centrifugadas a $250\ \times\ g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser ajustadas a una concentración de 1×10^6 cel/ml en BT.

A continuación, las células previamente ajustadas fueron bloqueadas con BT durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se tomaron por condición 50 000 células; esto es $50\ \mu\text{L}$ de la suspensión celular. Posterior a la incubación las células fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal CXCR4 a una concentración de 250 ng/ml (BioLegend, EUA). Se incubaron las células durante 25 minutos a 4°C protegidas de la luz.

Finalizado el tiempo de incubación, se agregaron 300 μ L de BT y se centrifugaron las células nuevamente a 250 x g, durante 5 minutos a temperatura ambiente, después del centrifugado se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 250 μ L de BT, las células se colocaron en hielo para su posterior adquisición en el citómetro Accuri C6, configuración 3-1.

7.3 Ensayo de herida

Para evaluar la capacidad de migración de las células H292 se realizó ensayo de herida, por experimento se utilizó una placa de 96 pozos en la cual se sembraron 30,000 células por pozo, las células fueron cultivadas con 100 μ L de medio RPMI suplementado al 10% de SFB, antibióticos y 5.5mM de glucosa e incubadas durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ y humedad.

Al finalizar el tiempo de incubación se realizaron las diluciones con las concentraciones correspondientes para la estimulación con la quimiocina SDF-1 (0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml y 100 ng/ml) en medio RPMI suplementado al 1% de SFB con 5.5, 11 y 25 mM de glucosa, además se incluyó como control de osmolaridad 5.5, 11 y 25 mM de Mannitol al 1% de SFB. Después de haber realizado las diluciones se retiró el medio de cultivo de las células en monocapa y se realizó un lavado con 100 μ L de PBS, a continuación se agregaron 100 μ L de medio RPMI sin suplemento con 5.5mM de glucosa y 1% de SFB, posteriormente se incubó la placa durante 1 (ó 1 h. 30 minutos) hora. Al término de la incubación se realizó por pozo, con una punta de 10 μ L estéril, una raya horizontal (herida) a lo largo de la monocapa, inmediatamente se retiró el medio de los pozos y se realizó un lavado con 100 μ L de PBS para retirar células que se encontraran flotando en el medio, finalmente se

colocaron 100 μ L del estímulo correspondiente. Cada serie de condiciones experimentales se realizó por triplicado.

Las células fueron incubadas durante 6 horas a 37°C con 5% de CO₂ en un ambiente de humedad saturante. Para fijar las células posterior al tiempo de incubación, se agregó por pozo 100 μ L de metanol y la placa fue incubada durante 15 minutos a -20°C, al finalizar la incubación las células fueron lavadas dos veces con 100 μ L de PBS, al término del segundo lavado se agregaron 100 μ L de PBS, en seguida se guardó la placa a -4° C para su posterior fotodocumentación.

Cada condición fue fotodocumentada a las 0 y 6 horas con ayuda de un microscopio invertido con contraste EVOS XL (ThermoFisher Scientific, EUA), enfocando el área donde se realizó la herida. Las imágenes fueron analizadas posteriormente con ayuda del programa de procesamiento de imagen digital ImageJ.

7.4 Análisis de herida por ImageJ.

Para realizar análisis de herida por ImageJ fue necesario instalar el programa en la PC, posteriormente se abrió la ventana del programa y se seleccionó la opción marcada como **MRI_Wound_Healing_Tool**, ésta opción contiene las herramientas necesarias para calcular el área de la herida al presionar en la barra de herramientas la opción “m” (measure). Finalmente el programa muestra en tres ventanas el análisis realizado, en una de las tres ventanas se puede observar el valor del área que fue calculada como se muestra en la **Figura D**.

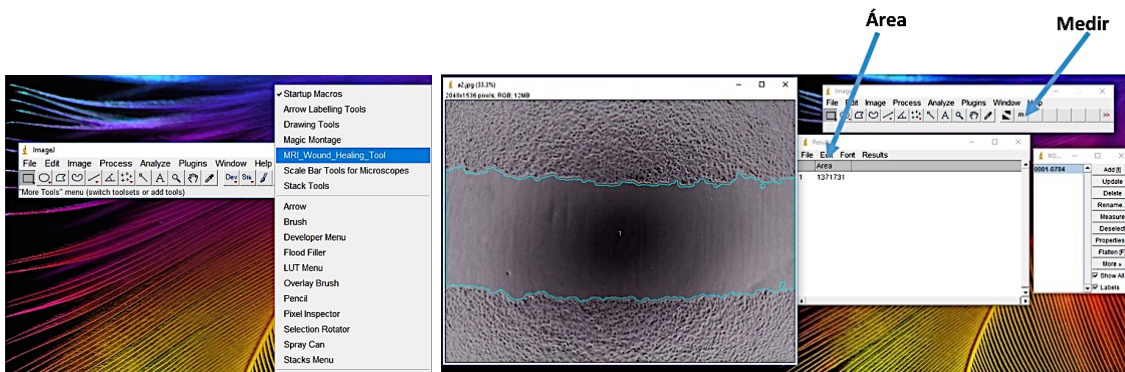


Figura D. Análisis de herida por ImageJ.

7.5 Ensayo de proliferación celular con CFSE.

El compuesto que se utilizó para marcar las células y medir la tasa proliferativa de la línea celular H292 fue el carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE), esta sonda fluorescente tiene la propiedad de ser altamente permeable a la membrana celular debido a sus dos cadenas de acetato, sin embargo, una vez adentro de la célula, los grupos acetato son escindidos por esterasas intracelulares, lo cual permite que el carboxyfluorescein salga de la célula de manera más lenta, favoreciendo que el CFSE se una covalentemente a moléculas intracelulares en un amplio rango de tiempo.

El acoplamiento es a través del succinimidilo, el cual reacciona con grupos amino, formando un enlace amida altamente estable que puede unir covalentemente la 5- (y 6)-carboxifluoresceína (CF) a moléculas intracelulares. En algunos casos, el CF se une covalentemente a moléculas intracelulares (R_1-NH_2) para formar conjugados (CFR1) que todavía pueden salir de la célula o se degradan rápidamente, sin embargo, una proporción de CF se acopla a moléculas intracelulares de larga vida (R_2-NH_2) para formar conjugados (CFR2) que no pueden escapar de la célula y por lo tanto, se logra un marcaje fluorescente estable en las células. Al dividirse las células el colorante se reparte proporcionalmente

entre las dos células hijas lo que permite observar una disminución de la fluorescencia cuando se analiza por citometría de flujo.

Para este ensayo se sembraron en placa de 12 pozos 20,000 células por condición (5.5, 11 y 25 mM), por cada condición se sembraron 4 pozos y se cultivaron en medio RPMI suplementado al 10% de SFB, antibióticos y 5.5mM de glucosa. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturante durante 24 horas. Para realizar el ensayo se tomaron 2 pozos por condición para su posterior marcaje con CFSE y los 2 pozos restantes se utilizaron como control del marcaje.

Por otra parte, se preparó una dilución de CFSE (BioLegend, EUA) con una concentración de 10µM. Para realizar la dilución se agregaron 2 µl de CFSE (5 mM) en 2ml de PBS estéril, el cual fue pre-calentado durante 5 minutos a 37°C.

Después de la incubación las células fueron lavadas con 300 µl de PBS y posteriormente se agregaron 250 µl de la dilución pre-calentada de CFSE, la placa fue incubada durante 15 minutos a 37°C con 5% de CO₂, en la obscuridad. Finalizado el tiempo de incubación se agregó por pozo marcado, 150 µl de medio RPMI suplementado al 10% de SFB en 5.5mM de glucosa y la placa fue incubada bajo las condiciones previamente descritas durante 5 minutos más. Al terminar la incubación se retiró el sobrenadante del pozo y se lavó con 400 µl PBS en dos ocasiones. Para finalizar se agregaron 800 µl de medio RPMI suplementado al 10% de SFB con 5.5, 11 y 25 mM de glucosa por pozo, respectivamente. Posteriormente se lavaron los pozos con 400 µl de PBS, a continuación se agregaron 800 µl de medio correspondiente por condición (5.5, 11 y 25 mM de glucosa).

Los pozos control fueron lavados con 400 µl de PBS y posteriormente se agregaron 800 µl de medio bajo condiciones de normoglucosa y alta glucosa previamente mencionadas.

Finalmente se despegó con tripsina un pozo marcado con CFSE y un pozo control para su posterior adquisición y análisis por citometría de flujo.

7.6 Determinación de la concentración de piruvato y lactato.

Con la finalidad de evaluar la tasa glucolítica se determinó la concentración de piruvato y lactato producida por las células H292 cultivadas bajo condiciones de normoglucosa y alta glucosa, se analizaron los medios condicionados obtenidos a partir de los ensayos de inmunotinción realizados previamente (5.5, 11 y 25 mM sin SDF-1).

Para realizar las determinaciones se descongelaron los medios condicionados y se desproteinizaron previamente las muestras que se utilizarían para medir la concentración de lactato con un microfiltro de Amicon (10 kDa MWCO). Primero se colocó el filtro de Amicon en el tubo proporcionado por el fabricante, posteriormente se adicionaron 500 μ l de la muestra a determinar en el microfiltro, enseguida se centrifugó el tubo a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, y para finalizar fueron congeladas a – 20°C. En adelante, el procedimiento fue el mismo para ambas determinaciones piruvato y/o lactato.

Después de la obtención del filtrado se preparó la mezcla enzimática para la determinación de lactato (o piruvato), la cual fue reconstituida en 220 μ l de buffer de ensayo de lactato y mezclada perfectamente para su posterior utilización.

Para generar una solución estándar de lactato con una concentración de 1 nmol/ μ l de lactato se diluyeron 10 μ l del estándar de lactato original (100 nmol/ μ l), con 990 μ l del buffer de ensayo de lactato. El estándar original se encontraba ya preparado dentro del kit.

Así también, se preparó la Master Reaction Mix, tomando en cuenta que por cada muestra a evaluar se necesitan 50 μ l. Para preparar 50 μ l de la Master Reaction Mix se utilizó el

reactivo correspondiente a cada determinación (lactato o piruvato, cual sea el caso) 46 μ l del buffer de ensayo de lactato, 2 μ l de solución de sonda de lactato y 2 μ l del mix de la enzima de lactato, el cual fue cubierto de la luz.

Posteriormente en una placa de 96 pozos se colocaron 50 μ l de la muestra a determinar.

Se preparó una curva del estándar de lactato (o piruvato) con las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol de lactato/pozo, después se adicionaron 50 μ l de la Master Reaction Mix a cada pozo, se mezcló muy bien por pipeteo, finalmente se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz.

Después del tiempo de incubación se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de Elisa.

Cabe mencionar que la cantidad de lactato o piruvato presente en cada muestra fue determinada a partir de los valores obtenidos de la curva estándar correspondiente.

7.7 Análisis Estadístico.

Se realizó la normalización de los datos obtenidos mediante Excel v.15.25 y

en el caso de los resultados de migración se realizó prueba “t” de Student, donde los valores se muestran como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas a $p \leq 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Morfología y viabilidad en células H292 cultivadas en condiciones de normoglucosa y alta glucosa.

Para evaluar la morfología y viabilidad de la línea celular H292 en condiciones de normoglucosa y alta glucosa las células fueron sembradas al 80% de confluencia en una placa de 12 pozos. Posteriormente se cultivaron durante 24 horas en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa y después se tiñeron con el colorante de exclusión azul tripano al 0.4%. Para realizar la evaluación de las células teñidas con azul de tripano, las células H292 fueron fotodocumentadas antes y después de la tinción con azul de tripano. Cada condición fue evaluada por cuadruplicado y el experimento fue repetido en tres ocasiones. Los resultados observados en la Figura 1 indican que no existen cambios morfológicos entre las células cultivadas en normoglucosa y alta glucosa.



Figura 1. Células H292 a las 24 horas de cultivo en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa, fotodocumentadas con un aumento 20X y zoom digital. Evaluación realizada por cuadruplicado, n=3.

En la Figura 2 se muestran los resultados que se obtuvieron a partir de la tinción con azul de tripano; el azul tripano es un colorante que únicamente puede teñir aquellas células que han comprometido su membrana. Las células teñidas con el colorante de exclusión fueron señaladas con una flecha como se observa en la Figura 2, cualitativamente no se encuentran diferencias en la viabilidad de las células H292 entre condiciones de normoglucosa y alta glucosa.

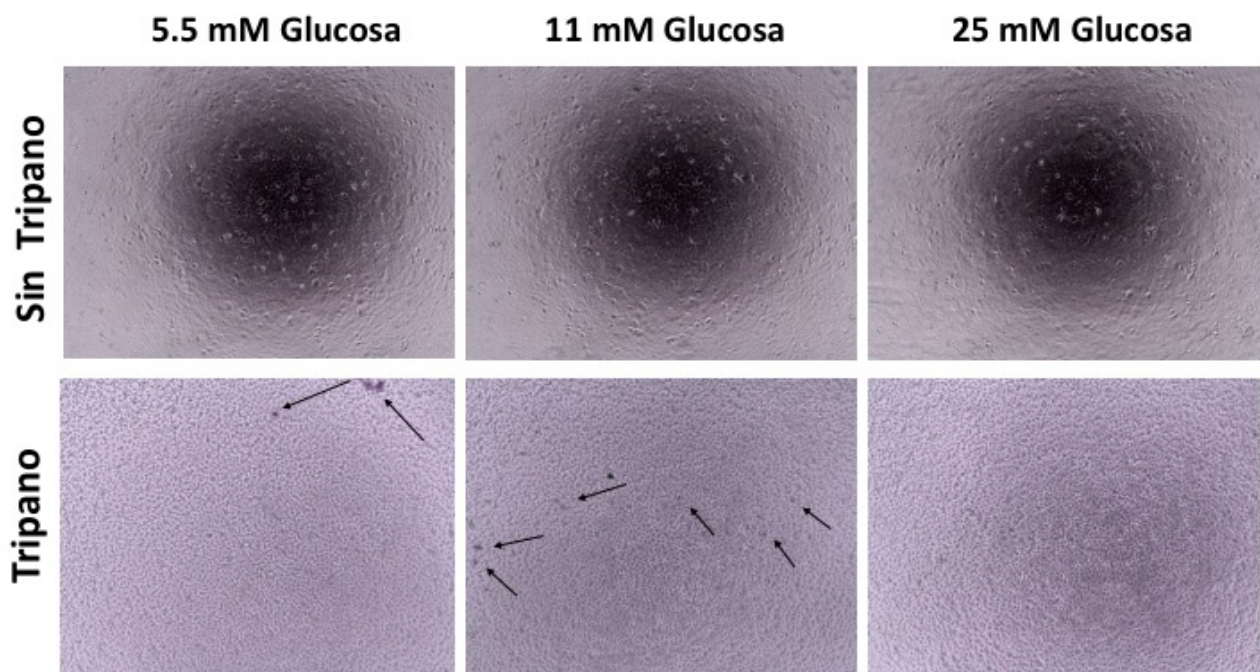


Figura 2. Células H292 cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa teñidas con azul de tripano y fotodocumentadas a las 24 horas de cultivo con un aumento 10X. Evaluación realizada por cuadruplicado con una n=3.

Así mismo, se evaluó la viabilidad de las células H292 cuando son cultivadas en manitol; el control de osmolaridad utilizado en el ensayo de herida. Para ello se realizaron cultivos de 24 horas en 5.5, 11 y 25 mM de manitol, posteriormente se tiñeron con azul de tripano y se fotodocumentaron, cada condición se evaluó por triplicado y se repitió en tres ocasiones de manera independiente. Los resultados que se obtuvieron del cultivo se muestran en la

Figura 3, se puede observar que en ninguna de las 3 condiciones evaluadas se ven afectadas las células H292 debido a la concentración de manitol utilizada.

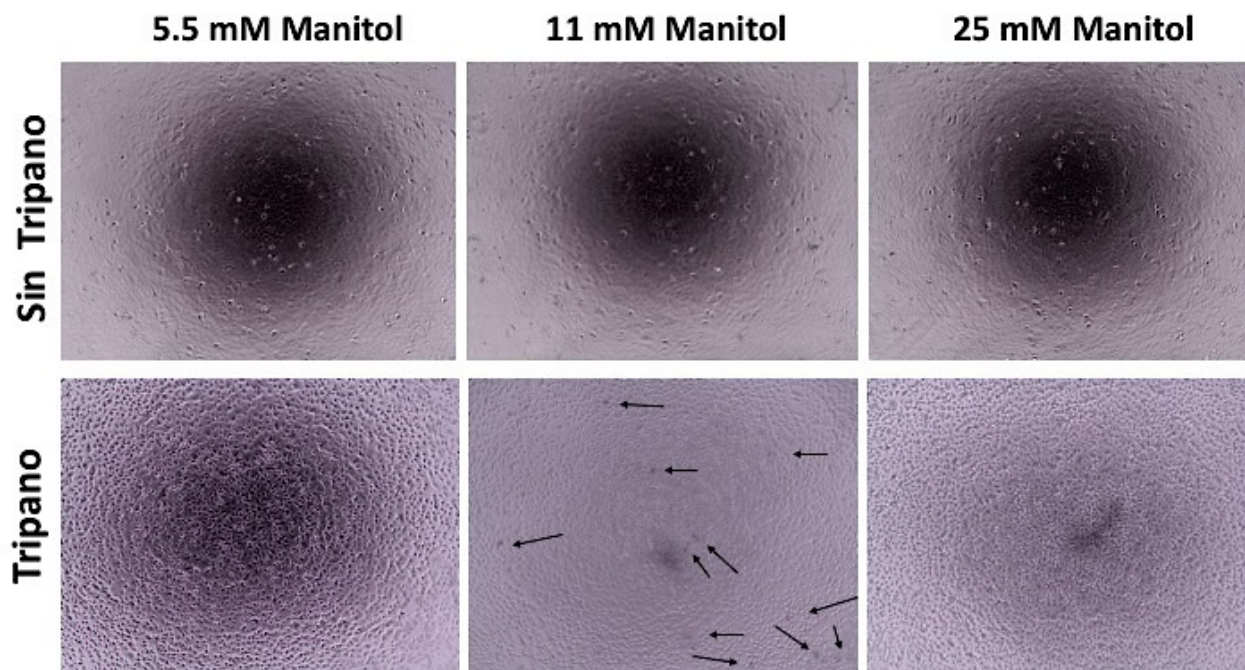


Figura 3. Células H292 cultivadas 24 horas en 5.5, 11 y 25 mM de manitol y posteriormente teñidas con azul de tripano. Las células fueron fotodocumentadas con un aumento 10X. Evaluación realizada por triplicado con una n=3.

8.2 Inmunotinción para CXCR4 en sangre completa (monocitos y linfocitos) como control de calidad del anti-CXCR4.

Con el fin de comprobar el buen funcionamiento del anticuerpo monoclonal CXCR4, se realizó inmunotinción en células de sangre completa. Para realizar la inmunotinción se tomaron en cuenta tres condiciones; 4X (con una relación 50 μ l: 5 μ l. Por cada 50 μ l de sangre completa se utilizaron 5 μ l del anticuerpo), 2X (50 μ l: 2.5 μ l), 1X (50 μ l: 1.25 μ l). Posterior a la inmunotinción se adquirieron las células en el citómetro Accuri C6.

En la Figura 4. se puede observar que las células mononucleares (monocitos Figura A1 y linfocitos Figura A2) fueron correctamente teñidas con el anticuerpo y que la funcionalidad de los mismos no se encuentra relacionada con las concentraciones de anticuerpo utilizadas por condición evaluada. Finalmente la condición determinada a utilizar en las posteriores inmunotinciones fue de 1.25 μ l de anti-CXCR4 por cada 50,000 células.

8.3 Inmunotinción para HLA-ABC en células H292 como control técnico de tinción.

Por otra parte, para validar la técnica de inmunotinción en las células H292, se utilizó el anticuerpo monoclonal dirigido a HLA-ABC en células H292. Para ello se realizó inmunotinción en células H292 con el anticuerpo HLA-ABC, como se describe en la metodología. En la Figura 4.B2 podemos observar una expresión del 91% del anticuerpo HLA, a partir de un 74% de células individuales, lo cual nos permite determinar el buen funcionamiento de la técnica de inmunotinción establecida para los posteriores ensayos.

8.4 Expresión basal de CXCR4 en células H292 cultivadas en normoglucosa y alta glucosa extracelular.

En otro contexto, para determinar la expresión basal del receptor de quimiocinas CXCR4 en cultivos de normoglucosa y alta glucosa, las células H292 fueron cultivadas durante 24 horas en un medio de cultivo conteniendo 5.5, 11 y 25 mM de glucosa, posteriormente se realizó inmunotinción con anti-CXCR4 y finalmente se evaluaron las células por citometría de flujo. En los Dot-Plot mostrados en la Figura 5 se puede observar una expresión basal no mayor al 2.58% (11 mM de glucosa) del receptor CXCR4 en células H292. Además, al comparar la expresión de CXCR4 en la condición con 5.5 mM de glucosa (2.56%) con respecto a la que se obtuvo en las condiciones con 11 mM y 25 mM (2.85% y 2.13%, respectivamente), no se encontraron diferencias significativas. Lo cual indica que las células H292 presentan una expresión mínima del receptor CXCR4, y que el cultivo en alta glucosa no regula la expresión del mismo.

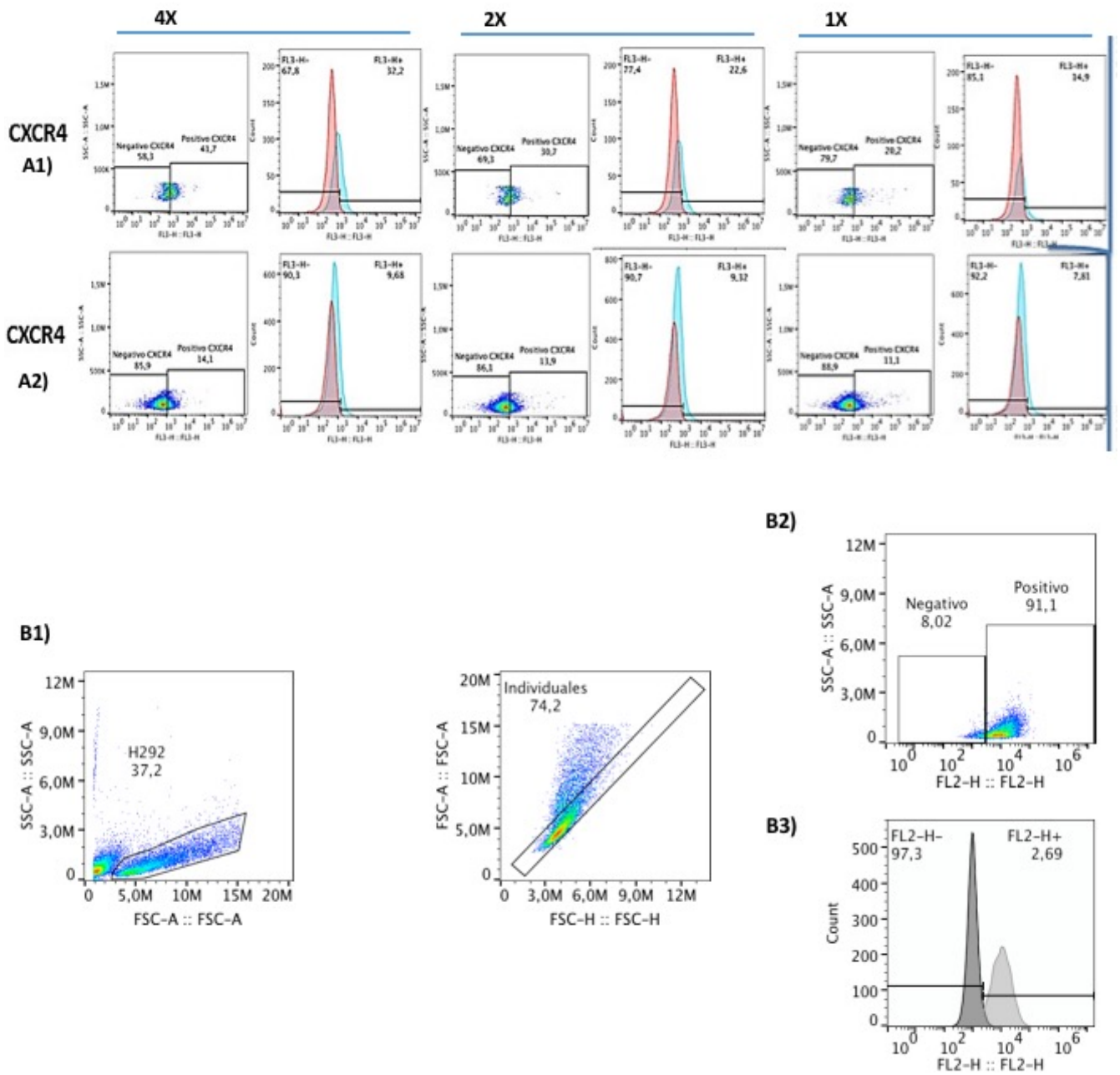


Figura 4. Inmunotinción con anti-CXCR4 (4X, 2X y 1X) en sangre periférica; monocitos y linfocitos (A1 y A2, respectivamente) e inmunotinción con anti-HLA-ABC en células H292 (B2 y B3), n=1.

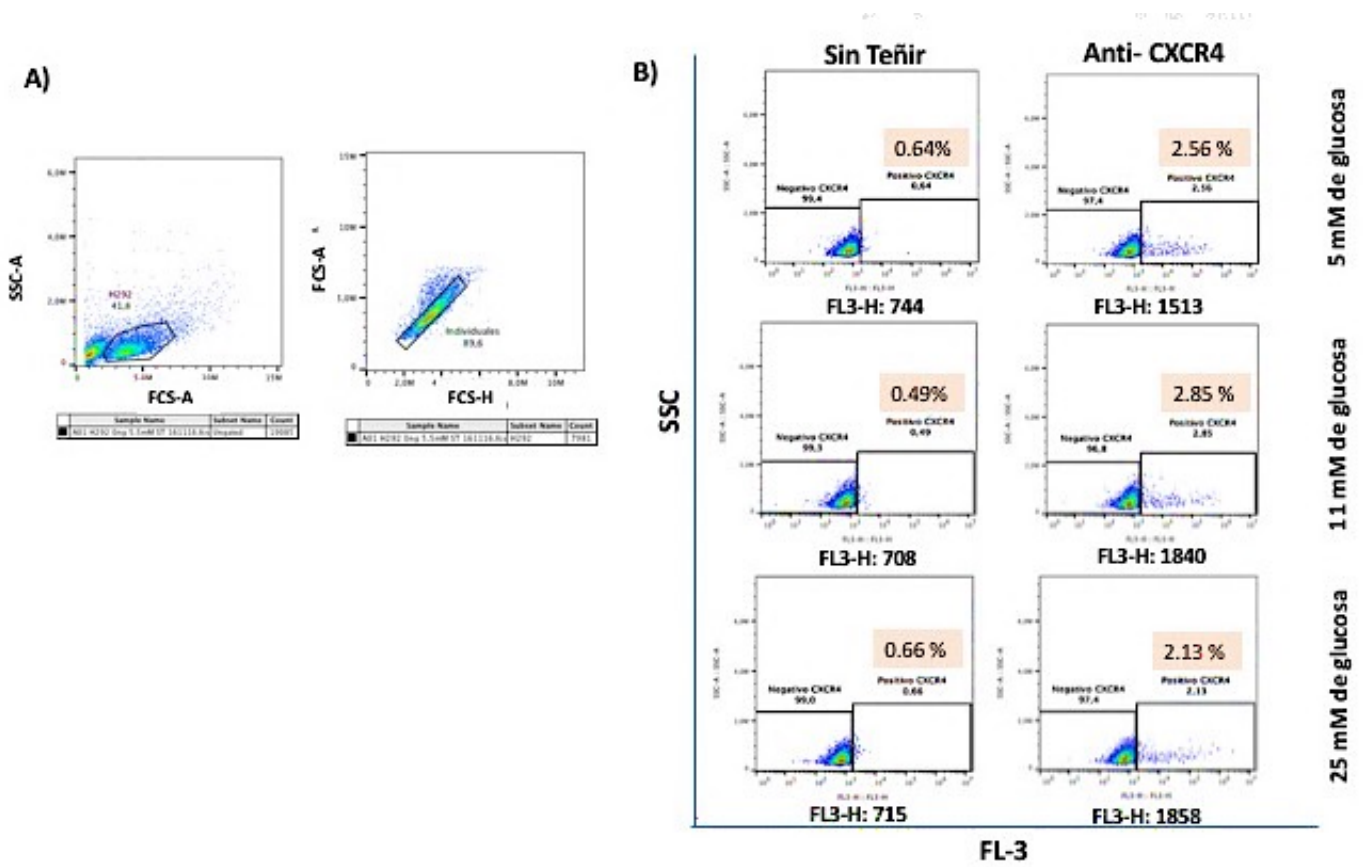


Figura 5. Expresión de CXCR4 en células H292 cultivadas en normoglucosa y alta glucosa (5.5, 11 y 25 mM) durante 24 horas. A) Dot-Plot izquierda. Muestra la región de células H292 tamaño contra granularidad. Dot-Plot derecha. Se muestra la selección de células individuales. B) Dot-Plot de células H292 teñidas con anti-CXCR4 y sin tinción, cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa, n=3.

8.5 Inmuntinción para CXCR4 en células H292 estimuladas con SDF-1 y cultivadas en normoglucosa y alta glucosa.

Para evaluar el efecto en la expresión de CXCR4 en células H292 bajo el estímulo de 24 horas con SDF-1 (0, 10, 50 y 100 ng/ml) en cultivos con normoglucosa y alta glucosa, se realizó inmuntinción con anti-CXCR4. La Figura 6 (derecha), muestra los Dot-Plot de los porcentajes de expresión de CXCR4 que se obtuvieron a partir de un experimento de inmuntinción, en ellos se observa que el mayor porcentaje de expresión que se obtuvo del receptor CXCR4 fue del 2.81% (5.5 mM de glucosa y 100 ng/ml de SDF-1), el cual no aumentó a pesar del estímulo con SDF-1, en comparación con la expresión basal observada con anterioridad en estas células (Figura 5).

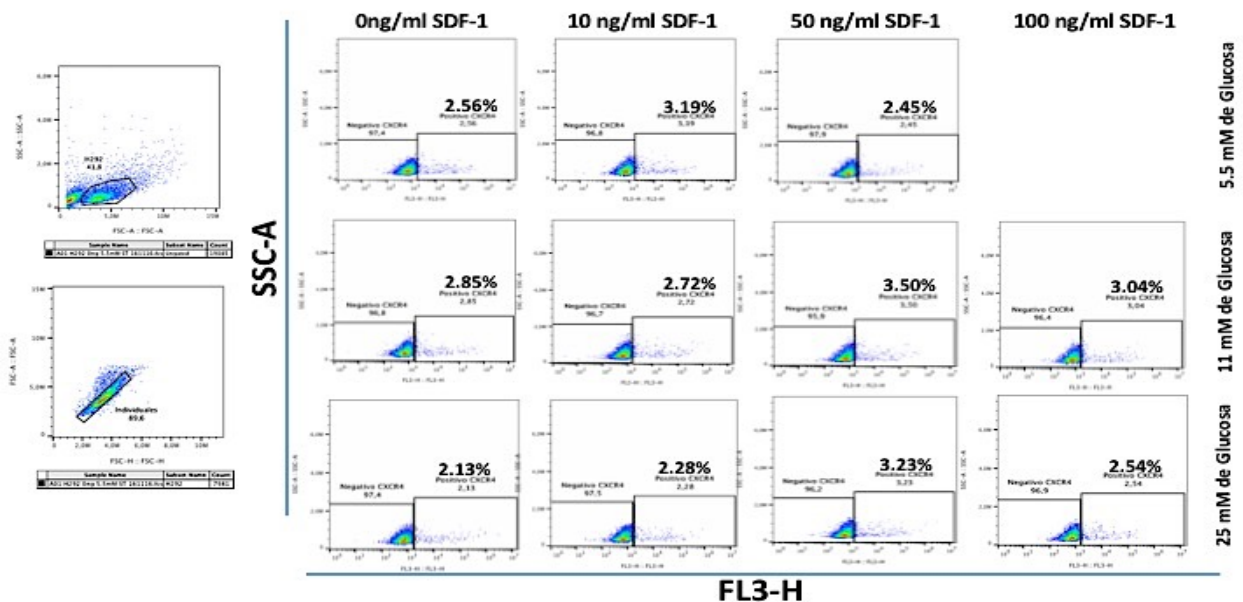


Figura 6. Porcentaje de expresión de CXCR4 en células H292 previamente estimuladas durante 24 horas con SDF-1 (0, 10, 50 y 100 ng/ml), y cultivadas en normoglucosa y alta glucosa (5.5, 11 y 25 mM). Los resultados observados en los Dot-Plot muestran los porcentajes de expresión de CXCR4 que se obtuvieron a partir de un experimento de inmuntinción independiente.

Adicionalmente, se realizó la evaluación de 5 experimentos independientes para determinar el porcentaje de expresión de CXCR4 en células H292 cultivadas en condiciones de normoglucosa y alta glucosa extracelular. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7A, en ellos se puede observar que el receptor CXCR4 se encuentra expresado en la línea celular H292 cultivadas en normoglucosa y alta glucosa extracelular. Además, los porcentajes entre condiciones no presentan diferencias significativas, teniendo como porcentaje mínimo el 3.7% en la condición con 25 mM de glucosa y 10 ng/ml de SDF-1, y como porcentaje de expresión máximo el 5% en la condición con 11 mM de glucosa y 100 ng/ml de SDF-1. Lo que parece indicar que la expresión del receptor CXCR4 no se encuentra regulada por SDF-1 en condiciones de normoglucosa y alta glucosa extracelular, al comparar estos resultados con los obtenidos previamente de la expresión basal de CXCR4 en estas células.

Adicionalmente, para descartar una posible diferencia en las intensidades de fluorescencia media entre condiciones evaluadas, se realizó el promedio de las mismas, a partir de los experimentos de inmunotinción mencionados con anterioridad. En la Figura 7B se puede observar la máxima IFM en la condición con 11 mM de glucosa y 100 ng/ml de SDF-1 (2400) y la mínima IFM se presentó en la condición con 11 mM de glucosa y 50 ng/ml de SDF-1 (1900). Las diferencias entre los resultados que se obtuvieron a partir de la IFM no muestran diferencias importantes entre condiciones evaluadas, ni un aumento en la expresión de CXCR4 favorecido por el estímulo de SDF-1.

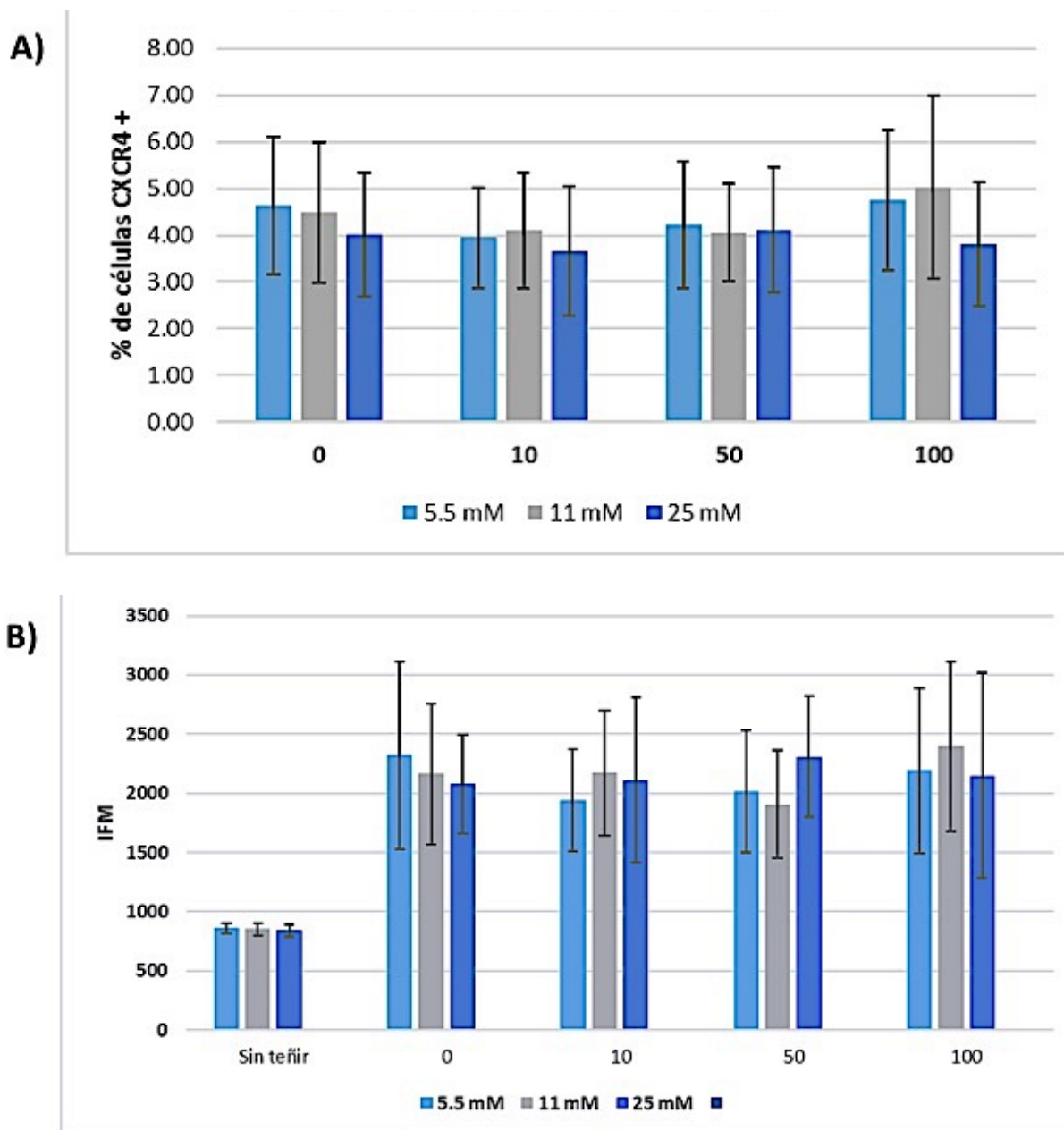


Figura 7. Evaluación de la expresión de CXCR4 en células H292 cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa y estimuladas durante 24 horas con SDF-1 (0, 10, 50 y 100 ng/ml), n=5.

A) Porcentaje de expresión de CXCR4 en células H292 estimuladas con SDF-1.

B) Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de CXCR4 en células H292 estimuladas con SDF-1.

8.6 Porcentaje de cierre de herida en células H292 estimuladas con SDF-1 y cultivadas en concentraciones de normoglucosa y alta glucosa.

Para evaluar la migración de las células H292 en cultivos con alta glucosa extracelular y normoglucosa, se realizaron ensayos de herida.

En la figura 8 se muestran los porcentajes de cierre de herida que se realizaron a partir de 3 experimentos independientes, se observa que en las condiciones con 11 mM ($p= 0.02$) de glucosa y 25 mM ($p=0.01$) de glucosa se presenta un mayor porcentaje de cierre de herida, ambas diferencias presentadas son estadísticamente significativas cuando se comparan con la condición de normoglucosa.

Con el fin de evaluar la migración de las células H292 cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa en función del estímulo con la quimiocina SDF-1, se realizaron ensayos de herida.

En la figura 9 se muestran las células con la herida realizada sobre la monocapa por condición de glucosa (5.5, 11 y 25 mM) en el tiempo 0 (T0) y después del estímulo con SDF-1, el cual fue de 6 horas (TF). Cualitativamente se puede observar que la herida se cierra en mayor medida en condiciones de alta glucosa (11 y 25 mM).

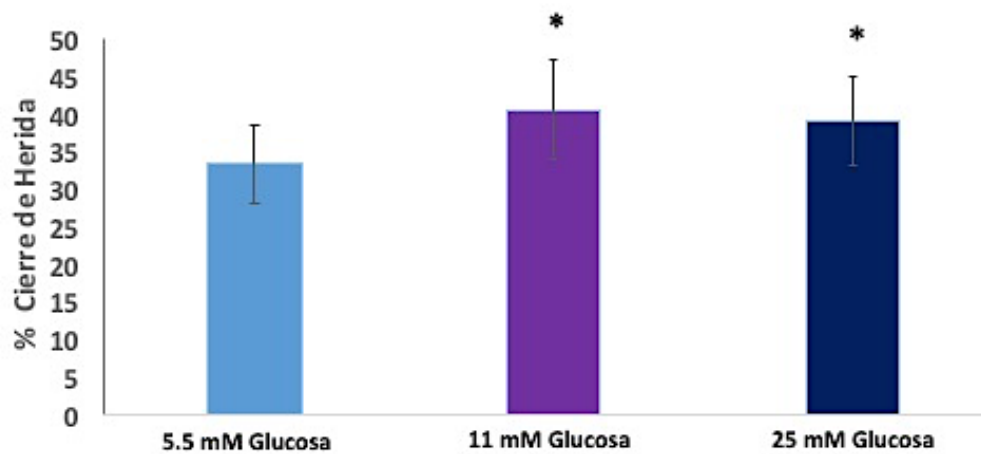


Figura 8. Porcentajes de cierre de herida en células cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa durante 6 horas. Los datos obtenidos muestran un incremento significativo de $p=0.02$ en la condición con 11 mM de glucosa en comparación con 5.5 mM de glucosa y un incremento significativo de $p=0.01$ en la condición con 25 mM de glucosa en comparación con la condición de 5.5 mM de glucosa. El análisis fue realizado a partir de la prueba estadística “t” de Student donde $P < 0.05$; $n=3$.

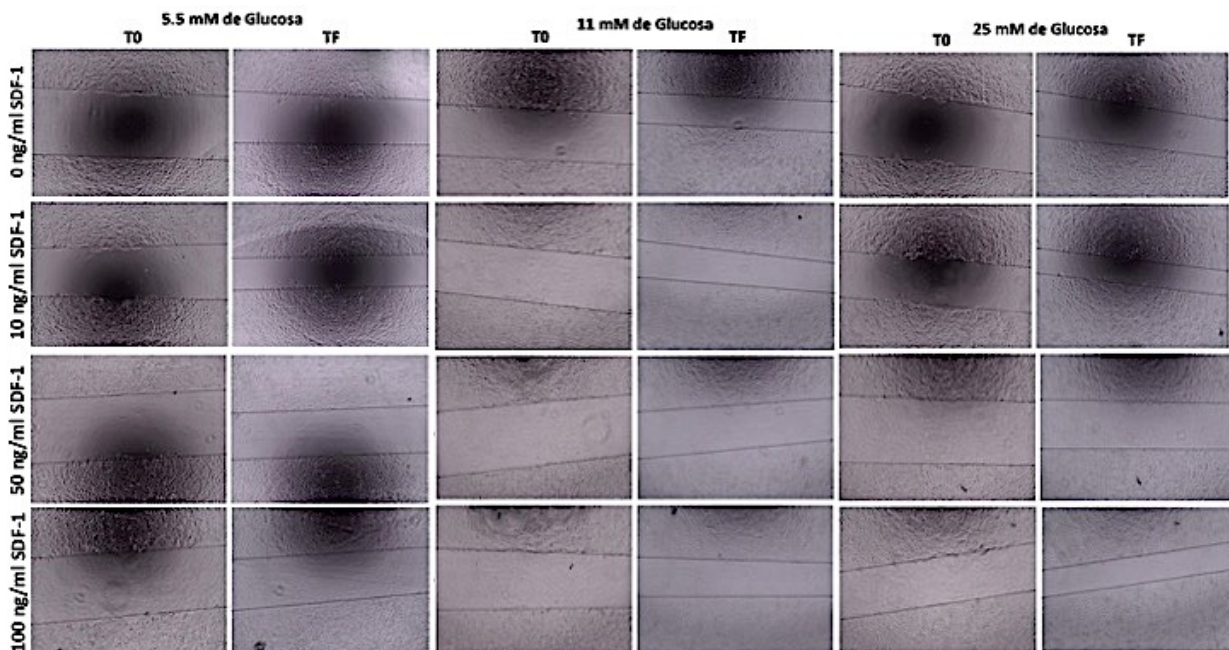


Figura 9. Ensayo de herida a las 0 (T0) y 5 horas (TF) realizado en células H292 cultivadas bajo condiciones de normoglucosa (5.5 mM) y alta glucosa (11 y 25 mM), y estimuladas con SDF-1 (0, 10, 50 y 100 ng/ml) durante 6 horas.

En la Figura 10 se observan los porcentajes de cierre de herida de las células H292, estimuladas con SDF-1 (0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml y 100 ng/ml) bajo las condiciones de glucosa evaluadas (5.5 mM, 11 mM y 25 mM). Estos resultados se obtuvieron a partir de 3 experimentos independientes. Al comparar los porcentajes de cierre de herida en las tres condiciones de glucosa evaluadas, se observa claramente una diferencia, donde las condiciones con 11 mM y 25 mM de glucosa presentan un mayor porcentaje con respecto a la condición con 5.5 mM de glucosa. El máximo porcentaje de cierre de herida se encuentra en la condición con 11 mM de glucosa (49%) y 10 ng/ml de SDF-1, siendo estadísticamente significativo ($p=0.023$) con respecto a la condición con 5.5 mM de glucosa y 10 ng/ml de SDF-1. Además, cabe señalar que se observaron picos en el porcentaje de cierre de herida cuando se estimulan las células H292 en concentraciones de 10 ng/ml y 50 ng/ml de SDF-1.

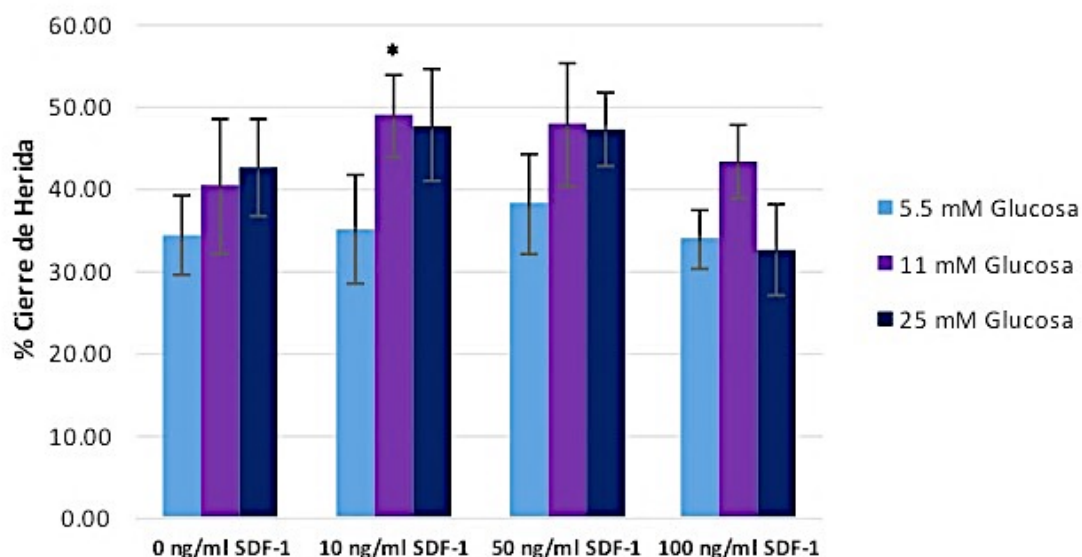


Figura 10. Porcentajes de cierre de herida en células H292 estimuladas con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de SDF-1 y cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa durante 6 horas. Los datos obtenidos con el estímulo de 10 ng/ml de SDF-1 y 11 mM de glucosa mostraron una diferencia significativa ($*p= 0.023$) cuando se compara con la condición de 5.5 mM de glucosa. El análisis fue realizado a partir de la prueba estadística “t” de Student donde $P < 0.05$; $n=3$.

Por otra parte, en la Figura 11 se muestran los resultados de herida en células H292 al T0 y TF (6 horas) cultivadas con Manitol (5.5, 11 y 25 mM) y estimuladas con SDF-1 (0 y 10 ng/ml); el manitol se utilizó como control de osmolaridad. En estos resultados se logra apreciar cualitativamente el cierre de herida en las células H292 cultivadas bajo las tres concentraciones de manitol evaluadas. De igual forma, en la Figura 12, se muestran los porcentajes de cierre de herida en células H292 cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de manitol y estimuladas con 0 y 10 ng/ml de SDF-1, en ellos se aprecia que el porcentaje de cierre de herida es muy cercano entre concentraciones de manitol, por lo que no existen diferencias importantes. Además, al estimular las células H292 con 10 ng/ml de SDF-1 se aprecia un aumento en el porcentaje de cierre de herida. Estos resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Además, como control del ensayo de herida se utilizó al EGF (0, 10, 50 y 100 ng/ml) y el SFB al 10% en cultivos con 5.5, 11 y 25 mM de glucosa, y SFB al 20% cultivadas en 5.5 mM de glucosa. Como se puede observar en la Figura 13, el porcentaje de cierre de herida en células H292 parece disminuir cuando se cultivan con 20% de SFB, por el contrario, el porcentaje de cierre de herida con las condiciones de EGF y el SFB al 10% presentan un mayor porcentaje de cierre, sin presentar diferencias significativas entre cultivos en normoglucosa y alta glucosa, también en el caso del EGF no se presentan diferencias significativas del porcentaje de cierre de herida entre concentraciones evaluadas.

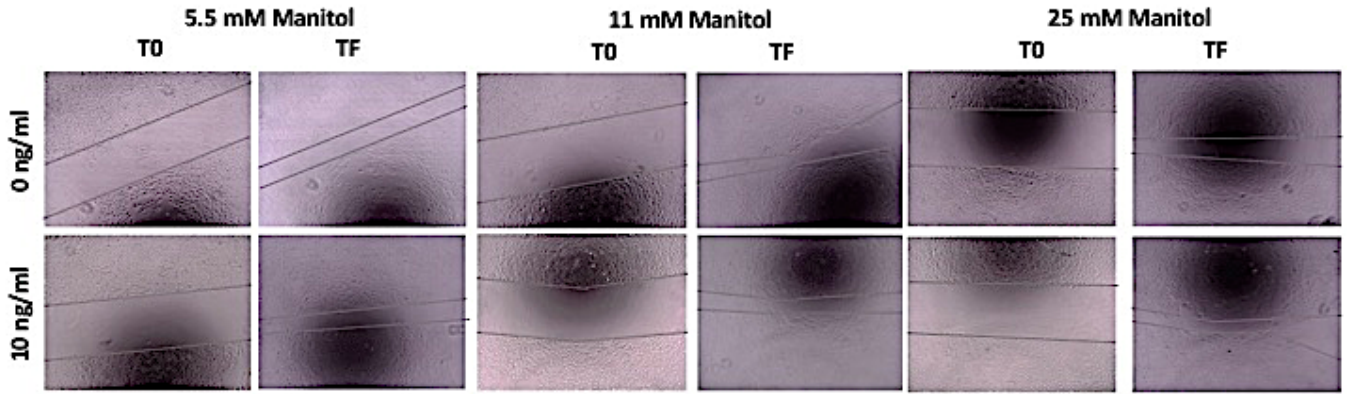


Figura 11. Ensayo de herida a las 0 (T0) y 5 horas (TF) realizado en células H292 cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de manitol, y estimuladas con SDF-1 (0 y 10 ng/ml) durante 6 horas.

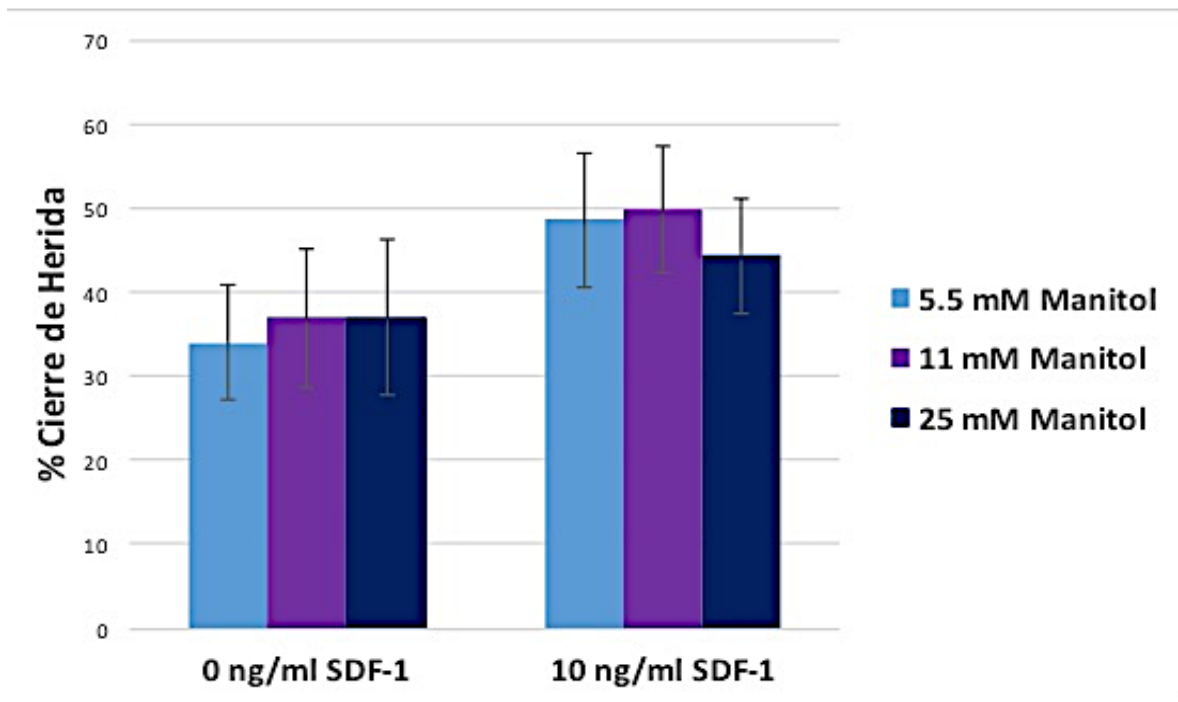


Figura 12. Porcentajes de cierre de herida en células H292 estimuladas con 0 y 10 ng/ml de SDF-1 y cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de manitol durante 6 horas. n=2

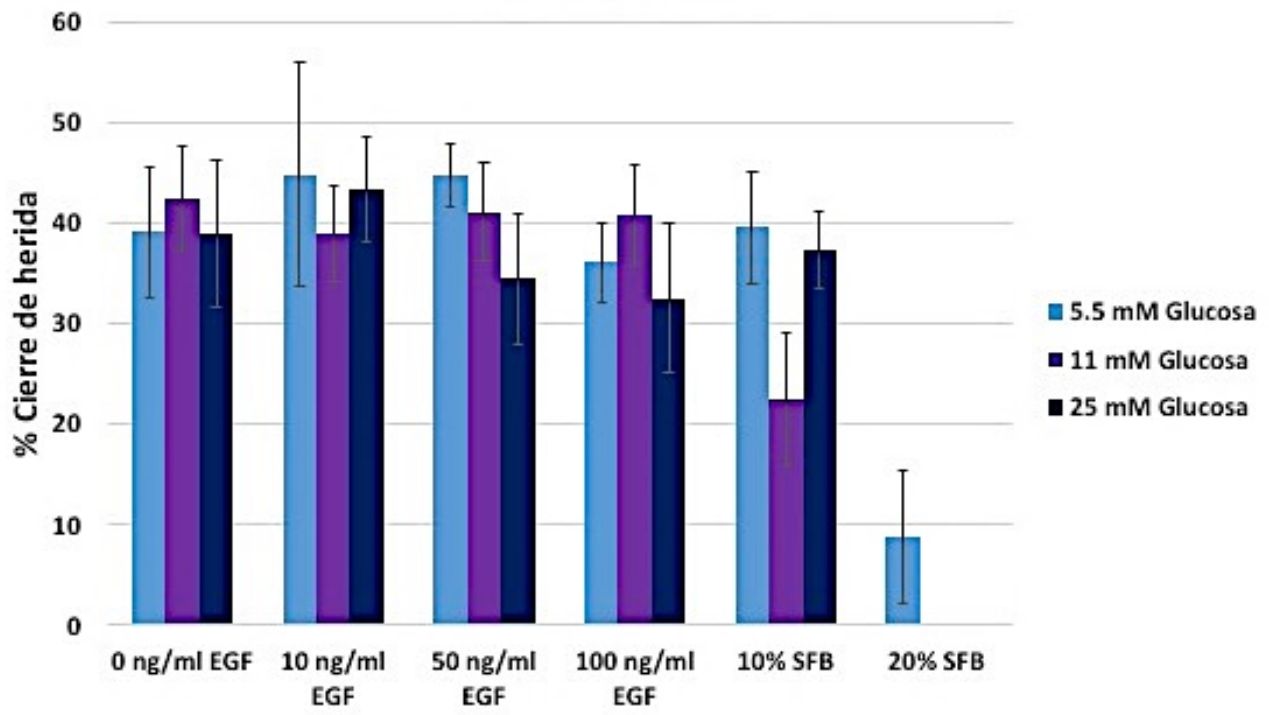


Figura 13. Porcentajes de cierre de herida en células H292 estimuladas con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de EGF, 10% de SFB y 20% de SFB; cultivadas en normoglucosa y alta glucosa extracelular durante 6 horas. n=2.

8.7 Evaluación del porcentaje de proliferación con CFSE en células H292 cultivadas en concentraciones de normoglucosa y alta glucosa.

Para evaluar el porcentaje de proliferación celular en la línea H292 en cultivos con normoglucosa y alta glucosa extracelular, las células fueron marcadas con 10 μ M de CFSE y cultivadas durante 6 días en concentraciones de 5.5, 11 y 25 mM de glucosa. La evaluación de las células fue realizada por citometría de flujo los días 1, 3 y 6 de cultivo.

En los resultados se muestran como histogramas la intensidad de fluorescencia que se obtuvo de las células marcadas con CFSE al día 1, 3 y 6 de cultivo a partir de un experimento independiente. La proliferación en la línea celular H292 no presenta diferencias significativas entre condiciones de normoglucosa y alta glucosa en los días 1, 3 y 6 de cultivo como se muestra en la Figura 14; D1, D3 y D6.

Para determinar el porcentaje de proliferación celular, se evaluaron 3 experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones mencionadas con anterioridad. En la Figura 14 C se presentan los porcentajes de proliferación en células H292 al día 1, 3 y 6 de cultivo celular. En estos resultados se observa al día 1 un porcentaje de proliferación máximo en las células H292 cultivadas en 25 mM de glucosa (90.96%) y un mínimo en la condición con 11 mM de glucosa (90.61%). Al día 3 de cultivo, la diferencia entre condiciones es mínima, el mayor porcentaje de proliferación que se obtuvo fue del 98.96% (5.5 mM de glucosa) y el menor porcentaje fue de 98.85% (11 mM de glucosa). Finalmente al día 6 se muestran porcentajes de proliferación de casi el 100% en las tres condiciones evaluadas. Por lo que las diferencias en los porcentajes de proliferación en células H292

cultivadas en normoglucosa y alta glucosa obtenidos los días 1, 3 y 6 de cultivo, no son estadísticamente significativos.

Por otra parte, para validar nuestro sistema se integraron los controles de proliferación siguientes; 1 $\mu\text{g/ml}$ y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de hidroxurea, además del cultivo con 20% de SFB. Primero se marcaron las células H292 con 10 μM de CFSE, posteriormente se integraron los controles de proliferación y finalmente las células cultivadas durante 6 días en 5.5 mM de glucosa fueron adquiridas por citometría de flujo. Los resultados muestran que las células que fueron tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de hidroxurea conservan una mayor IFM, lo cual indica que se dividieron menos. Mientras que las que fueron estimuladas con 20% de SFB conservan una menor IFM, siendo la condición que se dividió en mayor medida (Figura 14.B2). Por lo tanto, se puede determinar en las células H292 cultivadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de hidroxurea se encuentra inhibida en mayor medida la proliferación celular, a diferencia de las células cultivadas con 20% de SFB.

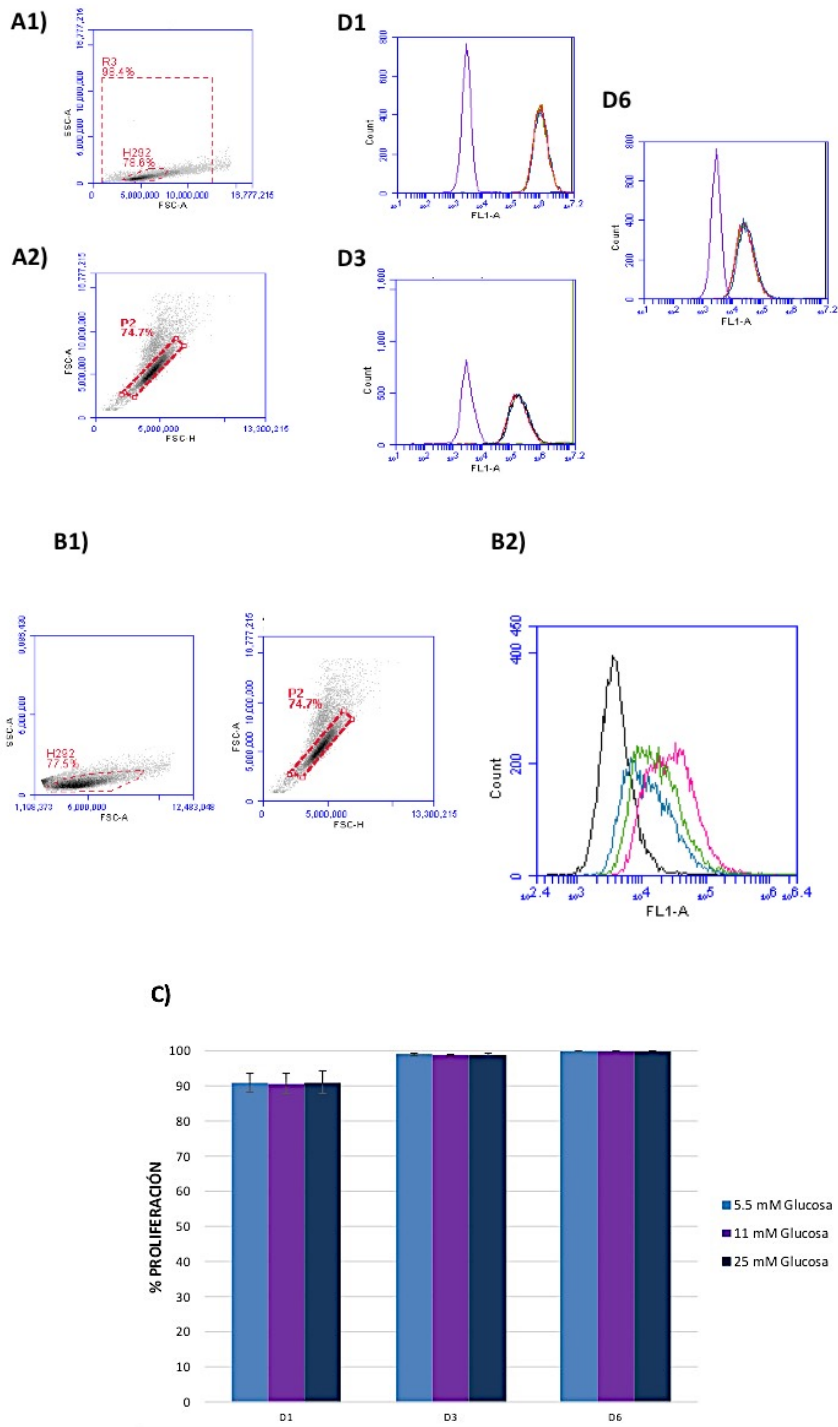


Figura 14. Evaluación de la proliferación celular en células H292 marcadas con 10 μ M CFSE. Día 1 (D1; 5.5 mM= 90.95%, 11 mM= 90.61% y 25 mM= 90.96%), Día 3 (D3; 5.5 mM= 98.96%, 11 mM= 98.85% y 25 mM= 98.86%) y día 6 (D6; 5.5 mM= 99.88%, 11 mM= 99.85% y 25 mM= 99.82%) de cultivo bajo condiciones de normoglucosa (5.5 mM de glucosa) y alta glucosa (11 y 25 mM de glucosa). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, n=3.

B2) Histograma que muestra la intensidad de fluorescencia media de las células H292 marcadas con 10 μ M de CFSE cultivadas durante 6 días con 5.5 mM de glucosa. Los controles evaluados fueron los siguientes: 1 μ g/ml de hidroxurea (rosa; IFM= 42,810.15) y 0.1 μ g/ml de hidroxurea (verde; IFM= 27,986.33), además del cultivo al 20% SFB (azul; IFM= 20,705.67).

C) Porcentaje de proliferación celular en células H292 marcadas con 10 μ M CFSE y cultivadas en 5.5, 11 y 25 mM de glucosa, n=3.

8.8 Evaluación de la relación piruvato/lactato en células H292 cultivadas en condiciones de normoglucosa y alta glucosa.

La evaluación de la activación de la vía glucolítica a través de la relación piruvato/lactato, fue determinada a partir de medios condicionados recuperados de las inmunotinciones analizadas previamente. Las condiciones evaluadas fueron las siguientes; 5.5 mM, 11 mM y 25 mM de glucosa sin SDF-1. En la Figura 15 se observa una mayor concentración de piruvato/lactato en las condiciones con alta glucosa; 17.2 nMol/ μ l en 11 mM, y 15.7 nMol/ μ l en 25 mM, con respecto a la condición con normoglucosa que fue de 12.5 nMol/ μ l en 5.5 mM. Lo cual parece indicar que existe una mayor producción de piruvato/lactato en cultivos con alta glucosa extracelular, sin embargo, estos resultados no son estadísticamente significativos. Los resultados presentados se obtuvieron a partir de 3 experimentos independientes.

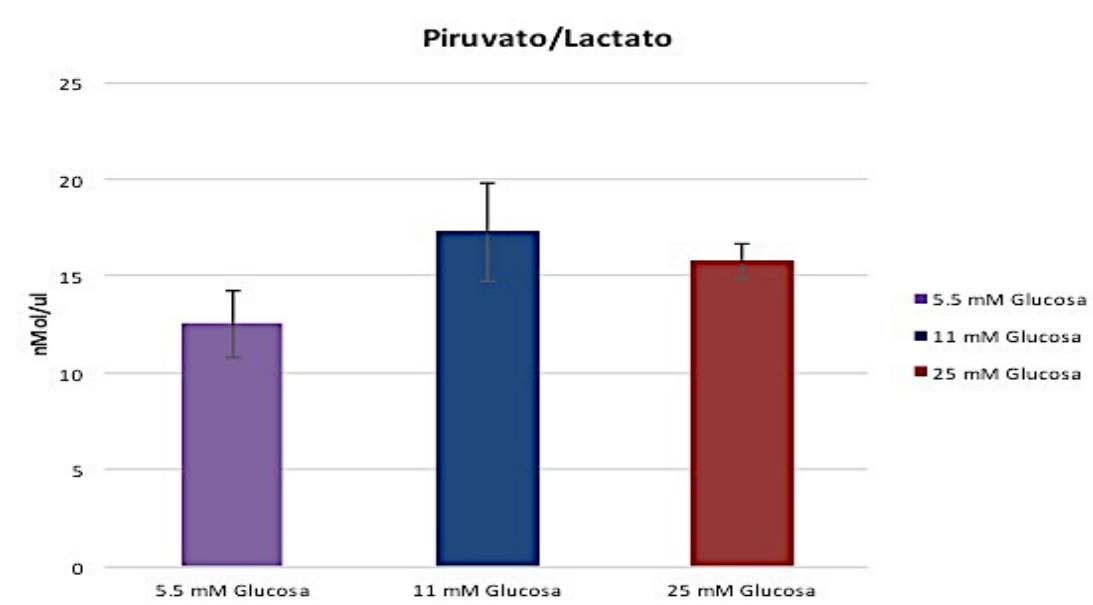


Figura 15. Concentración de piruvato/lactato generada en células H292 cultivadas durante 24 horas bajo condiciones de normoglucosa (5.5 mM) y alta glucosa (11 mM y 25 mM); Las concentraciones de piruvato/lactato que se obtuvieron por condición son las siguientes; 5.5 mM= 12.5 nMol/ μ l, 11 mM= 17.2 nMol/ μ l y 25 mM= 15.7 nMol/ μ l, n=3.

9. DISCUSIÓN

Las quimiocinas y sus receptores han sido objeto de estudio en las últimas décadas debido a que su unión permite la regulación de la proliferación, invasión, diferenciación, angiogénesis y metástasis en células tumorales. Sin embargo, aún es escasa la información disponible acerca de la regulación de las funciones biológicas que las quimiocinas ejercen en el proceso neoplásico bajo cultivos en alta glucosa extracelular.

Lo anterior es particularmente importante debido a que se ha reportado que las células neoplásicas tienen el metabolismo de la glucosa acelerado, lo cual favorece su desarrollo y proliferación (Hanahan D y Weinberg RA, 2011). Por esta razón el presente trabajo de tesis tiene como objetivo principal investigar si en condiciones de cultivo en alta glucosa se modifican las funciones biológicas y la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 en células de carcinoma mucoepidermoide de pulmón, un tipo de cáncer poco frecuente y muy agresivo.

Se ha documentado recientemente que las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas cultivadas durante 7 días en normoglucosa (5.5 mM) y alta glucosa (30 mM) cambian su morfología de ovalada en forma de adoquín (5.5 mM) a alargada en forma de adoquín (30 mM) (Quiao L *et al.*, 2017). En nuestros resultados se puede observar que la morfología de las células H292 no se ve afectada debido al cultivo de 24 horas en alta glucosa (11 y 25 mM). Lo anterior podría indicar que las diferencias en la morfología de células cultivadas en alta glucosa pueden variar entre tipos celulares y/o si se trata de células primarias o cultivos celulares, o por el tiempo de cultivo. Por otro lado, Kruse CR y col. documentaron con anterioridad que en fibroblastos y queratinocitos se ve afectada la

viabilidad al cultivarse en concentraciones de 26 mM de glucosa, sin embargo, en concentraciones por debajo de ésta, la viabilidad no disminuye, todo lo mencionado con anterioridad en un período de 5 días de cultivo (Kruse CR *et al.*, 2016). Por el contrario nuestros resultados demuestran que en células H292 no se ve comprometida la viabilidad en cultivos de 25 mM de glucosa en un tiempo de exposición de 24 horas. Probablemente las células H292 expuestas durante un periodo más largo a concentraciones de alta glucosa puedan disminuir su viabilidad, por esta razón, serán necesarios en un futuro experimentos adicionales.

En cuanto a la expresión del receptor CXCR4 en células H292, nuestros resultados indican que estas células tienen una expresión basal baja de CXCR4. La cual no se encontró sobre-regulada por concentraciones altas de glucosa extracelular. Lo anterior contrasta con estudios realizados en células Jurkat y VSMCs, los cuales reportan un incremento en la expresión de CXCR4 en cultivos con alta glucosa extracelular (Lan X *et al.*, 2013; Jie W *et al.*, 2010). Además, nuestros resultados muestran que la estimulación de 24 horas con SDF-1 no regula la expresión del receptor CXCR4 en células H292 cultivadas en condiciones de normoglucosa y alta glucosa extracelular. Sin embargo, se ha reportado con anterioridad que la quimiocina SDF-1 α es capaz de regular la expresión del receptor CXCR4 en células VSMCs de rata cultivadas en 25 mM de glucosa (Jie W *et al.*, 2010). Asimismo, en células de cáncer de próstata también se observa una regulación positiva en la expresión de CXCR4 por medio de SDF-1 α en condiciones de cultivo normales (Kukreja P *et al.*, 2005).

Por otra parte, se ha documentado que la unión de CXCL12 con el receptor CXCR4 promueve la capacidad migratoria de varios tipos celulares, entre ellos se encuentran células de cáncer de endometrio, cáncer de pulmón de células no pequeñas, y cáncer de próstata. (Phillips RJ *et al.*, 2003; Liu P *et al.*, 2016; Gu Q *et al.*, 2015; Kukreja P *et al.*,

2005). Sin embargo, actualmente se han realizado pocos estudios que determinen el efecto en la capacidad migratoria regulada por la unión SDF-1/CXCR4 en cultivos con alta glucosa extracelular. Al respecto, se ha reportado que en VSMCs cultivadas en alta glucosa (25 mM) se regula de manera positiva la capacidad migratoria, la cual es mediada por la unión de la quimiocina SDF-1 con su receptor CXCR4 (Jie W *et al.*, 2010). Por otra parte, nuestros resultados muestran que en células H292 cultivadas en alta glucosa (11 mM) se presenta un mayor porcentaje de migración en comparación con las células cultivadas en normoglucosa (5.5 mM), la cual parece estar favorecida por el estímulo con 10 ng/ml de SDF-1, ya que el incremento en el porcentaje de cierre de herida fue estadísticamente significativo. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que la migración presentada en células H292 cultivadas en alta glucosa no está regulada por la unión de la quimiocina SDF-1 con el receptor CXCR4. Por tal motivo sería interesante realizar estudios posteriores que determinen si la migración presentada en nuestro trabajo podría estar regulada por la unión del receptor CXCR7 con la quimiocina SDF-1, pues se ha reportado que la quimiocina SDF-1 puede unirse no sólo con CXCR4, sino también con el receptor CXCR7, además de que esta última puede promover la migración de las células tumorales (Franco R *et al.*, 2012; Miao Z *et al.*, 2007). Aunado a este reporte, se ha determinado la sobreexpresión del receptor de quimiocinas CXCR7 en células y tejidos tumorales derivados de cáncer pulmonar (Iwakiri S *et al.*, 2009).

Respecto a la capacidad proliferativa de las células tumorales cultivadas en alta glucosa, se ha reportado que en VSMCs cultivadas bajo 25 mM de glucosa es regulada de manera positiva la proliferación, la cual es favorecida por la unión SDF-1 α /CXCR4 (Jie W *et al.*, 2010). No obstante, nuestros resultados señalan que no hay diferencias significativas en la proliferación de las células H292 cultivadas en alta glucosa (11 mM y 25 mM) en comparación con las células cultivadas en normoglucosa (5.5 mM), lo anterior se determinó

a partir de un periodo de evaluación de 6 días. Sin embargo, se ha determinado que al cultivar BMSCs en alta glucosa se inhibe el receptor de quimiocinas CXCR4 y la proliferación celular, debido a la activación de GSK3 β (Zhang B *et al.*, 2016). Lo anterior podría sugerir que en células de cáncer de pulmón cultivadas en condiciones de alta glucosa se pudiera estar inhibiendo la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 y en consecuencia la actividad proliferativa mediada por la unión de SDF-1 con CXCR4. Para comprobar lo anterior, es necesario realizar más estudios que refuercen esta teoría.

Por otro lado, los resultados obtenidos en células H292 cultivadas durante 24 horas en condiciones de alta glucosa muestran un aumento en la relación piruvato/lactato en comparación con las células cultivadas en condiciones de normoglucosa; no obstante, la diferencia entre condiciones no fue significativa. En el año 1923, Otto Warburg y sus colaboradores descubrieron que las células cancerosas producen hasta un 70% de lactato por encima de lo normal, incluso en condiciones aeróbicas, lo cual se debe a su alteración en el metabolismo de la glucosa (Warburg O, *et al.*, 1923; San-Millán I y Brooks GA, 2017). Aunque en nuestros resultados no se presenten diferencias significativas en el porcentaje de piruvato/lactato generado en células H292 cultivadas en alta glucosa, sí se puede sugerir una posible activación de la vía glucolítica de estas células en cultivos con alta glucosa extracelular (11 mM y 25 mM).

10. CONCLUSIONES

- Las células H292 tienen una expresión basal muy baja del receptor de quimiocinas CXCR4.
- La expresión del receptor CXCR4 no está regulada por alta glucosa extracelular.
- La estimulación de las células H292 con la quimiocina CXCL12 (SDF-1) no regula la expresión del receptor CXCR4.
- La estimulación con CXCL12 favorece la migración en células H292 bajo condiciones de cultivo en alta glucosa extracelular (11 mM).
- La proliferación en células H292 no es mediada por alta glucosa extracelular.
- Se sugiere que la vía glucolítica en células H292 es activada bajo condiciones de cultivo en alta glucosa extracelular (11 mM y 25 mM).

11. LITERATURA CITADA

Abu WK, Aljabbari O y Ramchandani M. (2015). Mucoepidermoid carcinoma of the tracheobronchial tree. *Methodist Debaquey Cardiovasc J*, 11(3), 192-4. doi: 10.14797/mdcj-11-3-192.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. (2010). *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega. (5ª Ed.), Cómo las células obtienen energía de los alimentos (pp. 88-103). Barcelona, España.

ATCC. (2017) NCI-H292 [H292] (ATCC® CRL-1848) Recuperado de <https://www.atcc.org/~ps/CRL-1848.ashx> .

Audesirk T, Audesirk G y Byers B. (2003). *Biología: la vida en la tierra*. Editorial Pearson Educación. (8ª Ed.), Obtención de energía: Glucólisis y respiración celular (pp. 135-144) Edo. México, México.

Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ,... Zlotnik A. (2013) *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 66(1), 1-79. doi: 10.1124/pr.113.007724.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2007). *Bioquímica*. Editorial Reverté. (6ª Ed.), Glicolisis y gluconeogénesis (pp. 435-438). Barcelona, España.

Bonocchi R y Graham GJ. (2016). Atypical chemokine receptors and their roles in the resolution of the inflammatory response. *Front Immunol*, 7(224), 1-7. doi: 10.3389/fimmu.2016.00224.

Boticario C y Cascales M. (2010). Hipoxia y cáncer. *An R Acad Nac Farm*, 76(3), 379-408.

Brooks GA.(2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol*, 587(Pt 23), 5591-5600. doi: 10.1113/jphysiol.2009.178350.

Cerecedo-Zapata CM, Limón D, Gonzaga R, Serrano-Ramírez R, Álvarez A, Téllez JL. y Ávila-Moreno F. (2009). *Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico*. Parte I. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 22(3), 217-229.

Chen X, Qian Y y Wu S. (2015). The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. *Free Radiac Biol Med*, 0, 253-263. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.027.

Cheng ZH, Shi YX, Yuan M, Xiong D, Zheng JH y Zhang ZY. (2016). Chemokines and their receptors in lung cancer progression and metastasis. *J Zhejiang Univ Sci B*, 17(5), 342-51. doi: 10.1631/jzus.B1500258.

Ding HL, Zhang JG, Zhu MZ, Luo XD y Liang GP. (2004). [Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular endothelial cells stimulated by high concentration of glucose]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 20(4), 450-453.

Dorantes-Heredia R, Ruiz-Morales JM y Cano-García F. (2016). Histopathological transformation to small-cell lung carcinoma in non-small cell lung carcinoma tumors. *Transl Lung Cancer Res*, 5(4), 401-412. doi: 10.21037/tlcr.2016.07.10.

Franco I, Tente D, Coutinho D, Linhas R, Antunes A y Barroso A. (2016). Single symptomatic colonic metastasis as first presentation of a pulmonary mucoepidermoid carcinoma. *Clin Respir J*, 10(4), 524-529. doi: 10.1111/crj.12251.

Franco R, Pirozzi G, Scala S, Cantile M, Scognamiglio G, Camerlingo R,... Rocco G. (2012). CXCL12-binding receptors expression in non-small cell lung cancer relates to tumoral microvascular density and CXCR4 positive circulating tumoral cells in lung draining venous blood. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 41(2), 368-375. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2011.05.009>.

Gao D, Rahbar R y Fish EN. (2016). CCL5 activation of CCR5 regulates cell metabolism to enhance proliferation of breast cancer cells. *Open Biol*, 6(6), 160122. doi: 10.1098/rsob.160122.

Gu Q, He Y, Ji J, Yao Y, Shen W, Luo J, ... Ding WQ. (2015). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and reactive oxygen species (ROS) mediates radiation-induced invasiveness through the SDF-1 α /CXCR4 pathway in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(13), 10893-10907.

Hanahan D y Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144 (5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hamuro M, Polan J, Natarajan M y Mohan S. (2002). High glucose induced nuclear factor kappa B mediated inhibition of endothelial cell migration. *Atherosclerosis*, 162(2), 277-287.

Huang Y, Wu CY, Wu W, Hou LK y Zhang LP. (2016). [Clinicopathologic features and epidermal growth factor receptor gene mutation of primary pulmonary mucoepidermoid carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 45(9), 612-616. doi: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2016.09.005.

Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, Sonobe M, Nagai S, Okubo K,... Miyahara R. (2009). Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 115(1), 2580-2593. doi: 10.1002/cnr.24281.

Jie, W., Wang, X., Zhang, Y., Guo, J., Kuang, D., Zhu, P., ... Ao, Q. (2010). SDF-1 α /CXCR4 axis is involved in glucose-potentiated proliferation and chemotaxis in rat vascular smooth muscle cells. *International Journal of Experimental Pathology*, 91(5), 436–444. doi: 10.1111/j.1365-2613.2010.00720.x

Kruse CR, Singh M, Sørensen JA, Eriksson E y Nuutila K. (2016). The effect of local hyperglycemia on skin cells in vitro and on wound healing in euglycemic rats. *J Surg Res*, 206(2), 418-426. doi: 10.1016/j.jss.2016.08.060.

Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K y Agrawal KC. (2005). Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res*, 65(21), 9891-9898.

Labak CM, Wang PY, Arora R, Guda MR, Asuthkar S, Tsung AJ y Velpula KK. (2016). Glucose transport: meeting the metabolic demands of cancer, and applications in glioblastoma treatment. *Am J Cancer Res*, 6(8), 1599-1608.

Lan X, Cheng K, Chandel N, Lederman R, Jhaveri A, Husain M,... Singhal P. (2013). High glucose enhances HIV entry into T cells through upregulation of CXCR4. *J Leukoc Biol*, 94(4), 769-777. doi: 10.1189/jlb.0313142.

Li F-Q, Zeng D-K, Jia C-L, Zhou P, Yin L, Zhang B,... Zhu Q. (2015) The effects of sodium tanshinone Ila sulfonate pretreatment on high glucose-induced expression of fractalkine and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Clin Exp Med*, 8(4), 5279-5286.

Li G, Zhu G, Gao Y, Xiao W, Xu H, Liu S,... Li G. (2013). Neferine inhibits the upregulation of CCL5 and CCR5 in vascular endothelial cells during chronic high glucose treatment. *Inflammation*, 36(2), 300-308. doi: 10.1007/s10753-012-9547-1.

Liu P, Long P, Huang Y, Sun F y Wang Z. (2016). CXCL12/CXCR4 axis induces proliferation and invasion in human endometrial cancer. *Am J Transl Res*, 8(4), 1719-1729.

Llorián M. (2016). Participación de los receptores de quimiocinas CCR1 y CCR2 en el dolor inflamatorio y neoplásico en ratones. Tesis doctoral no publicada, Universidad de Oviedo. Recuperado de http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/39297/1/TD_MariaLlorian.pdf

Marín-Hernández A. (2009). El factor inducido por la hipoxia-1 (HIF-1) y la glucólisis en las células tumorales. *REB*, 28(2), 42-51.

Martínez Y, Puente L, Sanchez G, Resano P y Rubio Y. (2007) Carcinoma mucoepidermoide de pulmón en una paciente de 31 años, tratada con cirugía. *Rev Patol Respir*, 10(1), 37-39.

Medina FM, Barrera RR, Morales JF, Echegoyen RC, Chavarría JG y Rebora FT. (1996). Primary lung cancer in Mexico City: a report of 1019 cases. *Lung Cancer*, 14(2-3), 185-193.

Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A,... Schall TJ. (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(40), 15735-15740.

Mo H, Monard S, Pollack H, Ip J, Rochford G, Wu L,... Moore JP. (1998). Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14(7), 607-617.

Mochizuki D, Adams A, Warner KA, Zhang Z, Pearson AT, Misawa K,... Nör JE. (2015). Anti-tumor effect of inhibition of IL-6 signaling in mucoepidermoid carcinoma. *Oncotarget*, 6(26), 22822-22835. doi: 10.18632/oncotarget.4477.

Molino M, Woolkalis MJ, Prevost N, Praticó D, Barnathan ES, Taraboletti G,... Brass LF. (2000). CXCR4 on human endothelial cells can serve as both a mediator of biological responses and as a receptor for HIV-2. *Biochim Biophys Acta*, 1500(2), 227-240.

Moreno-Aguilera E, Galeana-Noguera FI, Vera-Aguilera J, Vera-Aguilera C y Ley-Marcial LA. (2017). [Jejunal perforation secondary to pulmonary mucoepidermoid carcinoma metastasis. Case report and review]. *Cir Cir*, 85(3), 254-259. doi: 10.1016/j.circir.2016.03.006.

Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W y Kanz L. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 91(12), 4523-4530.

Murdoch C, Monk PN y Finn A. (1999). Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. *Immunology*, 98(1), 36-41.

Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F,... Moser B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382(6594), 833-835.

OMS. (2015). Cáncer. Nota descriptiva N°297. Recuperado de www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/

OMS. (2017). Diabetes. ¿Qué es la diabetes?. Recuperado de http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index1.html

Pan Z, Yang G, Qu L, Yuan T, Du Z y Dong L. (2014). Bone marrow metastasis in primary bronchial mucoepidermoid carcinoma: a case report. *World J Surg Oncol*, 12, 158. doi: 10.1186/1477-7819-12-158.

Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP y Strieter RM. (2003). The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(12), 1676-1686.

Qiao L, Yang HZ, Li XC, Huang XQ, Yuan B y Zhou ZD. (2017). [Effects of transient exposure to high glucose on biological behaviors of human dermal microvascular endothelial cells]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 33(2), 77-82. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.02.004.

Raman D, Sobolik-Delmaire T y Richmond A. (2011). Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res*, 317 (5), 575-589. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.01.005.

Rivas-Fuentes S, Salgado-Aguayo A, Pertuz S, Gorocica P, Alvarado-Vásquez N y Aquino-Jarquín G. (2015). Role of chemokines in non-small cell lung cancer: angiogenesis and inflammation. *J Cancer*, 6(10), 938-952. doi: 10.7150/jca.12286.

Rosas S, Vázquez E, Peimbert M y Pérez G. (2010). De la bioenergética a la bioquímica del ATP. *ContactoS*, 77, 39-45. Recuperado de <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n77ne/atp.pdf>

Sae-Won H, Hwang-Phill K, Yoon J, Do-Youn O, Se-Hoon L, Dong-Wan K,... Tae-You K. (2008). Mucoepidermoid carcinoma of lung: potential target of EGFR-directed treatment. *Lung Cancer*, 61(1), 30-34. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.11.014>.

Saito T, Ujiie H, Kadoyama S, Higa T, Shiono S y Teramoto A. (2015). Brain metastasis from a lung mucoepidermoid carcinoma mimicking a brain abscess. *Surg Neurol Int*, 6(Suppl 9), S300- S303. doi: 10.4103/2152-7806.159375.

San-Millán I y Brooks GA. (2017). Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg effect. *Carcinogenesis*, 38(2), 119-133. doi: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw127>.

Simon MC. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization. *Adv Exp Med Biol*, 588, 165-170.

Singh A, Pandey KC y Pant NK. (2010). Cavitory mucoepidermoid carcinoma of lung with metastases in skeletal muscles as presenting features: a case report and review of the literature. *J Cancer Res Ther*, 6(3), 350-352. doi: 10.4103/0973-1482.73363.

Singha B, Gatla HR y Vancurova I. (2015). Transcriptional regulation of chemokine expression in ovarian cancer. *Biomolecules*, 5(1), 223-243. doi: 10.3390/biom5010223.

Teicher BA y Fricker SP. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 16(11), 2927-2931. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2329.

Teijón JM, Garrido A, Blanco D, Villaverde C, Mendoza C y Ramírez J. (2006). *Fundamentos de bioquímica metabólica*. Editorial Tébar. (2a Ed.), Madrid, España. 21-30 pp.

Torres DC y Marti LC. (2015). Chemokines and immunity. *Quimiocinas e imunidade*. *Einstein*, 13(3), 469-73. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3438.

Tran Q, Lee H, Park J, Kim S-H y Park J. (2016). Targeting cancer metabolism-revisiting the warburg effects. *Toxicol Res*, 32(3): 177-193. doi: 10.5487/TR.2016.32.3.177.

Valaee S, Yaghoobi MM y Shamsara M. (2017). Metformin inhibits gastric cancer cells metastatic traits through suppression of epithelial-mesenchymal transition in a glucose-independent manner. *PLoS One*, 12(3), e0174486. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174486>.

Van-Meerbeeck JP y Surmont VF. (2009). Stage IIIA-N2 NSCLC: A review of its treatment approaches and future developments. *Lung Cancer*, 65(3), 257-267. doi: 10.1016/j.lungcan.2009.02.007.

Warburg O, *et al.* (1923). Versuche an überlebendem carcinom-gewebe. *Klin Wochenschr*, 2, 776-777.

Xu Z, Jia Q, Li H, Wang J, Zhao Y, Chen S y Long H. (2013). [Effects of parthenolide on high glucose-induced cell proliferation, NF- κ B activation and MCP-1 expression in rat mesangial cells]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 33(10), 1471-1473.

Yang X, Wang Y, y Gao G. (2016). High glucose induces rat mesangial cells proliferation and MCP-1 expression via ROS-mediated activation of NF- κ B pathway, wich is inhibited by eleutheroside E. *J Recept Signal Transduct Res*, 36(2), 152-157. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/10799893.2015.1061002>.

Zappa C y Mousa SA. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*, 5(3), 288-300. doi: 10.21037/tlcr.2016.06.07.

Zhang B, Liu N, Shi H, Wu H, Gao Y, He H,... Liu H. (2016). High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3 β . *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 34(2), 140-150. doi: <https://doi.org/10.1007/s00774->.

Zhang JC, Liu FR, Hu HX, He F, Tu Y y Wei B. (2015). [Relationship between chemotactic factor CCL5 and diabet-associated diffuse large B cell lymphoma]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 23(5), 1325-1330. doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2015.05.019.

Zhang L, Wang L, Du B, Wang T, Tian P y Tian S. (2016). Classification of non-small cell lung cancer using significance analysis of microarray-gene set reduction algorithm. *BioMed Research International*, Volume 2016, Article ID 2491671: 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2491671>.

Zwaans BM y Lombard DB. (2014). Interplay between sirtuins, MYC and hypoxia-inducible factor in cancer-associated metabolic reprogramming. *Dis Model Mech*, 7(9), 1023-1032. doi: 10.1242/dmm.016287.

12. ANEXOS

Inmunotinción para HLA-ABC como prueba de bloqueo en células H292. Buffer de tinción y PBS.

Con el objetivo de probar la eficiencia de bloqueo en células H292 se realizó inmunotinción con diferentes condiciones de bloqueo. Para la realización del experimento se despegaron con buffer de disociación celular no enzimático células H292 al 80% de confluencia, las cuales posteriormente se dividieron en dos grupos: células mantenidas en buffer de tinción y células mantenidas en PBS. Por condición a cada 50,000 células se les bloqueo con 1 μ L de IgG (11.9 mg/ml), con 10% ó 5% de SFB, además por otro lado se incluyeron dos condiciones; células sin bloqueo y células bloqueadas sin tinción con HLA-ABC (BioLegend, EUA), posteriormente fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación, por condición determinada, se añadieron a las células 2 μ L de HLA-ABC (BioLegend, EUA) y se incubaron durante 25 minutos a 4°C protegidas de la luz, las cuales posteriormente fueron lavadas con 300 μ L de BT y se centrifugadas a 250 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, finalmente se resuspendieron en 250 μ L de BT para ser adquiridas y analizadas por citometría de flujo.

En la Figura 13 se muestran las intensidades de fluorescencia media para cada condición experimental: células sin bloqueo, células bloqueadas con 10% de SFB, células bloqueadas con 5% de SFB, condición de autofluorescencia y células bloqueadas con IgG, todas las condiciones fueron teñidas con HLA-ABC (en azul las condiciones mantenidas en buffer de

tinción y en rojo las condiciones que se mantuvieron en PBS) a excepción del control de autofluorescencia.

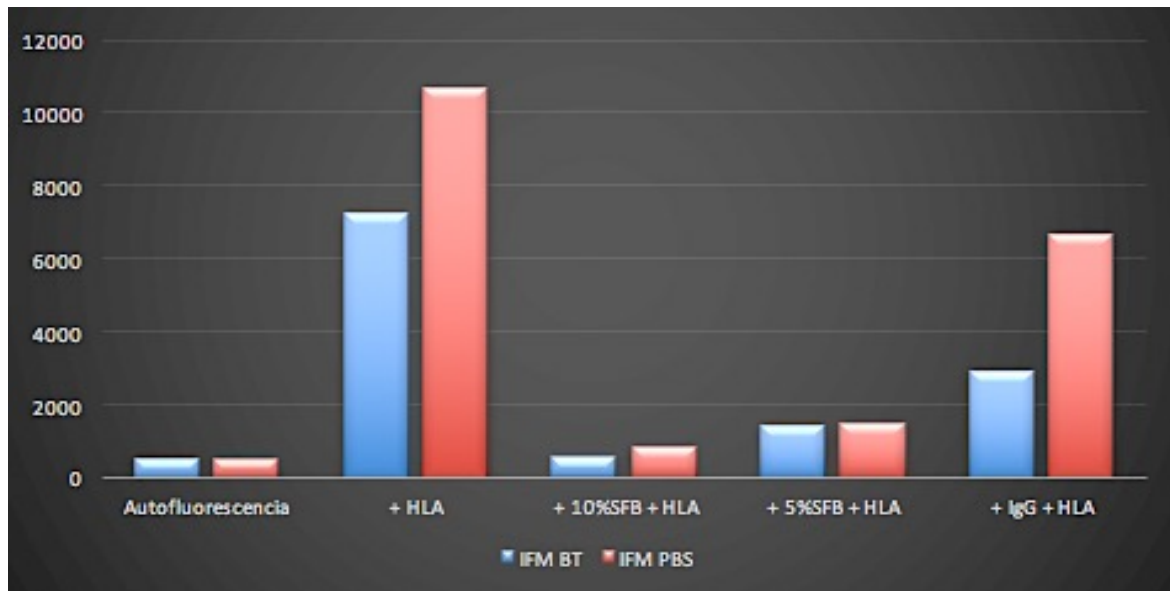


Figura 13. Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de HLA en células H292 mantenidas en BT y PBS: sin bloqueo y bloqueadas con 10% de SFB, 5% de SFB e IgG.