



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**Evaluación de la expresión de HIF-1 α y
marcadores de EMT posterior a la activación de la
vía de la AMPK en células de meduloblastoma
durante la hipoxia.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACEÚTICA
BIOLOGA**

P R E S E N T A :

CONCEPCIÓN ADRIANA GARCÍA LUIS



DIRECTOR DE TESIS

Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2019



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: Dra. Marina Gavilanes Ruiz

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: **Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo**

1er. SUPLENTE: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: Dra. Sara Margarita Garza Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, TORRE DE INVESTIGACIÓN, 2° PISO,
LABORATORIO DE NUTRICIÓN EXPERIMENTAL.**

**INSURGENTES SUR 3700 LETRA C, COL INSURGENTES CUICUILCO 04530 DEL.
COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA: Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo

SUSTENTANTE: Concepción Adriana García Luis

AGRADECIMIENTOS

Al **Instituto Nacional de Pediatría**, por el apoyo para el desarrollo y financiamiento con Fondos Federales del proyecto No. 008/2015

ÍNDICE

RESUMEN	8
1.0 INTRODUCCIÓN	9
1.1 EL CÁNCER Y LA HIPOXIA	9
1.2 EL EFECTO ANTICÁNCER	9
1.3 TRANSICIÓN EPITELIAL MESENQUIMAL ASOCIADA A LA PROGRESIÓN TUMORAL Y METÁSTASIS	10
2.0 MARCO TEÓRICO	11
2.1 EL MEDULOBLASTOMA	11
2.2 LA HIPOXIA Y EL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF)	12
2.3 HIF-1A Y EL METABOLISMO DEL CÁNCER	14
2.4 GENERALIDADES DE AMPK Y EL CÁNCER	15
2.5 LKB1, AMPK EN EL METABOLISMO Y SUPRESIÓN DEL CÁNCER	16
2.6 TRANSICIÓN EPITELIAL MESENQUIMAL	17
2.7 LA METFORMINA Y SU ACCIÓN EN EL CÁNCER	18
3.0 JUSTIFICACIÓN	21
4.0 HIPÓTESIS	22
5.0 OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GENERAL	22
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	22
6.0 METODOLOGÍA	23
6.1 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	23
6.2 CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR DAOY	24
6.3 FORMACIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	24
6.4 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR	24
6.5 LISIS CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA	25
6.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA POR MÉTODO DE LOWRY	26

6.7 ENSAYOS DE WESTERN-BLOT (WB) Y REVELADO POR QUIMIOLUMINISCENCIA	26
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
7.0 RESULTADOS	29
8.0 DISCUSIÓN	37
9.0 CONCLUSIONES	41
10.0 PERSPECTIVAS	41
11.0 BIBLIOGRAFIA	42
12.0 APÉNDICE	45

0.1 LISTADO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Trifosfato de adeninosina

AMP: Monofosfato de adeninosina

AMPK: Cinasa dependiente de AMP

AKT: Proteína cinasa B

BSA: Albúmina sérica bovina

DMEM: Medio modificado de Dulbecco's Eagle

EMEM: Medio mínimo esencial Eagle's

EMT: Transición epitelial mesenquimal

ERH: Elementos de respuesta a hormonas

E-cadherina: Caderina epitelial

GLUT-1: Transportador de glucosa 1

HIF: Factor inducible por hipoxia

HIF- 1 α : Factor 1 alfa inducible por hipoxia

LKB1: Cinasa del hígado B1

MET: Transición mesenquimal epitelial.

mTOR: Blanco de rapamicina en mamíferos

mTORC1: Blanco de rapamicina en mamíferos complejo 1

O₂: Oxígeno

OMS: Organización Mundial de la Salud

pVHL: Proteína Von Hippel-Lindau

SNC: Sistema nervioso central

SFB: Suero fetal bovino

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TPSNC: Tumores primarios del sistema nervioso central

WB: Western-blot

mM: milimolar

mL :mililitros

μ L: microlitros

RESUMEN

Aproximadamente el 90% de las muertes debidas al cáncer son el resultado de la diseminación de metástasis provenientes de los tumores primarios. Dentro de los muchos factores que promueven la aparición de las metástasis se encuentra la hipoxia que surge en los tumores sólidos debido a la vascularización incompleta o disfuncional.

La hipoxia, induce una “reprogramación” metabólica que está coordinada por la proteína HIF-1 α (Factor 1 alfa inducible por hipoxia), la cual activa la transcripción de genes que regulan la invasividad, angiogénesis, supervivencia celular y metabolismo de la glucosa. La metformina es uno de los fármacos anti-diabéticos más ampliamente utilizados en el mundo. Sin embargo numerosos estudios científicos sugieren que puede ser eficaz como un fármaco anti-cáncer, ya que una de sus dianas es la proteína Cinasa dependiente de AMP (AMPK), se ha propuesto que la activación de esta proteína inhibe la función del Factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF-1 α), dando como resultado una disminución de la supervivencia de las células cancerígenas.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de la activación de la vía de la AMPK utilizando la metformina y la hipoxia. Con estas herramientas, se pudo observar la expresión de HIF-1 α y de marcadores de la transición epitelial mesenquimal (EMT) en células de meduloblastoma.

Finalmente pudimos establecer por los resultados obtenidos que la metformina no activa la vía de la AMPK durante la hipoxia. Además el tratamiento con metformina en hipoxia induce aparentemente la EMT al disminuir E-cadherina y aumentar SNAIL, en las células de meduloblastoma.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer y la hipoxia

El cáncer es responsable de más del 12% de todas las causas de muerte en el mundo. La incidencia de cáncer se incrementa en relación a múltiples factores. La mayor parte de los tumores que afectan a los niños menores de 5 años son de naturaleza embrionaria y representa el 40% de los cánceres. A este grupo pertenecen la leucemia linfoblástica aguda, meduloblastoma, retinoblastoma y carcinoma hepático.

El comportamiento de la célula cancerosa es distinto al de la célula normal, tiene un crecimiento potencial indefinido, es capaz de invadir los tejidos circundantes y puede diseminarse a distancia a otros puntos del organismo. Todas estas alteraciones son consecuencia de las lesiones genéticas, la expresión de ciertos genes o la función bioquímica.¹

La hipoxia es la adaptación a la baja tensión de O₂ en células y tejidos, esto provoca una inducción transcripcional de una serie de genes que participan en la angiogénesis, el metabolismo de la glucosa, la supervivencia y proliferación celular. La hipoxia, provoca una baja en el potencial energético de las células, hace que el O₂ necesario para la fosforilación oxidativa disminuya, lo cual es detectada por un mecanismo de reacciones, cuyo resultado final será la estabilización de un factor de transcripción denominado “factor inducible por hipoxia” (HIF-1) el cual estimulará la expresión de un gran número de genes que harán posible la adaptación de las células a las condiciones de hipoxia.²

1.2 El efecto anticáncer

La cinasa dependiente de AMP (AMPK), es un supresor de tumores y funciona como un sensor del estado energético de la célula, permite adaptarse a bajo nivel de ATP (trifosfato de adeninosina).

Se sabe que diversas condiciones de estrés, como la restricción de nutrientes o la hipoxia incrementan los niveles de AMP (adenosín difosfato), ADP (adenosín difosfato), Ca²⁺ y especies reactivas de oxígeno (ROS) activando a su vez a la enzima AMPK.

Esta enzima puede ser fosforilada y activada por la cinasa del hígado B1 (LKB1) y la proteína quinasa cinasa β dependiente de calcio (CaMKK- β). También se ha demostrado que AMPK ser activada por moléculas pequeñas, incluyendo 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosida (AICAR), metformina y análogos de estas proteínas.³

En los últimos años, ha habido un considerable interés en las propiedades antitumorales de la metformina, las diferentes investigaciones realizadas han establecido una correlación entre el uso de la metformina y el riesgo reducido de muertes relacionadas con el cáncer así como la incidencia.

La metformina se dirige a muchas vías que desempeñan un papel importante en la proliferación y la angiogénesis de las células cancerosas, se tiene conocimiento que inhibe al blanco de rapamicina en mamíferos complejo 1 (mTORC1) a través de las vías dependientes de AMPK y de las vías independientes de AMPK, lo que inhibe el crecimiento y desarrollo de células cancerígenas.

1.3 Transición epitelial mesenquimal asociada a la progresión tumoral y metástasis

En su etapa inicial, los carcinomas se caracterizan por aumento en la proliferación de células epiteliales y angiogénesis. La aparición subsecuente de invasividad ocurre al inicio de la etapa final del proceso, que finalmente lleva a la diseminación metastásica. Entre los controles genéticos y mecanismos bioquímicos subyacentes a la adquisición de este fenotipo invasivo, se ha propuesto como un mecanismo crítico la activación de un programa de la transición epitelial-mesenquimal (EMT).⁴

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 El meduloblastoma

Dentro de los tumores primarios del sistema nervioso central (TPSNC) en niños y adolescentes existe la presencia de tumores embrionarios del 11.4% principalmente meduloblastoma (MB), mismo que actualmente se clasifica en el grupo de los tumores embrionarios grado IV de la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁵

El MB es el tumor maligno del sistema nervioso central (SNC) más frecuente en la edad pediátrica. En México, el cáncer de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central ocupan el segundo lugar entre las cinco principales causas de mortalidad por neoplasias malignas en niños en un periodo de 2011-2016⁶ y el tercer lugar en el tipo de neoplasia (2008-2014).

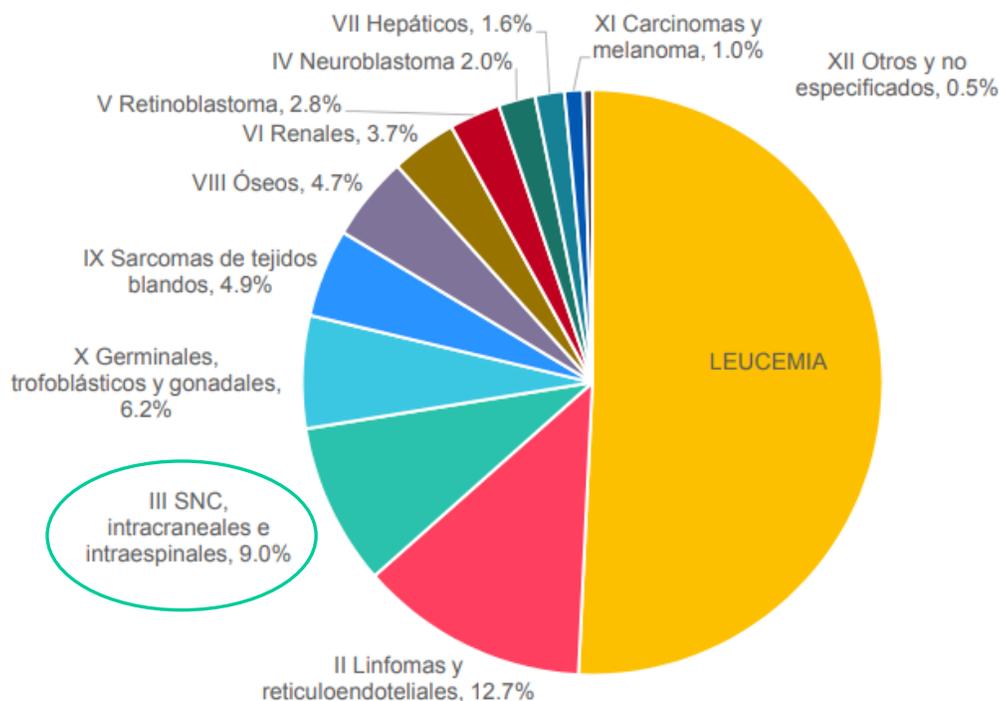


Figura 1. Distribución de formas de neoplasias, en pacientes menores de 18 años, Secretaria de Salud, Panamerican Health Organization.

El MB existe con mayor prevalencia en varones y antes de los 10 años, aunque también puede presentarse, con mucha menor prevalencia, en adultos entre la tercera y cuarta décadas de la vida.

El término MB se utilizó por primera vez por Bailey y Cushing en 1925 para describir un tumor infiltrante que se encuentra con mayor frecuencia en el techo del cuarto ventrículo en los niños y se compone de pequeñas células redondas. El MB surge en la línea media vermiana.⁷

La clasificación típica de la OMS dividía el MB en cinco subgrupos: clásico, anaplásico, de células grandes, desmoplástico y de extensa nodularidad. Un consenso y los avances en estudios moleculares permiten que actualmente el MB se pueda clasificar en cuatro subtipos moleculares: WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4.^{5,8} Los subgrupos moleculares tienen diferentes perfiles genéticos, epigenéticos y fenotípicos que pueden ser usados para estimar la probabilidad, para desarrollar ciertos tipos de cáncer y el pronóstico del paciente.

2.2 La hipoxia y el factor inducible por hipoxia (HIF)

La hipoxia ocurre con frecuencia en tumores sólidos e induce cambios adaptativos en el metabolismo celular. Las células requieren una distribución de O₂ para llevar a cabo la fosforilación oxidativa en las mitocondrias y generar ATP. En condiciones de hipoxia, cuando se reduce la disponibilidad de O₂, las células generalmente responden de tres maneras: (a) inhibiendo la proliferación celular para evitar cualquier aumento adicional en el número de células que consumen O₂; (b) disminuyendo la tasa de fosforilación oxidativa y aumentando la glucólisis para disminuir el consumo de O₂, incrementando la síntesis de glucógeno y la utilización de glutamina y no la de la glucosa como principal sustrato para la síntesis de ácidos grasos (efecto Warburg); y (c) aumentando la producción de factores angiogénicos para aumentar la distribución de O₂.⁹

HIF es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia y regula la homeostasis del oxígeno. Este factor activa genes que codifican a

diferentes proteínas que incrementan la cantidad de oxígeno, permitiendo la adaptación metabólica cuando no hay suficiente oxígeno.

Estructuralmente, HIF es una proteína heterodimérica constituida por dos subunidades pertenecientes a la superfamilia de factores transcripcionales hélice-asa-hélice; la subunidad HIF1- α y la subunidad HIF1- β . La subunidad más estudiada es HIF1- α y su regulación está estrechamente relacionada con la concentración de O₂ celular, se caracteriza por tener un dominio de degradación dependiente de la concentración de O₂ (ODD).

En condiciones normales (normoxia) la degradación de HIF-1 α es controlada por el dominio ODD mediante hidroxilaciones por enzimas específicas [(hidroxilasas de residuos de prolina (PHs)], promoviendo la unión con la proteína Von Hippel-Lindau (pVHL), una ligasa de ubiquitina que favorece su degradación por el proteosoma.

Por otro lado, en condiciones de hipoxia disminuye la actividad de las enzimas PHs por lo tanto, esta disminución en la hidroxilación promueve su translocación y estabilización nuclear, afectando la interacción de HIF-1 α con pVHL. Cuando HIF- α se encuentra en el núcleo forma un complejo con su homodímero HIF-1 β (reside en el núcleo constitutivamente). El complejo que se forma favorece la unión a sitios ERH localizados en la región 5' promotora de sus genes blancos en donde se unirá a las secuencias específicas del ADN, activando genes implicados en la adaptación a la hipoxia, supervivencia celular, angiogénesis y metástasis como, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de transformación-alfa (TGF- α), el transportador 1 de glucosa (GLUT-1), o la anhidrasa carbónica IX (CA9), entre muchos otros, que sabemos están implicados en el desarrollo y la agresividad tumoral.^{10,11,12}

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) también participan en la regulación de HIF-1 α ,

En teoría, el principal regulador de HIF-1 α es el oxígeno y el segundo factor importante son los oncogenes, que pueden contribuir para estabilizar la proteína o degradarla como el gen supresor tumoral TP53, coeficiente de la proteína p53, la cual inhibe la actividad del HIF-1 α , volviéndolo un objetivo para la degradación

proteosómica. También la expresión del gen HIF-1 α puede regularse por la proteína cinasa B (Akt), la 3- fosfatil-inositol-cinasa (PI3K) y la vía de la AMPK.
13,14,15

2.3 HIF-1 α y el metabolismo del cáncer

Se ha demostrado que las células cancerosas tienen un metabolismo alterado en comparación con las células normales no malignas. El efecto Warburg describe un fenómeno en el que las células cancerosas metabolizan preferentemente la glucosa por medio de la glucólisis, produciendo lactato como producto final, a pesar de la presencia de oxígeno.

Este fenómeno fue descrito por primera vez por Otto Warburg. Los aspectos bioquímicos del efecto Warburg describen la causa de la proliferación de células cancerosas al proporcionar los requisitos biológicos para que una célula crezca. Se ha demostrado que las vías como PI3K, Akt, mTOR y HIF-1 α son reguladores centrales de la glucólisis, el metabolismo del cáncer y la proliferación de células cancerosas.

Los niveles de proteína HIF-1 α aumentan en la mayoría de los cánceres humanos y sus metástasis, además de que los niveles altos de HIF-1 α en la biopsia del tumor primario se asocian con un mayor riesgo de mortalidad en muchos tipos de cáncer.

Existen tres mecanismos generales por los cuales los niveles de HIF-1 α se incrementan en el cáncer humano. En primer lugar, la hipoxia intratumoral es frecuente y a menudo, grave. En segundo lugar, otras alteraciones del microentorno del tumor también aumentan los niveles de HIF-1 α , como la presencia de óxido nítrico o ROS. En tercer lugar, las alteraciones genéticas específicas del cáncer conducen a la desregulación de los niveles de HIF-1 α de una manera independiente de O₂.

Por otro lado, se sabe que varios mecanismos celulares están implicados en la adaptación a la hipoxia, como la activación de los canales iónicos y la regulación al alza directa de la glucólisis por la AMPK. La proteína cinasa activada por AMP (AMPK) se activa cuando el suministro de oxígeno está restringido. La AMPK actúa como un sensor de estado de energía e inhibe las rutas biosintéticas clave, conservándose así el ATP.¹⁶

Como se verá más adelante también HIF-1 α regula la capacidad de metástasis a través de la EMT.

2.4 Generalidades de AMPK y el cáncer

La AMPK es un heterotrímero formado por una subunidad catalítica (α) y dos subunidades reguladoras (β y γ). Esta enzima puede ser fosforilada y activada por LKB1 (Cinasa hepática B1) y la proteína Cinasa cinasa β dependiente de calcio (CaMKK2.)

La AMPK integra señales nutricionales y hormonales en los tejidos periféricos y el hipotálamo. Media los efectos de las adipocinas (leptina, adiponectina y posiblemente resistina) en la regulación de la ingesta de alimentos, el peso corporal y la homeostasis de la glucosa y los lípidos. La AMPK está regulada por cinasas río arriba de las cuales el supresor tumoral LKB1 fué el primero en ser identificado.¹⁴

En las células, el AMP activa alostéricamente el complejo AMPK estimulando la fosforilación del dominio quinasa en un residuo de treonina (Thr-172). Los tres efectos del AMP en el sistema AMPK (activación alostérica, fosforilación e inhibición de la desfosforilación) son antagonizados por altas concentraciones de ATP, por lo que el sistema esencialmente mide los cambios en la relación celular AMP: ATP.¹⁷

Dentro de la literatura se han estudiado diversos mecanismos anticancerígenos dependientes de la activación de AMPK, uno de ellos es la activación de p53. La activación de p53 conduce a la disociación del complejo p53-MDM2 y liberándose p53 en su forma activa. Esta activación de p53 inducida por AMPK juega un papel

importante e induce la detención del ciclo celular G1 / S. La activación prolongada de p53 induce la apoptosis en células cancerosas mediante la activación transcripcional de genes diana de p53 como p21 y Bax.^{18,19}

La autofagia es otro mecanismo por el cual la activación de AMPK ayuda a la adaptación al estrés metabólico. La AMPK activada desencadena la autofagia a través de la inhibición de mTORC1 y también a través de la fosforilación de ULK1.²⁰ Fisiológicamente, la autofagia es crucial para mantener la homeostasis celular y ayudar a las células bajo estrés, pero desde el punto de vista oncológico, la autofagia puede ser una amenaza, ya que también puede ayudar a las células tumorales a sobrevivir bajo condiciones de estrés

2.5 LKB1 y AMPK en el metabolismo y supresión del cáncer

Los diferentes estudios realizados para entender el metabolismo del cáncer arrojaron una nueva vía de señalización que vincula el metabolismo celular con el control del crecimiento y la polaridad celular involucrados con el supresor de tumores humanos LKB1; este codifica a una serina/treonina quinasa que fosforila directamente y activa AMPK.

Se identificó originalmente la LKB1 como el gen supresor de tumores en el cromosoma humano 19p13, responsable del trastorno de cáncer hereditario en el Síndrome de Peutz-Jeghers (PJS).

Antes de su identificación como un sustrato para LKB1, se sabía que la AMPK regulaba el metabolismo de los lípidos, el colesterol y la glucosa en tejidos metabólicos especializados como el hígado, el músculo y el tejido adiposo. En los últimos años se ha encontrado que una de las principales vías reguladoras del crecimiento controladas por LKB1-AMPK es la vía de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR). El mTOR es un integrador central de las entradas de nutrientes y factores de crecimiento que controla el crecimiento celular en todos los eucariontes y está desregulado en la mayoría de los cánceres humanos.

2.6 Transición epitelial mesenquimal

La transición epitelial-mesenquimal (EMT) es un proceso biológico que permite que una célula epitelial polarizada experimente múltiples cambios bioquímicos que le permitan asumir un fenotipo de célula mesenquimal, que incluye una mayor capacidad migratoria, invasividad, resistencia elevada a la apoptosis, cambios morfológicos y un gran aumento en la producción de componentes de la matriz extra celular.²¹

La EMT tiene lugar en tres contextos biológicos y diferentes consecuencias funcionales: EMT tipo 1 asociada con procesos del desarrollo embrionario, EMT tipo 2 asociada con procesos de cicatrización y regeneración tisular, y EMT tipo 3 asociada a progresión tumoral

En particular, el tipo 3 se produce en células neoplásicas que previamente han sufrido cambios genéticos y epigenéticos, específicamente en genes que favorecen el crecimiento clonal y el desarrollo de tumores deslocalizados. Estos cambios afectan notablemente a los oncogenes y los genes supresores de tumores.^{22,23}

Las proteínas de la superficie celular como la E-cadherina, que median la conexión entre células con la membrana basal, son reemplazadas por N-cadherina e integrinas que proveen a las células de uniones transitorias induciéndolas al fenotipo mesenquimal. Los componentes del citoesqueleto se reorganizan y la actina periférica es reemplazada por fibras de estrés, mientras que los filamentos intermedios de citoqueratina son reemplazados por vimentina. El fenotipo mesenquimal resultante se caracteriza por cambios morfológicos y moleculares tales como: adquisición de forma alargada parecida a la de los fibroblastos, sobreexpresión de marcadores mesenquimales (N-cadherina, vimentina, actina de músculo liso) y componentes de la matriz extracelular (colágeno $\alpha 1$ y $\alpha 2$), sub-regulación de marcadores de superficie de células epiteliales y componentes del citoesqueleto (E-cadherina, claudinas, ocludinas, citoqueratinas), sobreexpresión y/o translocación nuclear de factores de transcripción específicos (SNAIL, Slug, ZEB1/2, Twist1/2), resistencia a la apoptosis y aumento en la capacidad de

invasión y migración a través de la matriz extracelular sin contacto célula-célula (Figura 2).

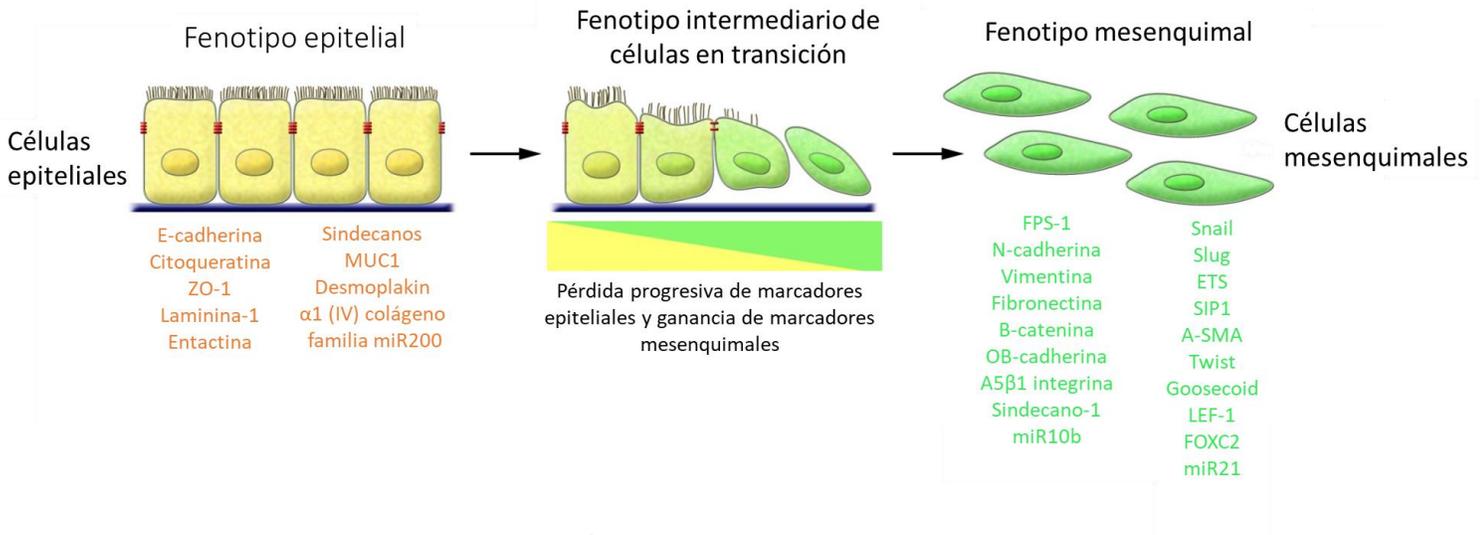


Figura 2. Marcadores de células epiteliales y mesenquimales comúnmente utilizados para la EMT. ²⁰

2.7 La metformina y su acción en el cáncer

La metformina (N', N'-dimetilbiguanida) es el fármaco antidiabético de primera línea más eficaz y seguro para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se cree que ejerce sus efectos antidiabéticos disminuyendo la producción de glucosa hepática y aumentando la sensibilidad a la insulina junto con el uso de glucosa por los tejidos periféricos.

La metformina tiene una amplia variedad de beneficios, se ha utilizado para el tratamiento de trastornos metabólicos, ovario poliquístico y la hipertensión, además de esos efectos positivos, hay interés en las propiedades antitumorales potenciales.

En la última década, se han identificado varios mecanismos para la acción de la metformina en la gluconeogénesis y la producción de la glucosa hepática.

La metformina induce efectos anticancerosos de manera AMPK dependiente y por mecanismos independientes de AMPK.

El mecanismo dependiente de AMPK juega un papel dominante ya que AMPK afecta el crecimiento celular y la proliferación. La metformina inhibe el complejo mitocondrial I, lo que tiene como consecuencia una baja producción de ATP y un aumento en la concentración de ADP que se convierte en AMP por la acción catalítica de la enzima adenilato cinasa. Cuando disminuye la concentración de ATP, AMP se une a la subunidad γ que conduce a algunos cambios conformacionales en la subunidad α que favorece la fosforilación de AMPK en Thr-172. Además, la inhibición del complejo I da como resultado la generación de especies reactivas de nitrógeno (ONOO⁻). Estos radicales activan a la proteína cinasa C ζ (PKC ζ), que a su vez, fosforila LKB1L, LKB1S en Ser-428 y 399, respectivamente, lo que lleva a su activación. Por lo tanto LKB1 activada fosforila la subunidad α de AMPK en Thr-172 y activa AMPK.²⁴

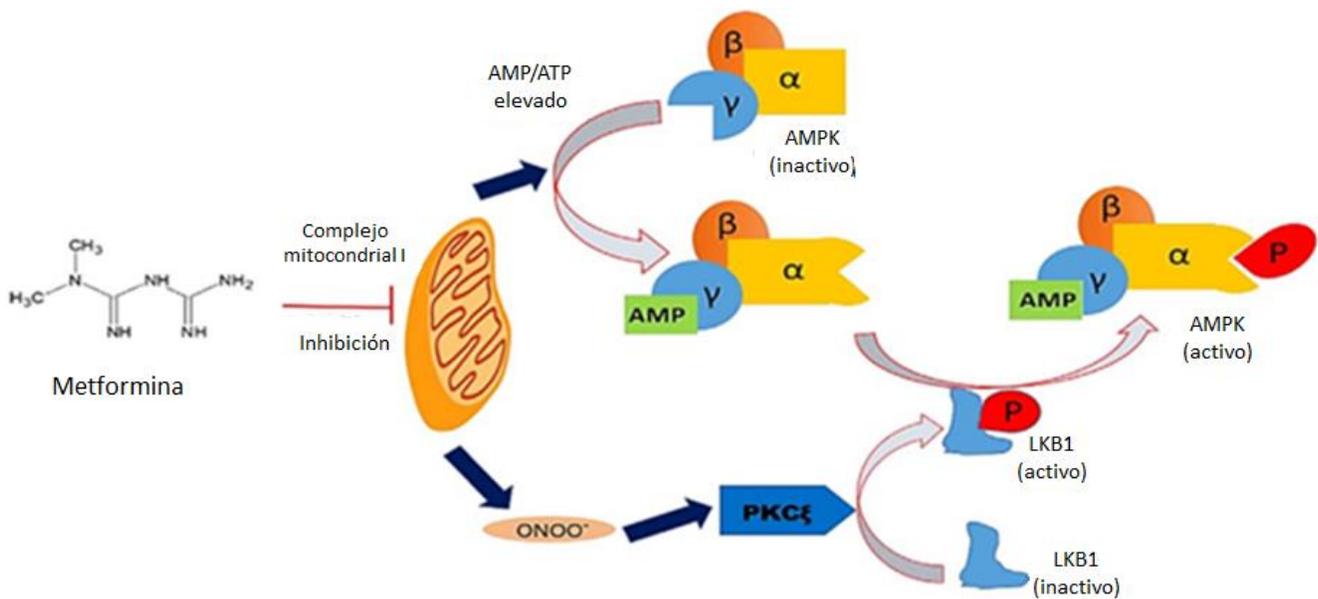


Figura 3. Activación de AMPK con metformina. AMPK = cinasa dependiente de AMP; AMP = monofosfato de adenosina; ONOO⁻ = especie de nitrógeno reactivo; PKC ζ = proteína cinasa C ζ ; LKB1 = hígado cinasa B 1

El mecanismo independiente de AMPK, está asociado con mTORC1, numerosos estudios han apoyado que la metformina inhibe mTORC1.

La señalización de mTORC1 es una vía importante de crecimiento y proliferación celular mediante el control de la autofagia, la biogénesis del ribosoma, la traducción del ARNm y el metabolismo.

Por lo tanto, al inhibir la actividad de mTORC1, la metformina detiene el crecimiento celular, la proliferación y la angiogénesis, y al explotarla puede usarse en el tratamiento del cáncer. Algunos trabajos demostraron que la inhibición de mTOR, también es consecuencia de la inhibición de la activación de AKT (Zakikhani, M, 2010).²⁵

Adicionalmente, se ha demostrado que la metformina inhibe la EMT en diversos tipos de tumores. A pesar de los buenos resultados de la metformina descritas *in vitro* en ensayos clínicos para cáncer de páncreas no se observaron los efectos buscados (Chaiteerakij R, 2016)²⁶, sin embargo, en cáncer de mama y de próstata sí se logró una mejoría.²⁷ Por lo anterior, es importante evaluar cada tipo de cáncer y conocer mejor los mecanismos involucrados, para ayudar a los médicos a tomar decisiones terapéuticas.

3.0 JUSTIFICACIÓN

El cáncer en la población pediátrica representa un problema de salud pública en la República Mexicana, ya que la tasa de incidencia y de mortalidad se ha disparado en los últimos años. En busca de nuevas terapias no invasivas se ha encontrado que la metformina tiene una amplia variedad de propiedades antitumorales. Los estudios epidemiológicos y de observación clínica sugieren que la metformina reduce el riesgo de cáncer en pacientes con diabetes tipo 2 y mejora el resultado de supervivencia de los cánceres humanos. En diversos tipos de cáncer se están realizando ensayos clínicos para estudiar el efecto de la metformina en la quimioprevención y tratamiento. Sin embargo, la efectividad de la metformina parece depender del tipo de tumor y de las mutaciones presentes en el mismo.

Uno de los mayores obstáculos para el desarrollo de terapias más eficientes para el cáncer es la falta de conocimiento total de los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en dicha patología. En particular, en este trabajo se explora la posibilidad de que la activación de AMPK por la metformina disminuya la expresión de HIF-1 α y la EMT en condiciones normales e hipóxicas, disminuyendo a su vez su capacidad invasiva y metastásica.

4.0 HIPÓTESIS

La activación de la vía de la AMPK mediante la administración de metformina disminuirá la estabilización de HIF-1^a en hipoxia y reducirá la expresión de los marcadores de la EMT.

5.0 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la activación de la vía de la AMPK con metformina, sobre la expresión de HIF-1 α y marcadores EMT en condiciones normales y de hipoxia en células de meduloblastoma.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la expresión y activación de AMPK, en condiciones normales, de hipoxia y después del tratamiento con metformina en células de meduloblastoma.
- Evaluar la expresión de HIF-1 α en condiciones normales, de hipoxia y después del tratamiento con metformina en células de meduloblastoma.
- Evaluar la expresión de E-cadherina y SNAIL en condiciones de hipoxia y después del tratamiento con metformina en células de meduloblastoma.
- Evaluar la expresión y activación de AKT, en condiciones normales, de hipoxia y después del tratamiento con metformina en células de meduloblastoma.

6.0 METODOLOGÍA

6.1 Diagrama del procedimiento experimental

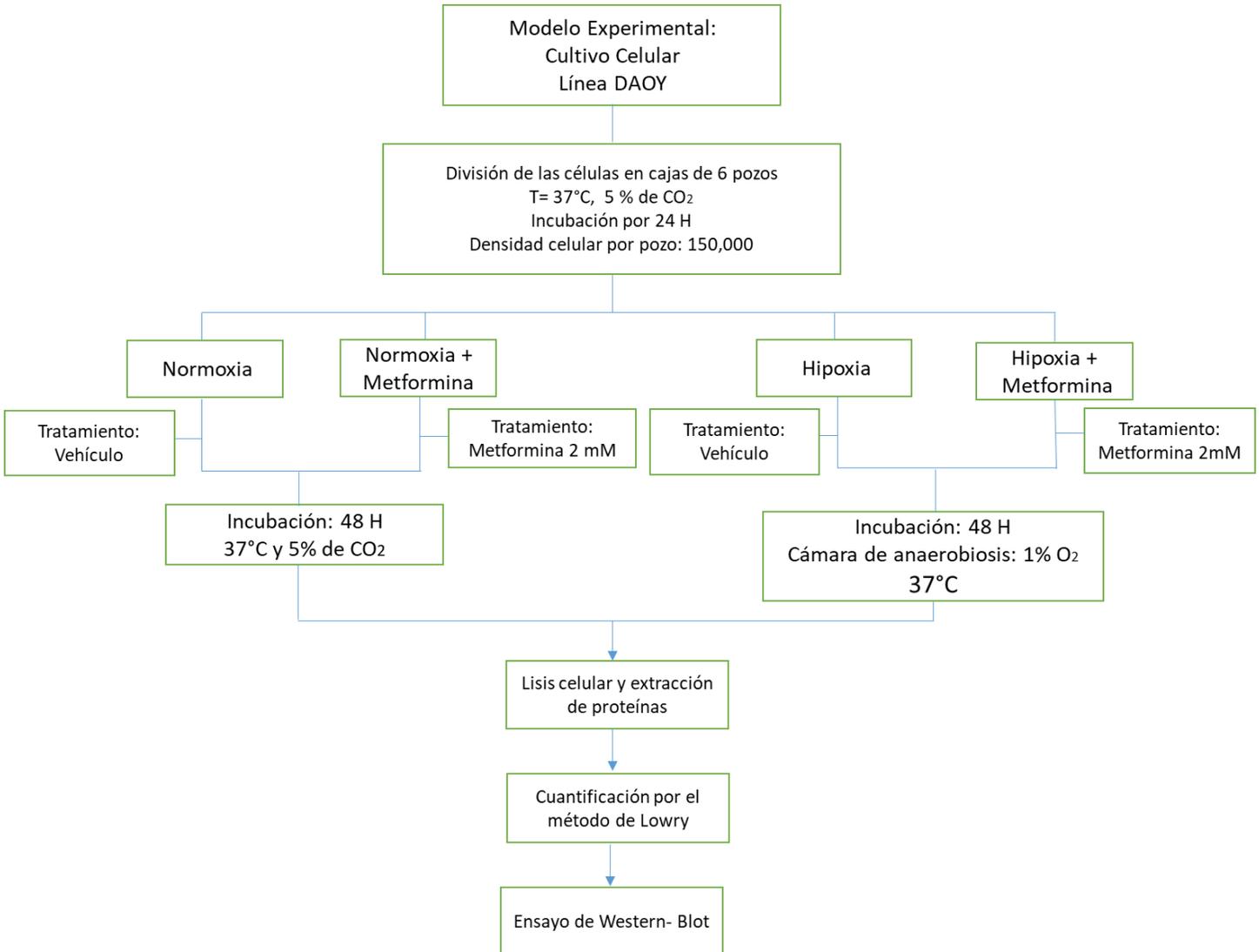


Figura 4. Diagrama de la metodología y tratamiento utilizados durante el protocolo de investigación.

6.2 Cultivo de la línea celular DAOY

Se cultivaron las células de la Línea DAOY de meduloblastoma en medio EMEM y poco a poco se adaptaron al medio DMEM alto en glucosa, estéril complementado con antibióticos y 10% de SFB por una semana, se fue cambiando el medio cada tercer día para mantener la viabilidad de las células. Los cultivos celulares permanecieron en incubadora, a una temperatura de 37°C, con una concentración de CO₂ de 5%.

6.3 Formación de los grupos experimentales

Una vez que las células se encontraron viables, se realizó el levantamiento celular utilizando tripsina, para posteriormente realizar un conteo de las células en la cámara de Neubauer, para colocarlo en cajas de 6 pozos una densidad celular de 150,000 células en cada pozo y dejándolas incubar por 24 h con temperatura de 37°C y una concentración de 5 % de CO₂.

Posterior a las 24 h de incubación se cambia medio de las cajas de 6 pozos y se hicieron cuatro grupos: Control Normoxia (N), Normoxia Metformina (N+M), Control Hipoxia (H), Hipoxia Metformina (H+M), la concentración de metformina usada fue de 2 mM. Se agregó vehículo (H₂O miliQ) a las cajas que no llevan tratamiento.

Las cajas de H e H+M fueron llevadas a una cámara anaerobia por un tiempo de incubación de 48 h, con las siguientes condiciones 1% de O₂ y a 37°C. Las cajas de N y N+M se incubaron en condiciones estándar en 37°C con 5% CO₂ por 48 H.

6.4 Ensayo de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se empleó el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT), el cual es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de células viables a formazan formando una coloración púrpura.

Para el ensayo con MTT se utilizó una placa de 96 pozos y se colocó una suspensión celular con una concentración de 1×10^5 células/mL, se dejó incubar a 37°C hasta el día siguiente en condiciones estándar.

Pasado el tiempo de incubación se aspiró el medio y se adicionó medio nuevo, se agregaron $100 \mu\text{L}$ a los pozos.

Se adicionó la metformina ($1 \mu\text{L}$, 0.2 M) y se incubó por 48 h a condiciones de hipoxia y normoxia.

Posterior al tiempo de incubación se añadieron $10 \mu\text{L}$ de la solución MTT (5 mg/mL en PBS) y se incubó la placa por 3 h a condiciones estándar. Posterior a ese tiempo se aspiró el medio de la placa para adicionar $100 \mu\text{L}$ de DMSO se incubó 1 h más a las mismas condiciones, al finalizar esa hora, se leyeron las absorbancias a 570 nm en el lector de placas.

6.5 Lisis celular y extracción de proteína

Para la extracción de proteína de cultivos celulares, fue necesario preparar amortiguadores de lisis, la composición del amortiguador es la siguiente: HEPES 50 mM , KCL 50 mM , EDTA 1 mM , EGTA 1 mM , β -Glicerolfosfato 5 mM , Triton X100 0.1% , NaF 50 mM , NaPPi 5 mM , posteriormente se le adicionaban los siguientes inhibidores, DTT 1 mM , PMSF 0.2 mM , Na_3VO_4 1 mM y finalmente el inhibidor del proteasas Complete Tablet, mini marca Roche (una tableta por cada 10 mL de amortiguador de lisis base + inhibidores). Una vez preparado el amortiguador de lisis, se procedió a realizar la lisis.

Posterior a las 48 h de incubación se sacan las cajas de la incubadora de condiciones estándar y de la cámara de anaerobiosis, se colocaron las cajas en frío, se aspiró el medio DMEM y se le adicionó a cada pozo PBS 1X frío, para limpiar el exceso de medio, se aspiró el PBS 1X , y se agregaron $150 \mu\text{L}$ del amortiguador de lisis a cada uno de los pozos, se homogenizó por todo el fondo del pozo, para finalmente con una espátula raspar las células y recuperar la suspensión celular en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 16128 g por 20 min a 4°C .

6.6 Determinación del contenido de proteína por método de Lowry

La determinación de proteína soluble se realizó utilizando el método cuantitativo de Lowry y los datos de absorbancia se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) con concentraciones en un intervalo de 0 a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Para la muestra se utilizan: 5 μL de muestra, 45 μL de agua grado I, 100 μL de deoxicolato de sodio al 0.4% (DOC) y 1 mL de Reactivo de Lowry se mezcló el contenido de cada tubo y se reposa 10 min, finalmente se adicionaron 100 μL de reactivo de Folin diluido 1:1, se mezcló el contenido de cada tubo, se dejó reposar 30 min, transcurrido ese tiempo de incubación, las muestras se leyeron a 580 nm en el espectrofotómetro.

6.7 Ensayos de Western-blot (WB) y revelado por quimioluminiscencia

Para el análisis de proteínas por WB se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS de 15 pozos de 1.5 mm de ancho al 10% el gel separador y 4% el gel concentrador respectivamente, la concentración de los geles varió dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. Las muestras se ajustaron a una cantidad de proteína de 50 μg por carril, utilizando amortiguador de carga 4X con el 20% de β -mercaptoetanol para desnaturalizar las proteínas y PMSF y EDTA para impedir la proteólisis; posteriormente se hirvieron por 5 min a 95 °C. Las muestras se cargaron en el gel para la separación de proteínas por peso molecular en la cámara de electroforesis (PowerPac HC BIORAD)

Una vez terminada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de los geles, para eso, se utilizaron membranas de PVDF (Polivinilidenodifluoruro), activadas previamente con metanol durante 5 min y posteriormente 5 min en agua. Los geles se colocaron en un recipiente con 250 mL de amortiguador de transferencia 1X. Posteriormente se realizó la transferencia por el método húmedo durante 45 min, usando una cámara de transferencia de Bio-Rad a un amperaje constante de 300 mA.

Al finalizar la transferencia, las membranas se colocaron en una solución de bloqueo con leche en polvo libre de grasa al 5% disuelta en TBS-T 0.1 % para una membrana de HIF-1 α y PBS-T 0.1% para las otras durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de bloqueo las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de interés (HIF-1 α / SNAIL 1:500, / Actina 1:10,000 para la membrana uno, E-cadherina 1:500, P-AMPK 1:2000/ AMPK-t 1:1000/ Actina para la membrana dos, P-LKB1 1:1000/ LKB1-t 1:3000 / Actina 1:10,000 y por último P-AKT 1:1000/ AKT-t 1:1000/ Actina 1:10,000) y los geles se tiñeron con Azul de Coomassie, para asegurar que las proteínas se transfirieran completamente.

Posterior al tiempo de incubación de los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados de la membrana con TBS-T 0.1% para HIF-1 α y PBS-T 0.1% para los demás anticuerpos por 5 min cada lavado y se incubó con anticuerpo secundario correspondiente (HRP-ratón para HIF-1 α , HRP-conejo para actina), a una dilución 1:1000 en leche al 3% con PBS-T 0.1%, durante 2 h, en agitación constante a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-T 0.1% para la membrana de HIF-1 α y PBS-T 0.1% para las demás membranas.

Para el revelado de la membrana se agregó una solución de sustrato de luminol y peróxido de hidrógeno 1:1 por 3 min en la oscuridad; transcurridos los 3 minutos, se reveló por quimioluminiscencia en un fotodocumentador (ChemiDoc Bio-Rad) y se guardaron las imágenes.

Las bandas de las proteínas reconocidas por el anticuerpo se analizaron por densitometría en el programa de Quantity One normalizando los datos con actina.

6.8 Análisis estadístico

Los ensayos de Western-blot fueron evaluados por la prueba de U de Mann-Whitney para lo cual se consideró diferencia significativa cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

Los valores mostrados en cada una de las tablas están expresados como la media \pm el error estándar.

7.0 RESULTADOS

7.1 Resultados del ensayo de viabilidad celular

En el ensayo de viabilidad por el método de MTT no se observaron cambios significativos en la viabilidad de las células al ser incubadas con metformina 2 mM en condiciones normales y de hipoxia (Gráfico A). En diversos estudios se ha demostrado que la metformina no es tóxica a la concentración de 2 mM, por ejemplo para las células de hepatocarcinoma, en otro tipo de células como cáncer de mama y de ovario la muerte celular se presenta a concentraciones mayores. De acuerdo con el objetivo de este trabajo se pretendía evaluar los efectos de la metformina a concentraciones no tóxicas para las células, para comprender mejor los posibles mecanismos involucrados.

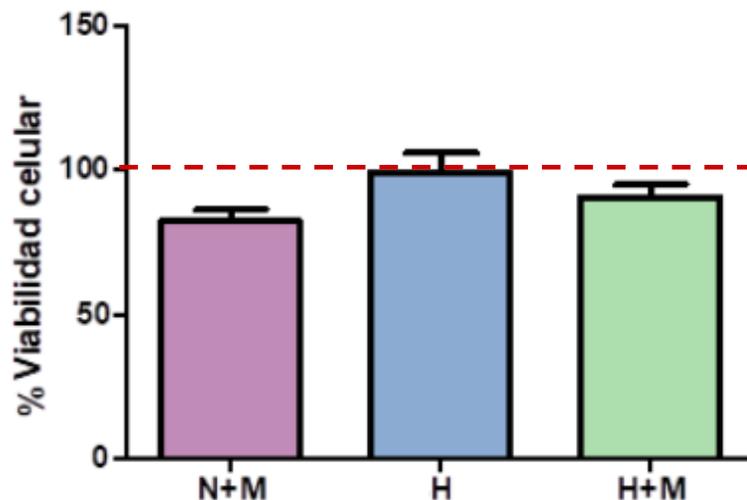


Gráfico A). Efecto de la metformina 2 mM sobre la viabilidad celular.
N+M: Normoxia + metformina, H: Hipoxia, H+M: Hipoxia + metformina.

7.2 Resultados de la estandarización y expresión de la proteína HIF-1 α

Se realizó la estandarización de los cultivos celulares en la cámara de anaerobiosis mediante el seguimiento de la proteína HIF-1 α a diferentes tiempos (24 y 48 h). En el gráfico B se puede observar que a 24 h la expresión de HIF-1 α es mínima. Mientras que la estabilización de HIF-1 α es mayor a las 48h de incubación en hipoxia,

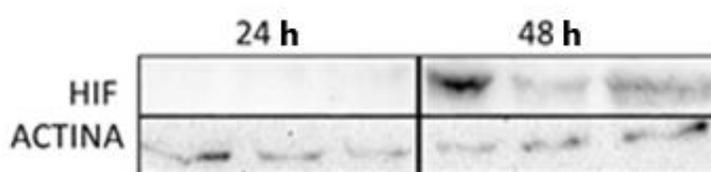


Gráfico B). Análisis por Western-blot de la proteína HIF-1 α en células DAOY incubadas durante 24 y 48 h en cámara anaerobia (1% de O₂ a 37°C)

Posterior a la estandarización del método se realizaron los experimentos para observar con los diferentes grupos experimentales N, N+M, H, H+M, la expresión de la proteína HIF-1 α , a las condiciones de 48 h de incubación en hipoxia.

Después de realizar el análisis estadístico se obtuvo el gráfico C en el cual se observa que en condiciones de normoxia (N) no existe una acumulación significativa de la proteína de HIF-1 α , lo cual es normal debido a que la proteína HIF1- α , es degradada en condiciones normales. Se observa todo lo contrario cuando se encuentra en condiciones de hipoxia (H) y se presenta un incremento significativo comparándolo con la condición N y con la condición H+M disminuye debido a que la metformina disminuye la actividad de HIF-1 α .

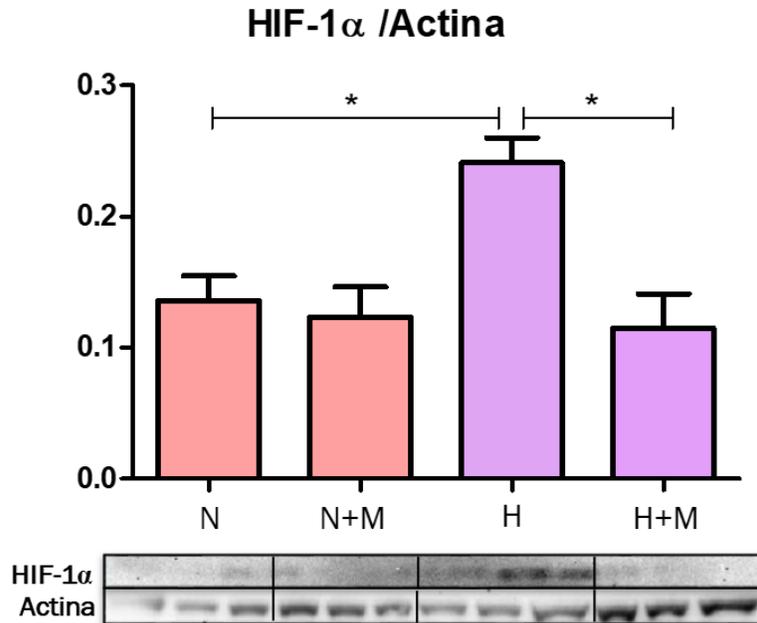


Grafico C). Expresión de la proteína HIF-1 α * $p < 0.05$; disminución de la expresión de HIF-1 α debido al efecto de metformina. N, n=3; N+M, n=3; H, n=3; H+M, n=3.

7.3 Resultados de la activación de AMPK

La enzima AMPK funciona como un sensor del estado energético de la célula, permite adaptarse a bajo nivel de ATP, existe dos cinasas involucradas con AMPK, LKB1 y CaMKK2.

Se analizó también la actividad de la proteína AMPK, y se pudo observar que en condiciones de normoxia la metformina tiene un efecto positivo activando a AMPK (comparando las condiciones N y N+M), todo lo contrario, con las condiciones de hipoxia, en la que antes de la administración de metformina (H) se activa a la proteína AMPK pero al estar en contacto con la metformina se ve disminuida Gráfico D.

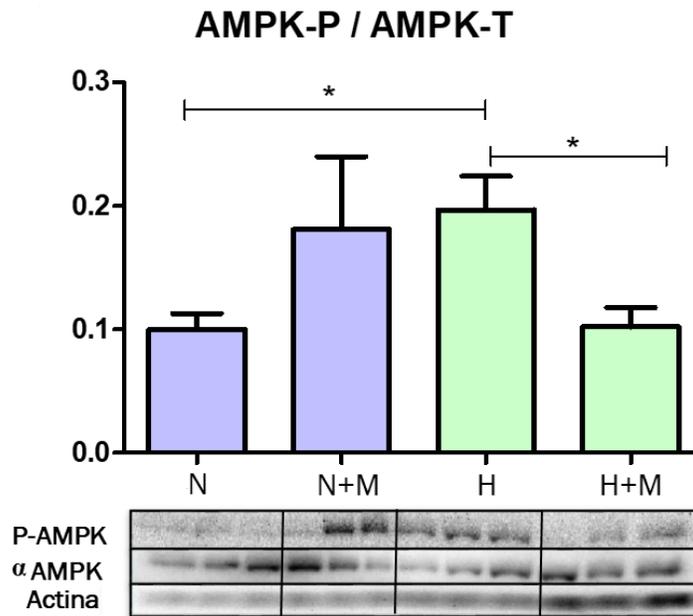


Gráfico D). Expresión de la proteína AMPK, en diferentes condiciones. Disminución de AMPK, debido a la acción de la metformina. * $p < 0.05$. N, $n=3$; N+M, $n=3$; H, $n=3$; H+M, $n=3$.

7.4 Resultados de la expresión de la proteína LKB1

Los resultados de la densitometría para la proteína LKB1, revelan que tiene un comportamiento similar al gráfico de AMPK, ya que refleja que en condiciones de normoxia y al ser administrado con metformina (N, N+M) LKB1 se fosforila. Lo contrario sucede con la condición de hipoxia (H), ya que la hipoxia incrementa la activación, pero con la administración de metformina se puede observar una disminución significativa de la fosforilación (Gráfico E).

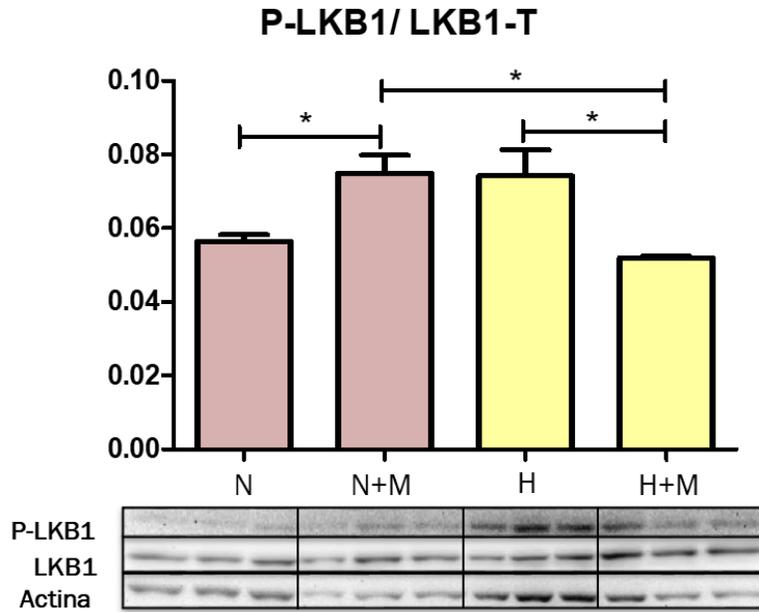


Gráfico E). Activación y expresión de la proteína LKB1. Disminución de LKB1, debido a la acción de la metformina. * $p < 0.05$. N, $n=3$; N+M, $n=3$; H, $n=3$; H+M, $n=3$.

7.5 Resultados de la expresión proteínas de la EMT

La E-cadherina es un importante marcador de la EMT, por lo tanto se analizó la expresión de esta proteína, el siguiente gráfico revela, que en condiciones normales (CN y N+M) no se observan cambios significativos, pero cuando la condición cambia a hipoxia se observa un ligero incremento y cuando se administra la metformina se puede ver claramente una disminución significativa de la expresión de E-cadherina. Lo curioso de estos resultados es que según la literatura, la expresión de esta proteína disminuye con la hipoxia, caso contrario a lo que se puede observar (Gráfico F)

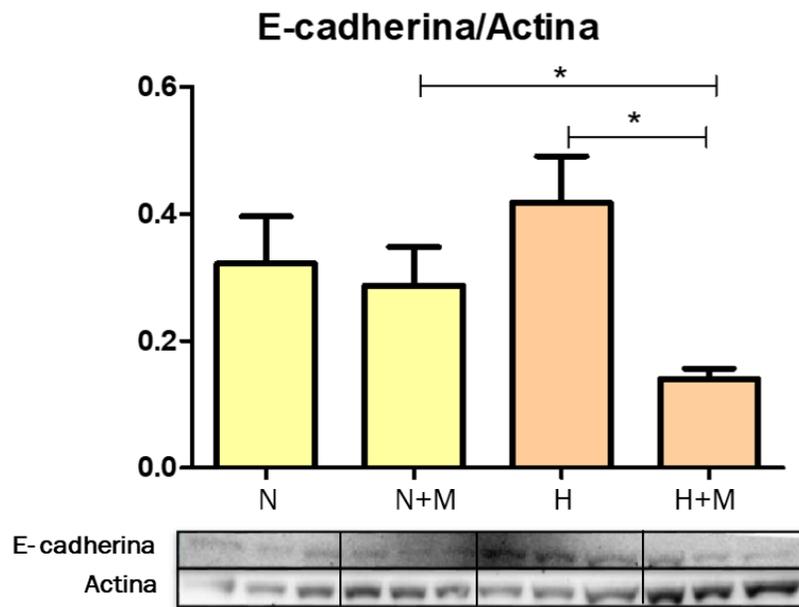


Gráfico F). Expresión de la proteína e-cadherina. * $p < 0.05$. N, $n=3$; N+M, $n=3$; H, $n=3$; H+M, $n=3$.

Otro de los marcadores importantes de la EMT es la proteína SNAIL. En condiciones de normoxia se observa un nivel alto de la expresión de esta proteína comparándola con la condición de N+M y la de hipoxia. Por otra parte, es importante mencionar que en la condición de hipoxia más la metformina (H+M) esta expresión disminuye considerablemente (Gráfico G).

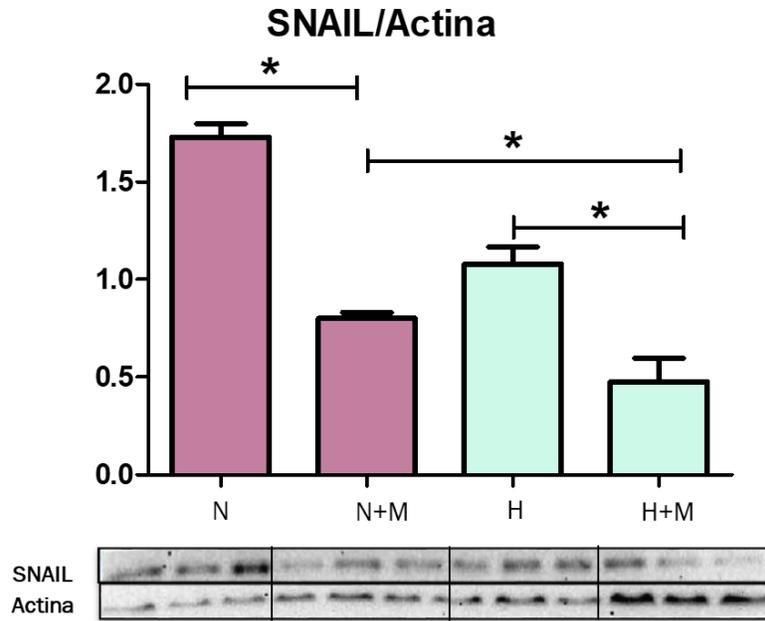


Grafico G) Expresión de la proteína SNAIL. * $p < 0.05$. N, $n=3$; N+M, $n=3$; H, $n=3$; H+M, $n=3$.

7.6 Resultados de la expresión de la proteína AKT

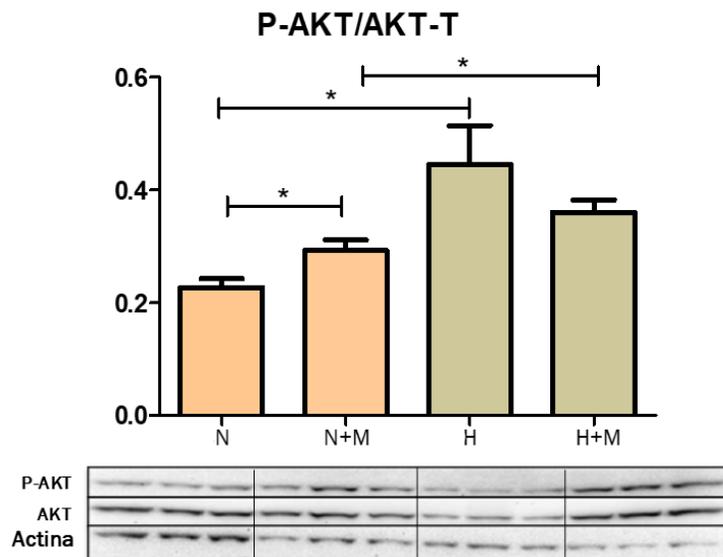


Gráfico H) Fosforilación de la proteína AKT. * $p < 0.05$. N, $n=3$; N+M, $n=3$; H, $n=3$; H+M, $n=3$.

Según los resultados obtenidos para la proteína AKT se puede observar que esta proteína se activa por la metformina, tanto en normoxia e hipoxia. Lo curioso es que en condiciones solo hipóxicas la proteína aumente más la expresión y al comparar con hipoxia + metformina podría observarse que disminuye visiblemente aunque no es estadísticamente significativo (Gráfico H).

8.0 DISCUSIÓN

La hipoxia intratumoral es un fenómeno común de tumores sólidos, y un factor microambiental importante que influye en el desarrollo de un fenotipo maligno del cáncer. Según los resultados obtenidos anteriormente podemos observar claramente que el estrés hipóxico aumentó la expresión de HIF-1 α a comparación con la condición de normoxia.

Existe evidencia reciente que indica que los niveles elevados de HIF-1 α se encuentran en los cánceres humanos y están asociados con la progresión tumoral y la angiogénesis; sin embargo, la condición que llama la atención en los resultados es la de Hipoxia + Metformina en la cual se logró observar una disminución estadísticamente significativa de HIF-1 α . Como menciona Zhou X et al.²⁸, la metformina inhibe la acumulación de HIF-1 α inducida por la hipoxia y al parecer lo hace de manera independiente de AMPK.

Se ha estudiado la vía de la AMPK para conocer los diversos mecanismos que están involucrados con su activación y su acción metabólica. La fosforilación puede darse por la acción de la calmodulina (CAMKKb), en respuesta de altos niveles de Ca²⁺ y a su vez por la cinasa LKB1.^{3,29}

En este trabajo podemos deducir por los experimentos realizados que en condiciones de normoxia la metformina ejerció el efecto esperado, que era ver una mayor activación de AMPK, ya que como sabemos la metformina puede llegar a activar dicha vía por medio del complejo mitocondrial I. Por el contrario a lo que esperábamos al cambiar las condiciones a las de hipoxia no observamos sinergia en la activación de AMPK, ya que bajo el estrés generado por la hipoxia el tratamiento de metformina disminuye significativamente la activación de AMPK. A este respecto en la literatura se sugiere que, bajo condiciones de hipoxia la metformina disminuye el consumo mitocondrial de O₂ al inhibir el complejo I, aumentando la oxigenación celular (Zhou X et al).²⁸

De la misma forma que AMPK, cuando analizamos a LKB1 una cinasa que se le ha relacionado con la supresión de tumores, y está directamente involucrada dentro de la vía de activación de AMPK, podemos ver una similitud con los gráficos de la actividad de AMPK, ya que claramente, se observa que en condiciones de normoxia (en ambas condiciones) si hay un incremento en la actividad de la proteína, por el contrario de la hipoxia más metformina donde a diferencia de la hipoxia se ve un decremento, ya que se sabe que LKB1 es la principal cinasa que fosforila la activación AMPK en condiciones de estrés energético como lo es la hipoxia.

Por otro lado, la EMT se describe como el proceso durante el cual las células epiteliales pierden propiedades como la adherencia con las células vecinas y se convierten en células migratorias e invasivas, está estrechamente relacionado con la progresión del cáncer.

La literatura menciona distintos tipos de marcadores para la caracterización de la EMT, en este trabajo se evaluaron 2: la expresión de la proteína E-cadherina y la expresión de SNAIL.

Como se revisó anteriormente, una de las características de la EMT es la pérdida de la proteína E-cadherina, que es una molécula de adhesión que regula las uniones célula-célula y detiene el crecimiento celular a través de interacciones con β -catenina en el citoplasma, que se cree que es un supresor metastásico durante la progresión tumoral³⁰. Por lo tanto, podemos decir que la E-cadherina es una molécula clave relacionada con el potencial metastásico de la mayoría de los tumores epiteliales. La E-cadherina desempeña un papel central en el control de la transición epitelio mesenquimal, ya que la pérdida de su expresión o función está correlacionada con la capacidad de las células epiteliales de adoptar una morfología invasiva y migratoria.

Las evaluaciones de este trabajo para la proteína E-cadherina mostraron que en condiciones de hipoxia, la proteína se incrementa contrario a lo reportado por Esteban et al. 2006 ³¹, en su artículo mencionan que en condiciones de hipoxia, la estabilización de HIF, está asociada a la pérdida de la expresión de E-cadherina.

Otro mecanismo involucrado en la expresión de E-cadherina según Olmeda, D. et al 2007 ³² es el control a nivel transcripcional por el factor Snail/Slung, ya que su activación suprime la expresión de E-cadherina.

El tratamiento con metformina durante hipoxia disminuye la expresión de E-cadherina considerablemente, lo que podría ser contraproducente para este tipo de células dado que la pérdida de esta proteína provocaría que las células tuvieran la capacidad de migrar hacia otros sitios, provocando metástasis. Este hallazgo es contrario a lo que se ha reportado en otros estudios en normoxia, que Zhang, C., & Wang, Y., 2018 ³³, describen en su trabajo que en células de cáncer colorrectal de la línea HCT116, la metformina atenuó el proceso de EMT aumentando la expresión del marcador epitelial E-cadherina bajo condiciones de oxígeno normales.

También se realizó una evaluación a la proteína SNAIL, que como mencionamos anteriormente es un represor de la expresión de E-cadherina. Los resultados de dicha evaluación sugieren que SNAIL no es el responsable de la expresión de E-cadherina, debido a que en condiciones de hipoxia e hipoxia + metformina se observa una expresión muy similar de ambas, llamando más la atención en la condición de hipoxia + metformina que explicaría que un tratamiento con metformina hará a las células de meduloblastoma más proliferativa y con la capacidad más alta a migrar. Sin embargo, existe otra vía que podría estar involucrada, la vía de TWIST un factor de transcripción capaz de regular a la E-cadherina inhibiendo su expresión.

AKT regula la muerte celular, la progresión del ciclo celular y el crecimiento celular, así como el control de las tasas de captación de glucosa en la célula a través del transportador GLUT1 y de mTOR. Según los resultados obtenidos, en el gráfico se muestra que en condiciones de hipoxia e hipoxia + metformina la proteína AKT se encuentra activada comparando con las condiciones de normoxia. A este respecto, Hanneke Stegeman ³⁴, informó que AKT se encuentra

activada en las zonas de hipoxia en algunos tumores, pero por otro, lado en estas células de meduloblastoma no se observó la inhibición esperada de AKT después del tratamiento con metformina, lo cual sugiere que existen otros mecanismos que mantienen activa a AKT.

9.0 CONCLUSIONES

En las células DAOY, la metformina no activa la vía de la AMPK durante la hipoxia, de igual forma el tratamiento con metformina en hipoxia induce aparentemente la EMT al disminuir E-caderina y aumentar SNAIL.

10.0 PERSPECTIVAS

Debe hacerse un análisis más extenso de los marcadores de la EMT para confirmar estos resultados por ejemplo marcadores como ZEB y TWIST.

Adicionalmente deben hacerse pruebas de invasividad y crecimiento independiente del anclaje.

11.0 BIBLIOGRAFIA

1. Pacheco, M. & Madero, L. Oncología pediátrica. *Psicooncología* **0**, 107–116 (2003).
2. Arvelo, F. & Cotte, C. Hipoxia en la malignidad del cáncer. *Invest. Clin.* **50**, 529–546 (2009).
3. Hardie, D. G. & Alessi, D. R. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol.* **11**, 1–11 (2013).
4. Jaggi, M. *et al.* Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **23**, 402–406 (2005).
5. Sinning, M. Clasificación De Los Tumores Cerebrales. *Médica Clínica Las Condes* **28**, 339–342 (2017).
6. INEGI. "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)". *Comunicación Social* 1–13 (2018).
7. León, M. I. M. Meduloblastoma pediátrico , revisión y puesta al día. *Radiología* **53**, 134–145 (2012).
8. Otayza, F. Tumores De La Fosa Posterior En Pediatría. *Médica Clínica Las Condes* **28**, 378–391 (2017).
9. Semenza, G. L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J. Clin. Invest.* **123**, 3664–3671 (2013).
10. Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. HIF1 alpha and HIF2 alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 9–22 (2012).
11. Fraga, A., Ribeiro, R. & Medeiros, R. Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol. Esp.* **33**, 941–951 (2009).
12. Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., Ralph, S. J., Rodríguez-Enríquez, S. & Moreno-Sánchez, R. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Medicinal chemistry* **9**, 1084–101 (2009).
13. Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A. & Saavedra, E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* **274**, 1393–1418 (2007).
14. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase : Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25 (2005).

15. Shaw, R. J. *et al.* The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci* **101**, 3329–3335 (2004).
16. Marsin, A. S. *et al.* Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* **10**, 1247–1255 (2000).
17. D. Grahame Hardie, John W. Scott, David A. Pan, E. R. H. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS J.* **546**, 113–120 (2003).
18. Lee, C., Wong, L. L. & Tse, E. Y. AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer Res.* **17**, 4394–4404 (2012).
19. Sionov, R. V. & Haupt, Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**, 6145–6157 (1999).
20. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 132–139 (2010).
21. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
22. Kalluri, R. & Weinberg, R. a. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
23. Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M. & Christofori, G. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 194–207 (2012).
24. Ikhlas, S. & Ahmad, M. Metformin: Insights into its anticancer potential with special reference to AMPK dependent and independent pathways. *Life Sci.* **185**, 53–62 (2017).
25. Mahvash Zakikhani, M.-J. B. & Esther Piura, M. N. P. Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **123**, 271–279 (2010).
26. Chaiteerakij, R. *et al.* Metformin use and survival of patients with pancreatic cancer: a cautionary lesson. *J. Clin. Oncol.* **34**, 1898–1908 (2017).
27. Whitburn, J., Edwards, C. M. & Sooriakumaran, P. Metformin and Prostate Cancer: a New Role for an Old Drug. *Curr Urol Rep* 1–7 (2017). doi:10.1007/s11934-017-0693-8
28. Zhou, X. *et al.* Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1 through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **7**, 873–884 (2015).
29. Witczak, C. A., Sharoff, C. G. & Goodyear, L. J. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3737–3755

(2008).

30. Gumbiner, B. M. Cell Adhesion : The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell Press* **84**, 345–357 (1996).
31. Esteban, M. A. *et al.* Regulation of E-cadherin Expression by VHL and Hypoxia-Inducible Factor. *Cancer Res.* **15**, 3567–3576 (2006).
32. Olmeda, D. *et al.* SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 Cells. *Cancer Res.* **24**, 11721–11731 (2007).
33. Zhang, C. & Wang, Y. Metformin attenuates cells stemness and epithelialmesenchymal transition in colorectal cancer cells by inhibiting the Wnt3a/betacatenin pathway. *Mol. Med. Rep.* **19**, 1203–1209 (2018).
34. Stegeman, H. *et al.* Activation of AKT by hypoxia : a potential target for hypoxic tumors of the head and neck. *BMC Cancer* **12**, 2–10 (2012).

12.0 APÉNDICE

12.1 Líneas Celulares

Línea Daoy

12.2 Reactivos utilizados

Amortiguador de lisis base

Reactivo	Producto	Peso molecular (g/mol)	Concentración mM	Cantidad en mg para 500 mL de amortiguador de lisis base
HEPES	Sigma-T1503	238.3	50	5.9575
KCl	/	74.75	50	1.8687
EDTA	Sigma-E005	292.2	1	0.1461
EGTA	Sigma-E 4378	380.11	1	0.1901
B-Glicerol fosfato	Sigma 50020	306.11	5	0.7652
TRITON X100	Sigma X 100		10%	500uL

Aforar a 500 mL con agua grado II y ajustar pH a 7.4.

Inhibidores adicionados al amortiguador de lisis base

Inhibidor	Concentración del stock (M)	Cantidad en uL para 1mL de amortiguador de lisis base
DDT	1	2
PMSF	0.1	2
Ortovanadato	0.5	2
NaF	1	50
Nappi	0.25	20

Una vez añadidos los inhibidores se agrega 1 pastilla de MiNi-C-complete de Roche (se disuelve 1 pastilla por cada 10mL de amortiguador de lisis base + inhibidores).

Amortiguadores y soluciones utilizados en los ensayos de Western-blot

Amortiguador de corrida 5X	15 g Tris base 5 g SDS 5 g Glicina Aforar a 1 L con H ₂ O grado II Ajustar pH:8.3 con HCl
Amortiguador de corrida 1X	150 mL Amortiguador de corrida 5X llevar a 750 mL con H ₂ O grado II
Amortiguador de Transferencia 5X	15 g Glicina 15 g de Tris base Aforar a 1 L con H ₂ O grado II
Amortiguador de Transferencia 1X	50 mL de Amortiguador de transferencia 5X 50 mL de metanol 150 mL de H ₂ O grado II
PBS 10X	82 g NaCl 13 g PO ₄ HNa ₂ 1.76 g PO ₄ H ₂ Na Aforar a 1 L con H ₂ O grado II y ajustar pH 7.6
PBS-TWEEN 0.1% (PBS-T 0.1%)	100 mL PBS10X 1 mL de Tween 20 llevar a 1 L con H ₂ O grado II

Soluciones de anticuerpos primarios, todos los anticuerpos se diluyeron con leche al 3% en PBS-T al 0.1%

Anticuerpo	Marca	Concentración
HIF-1 α	Abcam	1:500
E- Cadherina	Abcam	1:500
SNAIL	Abcam	1:500
p-LKB1	Cell signaling	1:2000
LKB1-t	Invitrogen	1:2000
p-AKT	Cell signaling	1:1000
AKT-t	BD Transduction laboratories	1:1000
p-AMPK	Abcam	1:1000
AMPK-t	Cell signaling	1:1000
Actina	Santa Cruz	1:10000

Soluciones de anticuerpos secundarios, todos los anticuerpos fueron diluidas con Leche al 3% en PBS-T al 0.1%.

Anticuerpo	Marca	Concentración
Anti-anti conejo	Cell signaling	1:2000
Anti-ratón	Cell signaling	1:1000
Anti-anti conejo (actina)	Cell signaling	1:1000

12.3 Equipos utilizados

Cámara de Hipoxia. Modelo Bactrox 03000114, HYPO1A
Campana de Flujo laminar NUAIRE. Modelo NO.NU-126-300
Espectrofotómetro UV-Vis and UV-Vis-NIR Systems CARY 100 UV-Vis
Lector de placas Modulus Microplate Turner Biosystems
Cámara de electroforesis: PowerPac HC BIORAD
Cámara de transferencia, TRANS-BLOT SD, semi-dry Transfer Cell
Fotodocumentador y análisis de densitometría: Chemidoc BIORAD
NanoDrop, Spectrophotometer, ND-1000