



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la expresión de frataxina en las líneas  
celulares PC12 y DBTRG-05MG al inducir hipoxia  
química

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA

P R E S E N T A

LUCERO MONSERRAT GALINDO MORENO



Directora de Tesis

DRA. MARISOL OROZCO IBARRA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. DATOS DEL ALUMNO  
Galindo  
Moreno  
Lucero Monserrat  
55 67 50 36 11  
México  
Universidad Nacional Autónoma de México  
313107104
  
2. DATOS DEL TUTOR  
Doctora  
Marisol  
Orozco  
Ibarra
  
3. DATOS SINODAL 1  
Doctor  
Ramírez  
Jarquín  
Josué Orlando
  
4. DATOS SINODAL 2  
Doctora  
Ramírez  
Torres  
Nayeli
  
5. DATOS SINODAL 3  
Maestra en Ciencias  
Mendoza  
Von der Borch  
Ana Paulina
  
6. DATOS SINODAL 4  
Bióloga  
Montiel  
Montes  
Teresa

## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Marisol Orozco Ibarra en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS). Se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (subvención 300461) para la adquisición de equipamiento científico y reactivos especializados.

## **Agradecimientos a título personal**

Mis padres, las personas que sin importar nada no han escatimado esfuerzos y mucho menos amor. Gracias por caminar a mi lado, respetar mis decisiones y ser partícipes de cada una de mis metas. Muchas de las cosas que ven en mi están en ustedes.

A mis compañeros de vida, mis hermanos, quienes cada día, por muy duro que fuera, lograban sacarme una sonrisa. No hay palabras que me permitan expresar lo que significan para mí.

A mi tía Guadalupe Galindo, quién desde que yo era muy pequeña me animó a mejorar para cumplir mis metas. Las palabras no alcanzan para agradecerte por todos los días que estuviste para mí.

A mis abuelos, ejemplo de superación y resiliencia. Al resto de mi familia, quienes siempre me han expresado su cariño y apoyo.

Mi gordis, Itzel, gracias por brindarme tu amistad, entendí gracias a ti lo que es estar, verdaderamente estar para alguien. Agradezco sobremanera toda la motivación que me das siempre.

Celeste Betancourt, gracias por estar incondicionalmente para mí, me has mostrado el significado y valor de la amistad. Gracias por inspirarme a ser mejor persona y motivarme a cumplir mis metas, no sabes lo mucho que te admiro.

Ferni, ¡Que fortuna que la biología nos permitiera coincidir! Desde nuestra primera charla en el metro supe que se quedaría en mi vida mucho tiempo. Gracias por su amistad, su apoyo incondicional y por cada empujón que me dió.

A Mildred y JJ, qué fortuna coincidir, con pocas personas puedo hablar de cosas tan random. Son unos biólogos magníficos, no tengo duda. No hay mayor regalo que contar con su amistad y apoyo.

A todas y cada una de las personas que conocí en el LNMyC. Gracias por su compañía y por haber hecho de mi permanencia en el lab una magnífica experiencia. Gigi, gracias por toda la paciencia que me tuviste, por cada risa y todo lo que hemos compartido. Te agradezco sobretodo que me ayudaras a mejorar en muchos aspectos y que me brindaras tu amistad.

A la Dra Norma Serrano, le agradezco profundamente su ayuda y su guía en varios experimentos. Gracias también por las charlas y por los consejos que me dió. Qué fortuna haber coincidido con usted.

A mi asesora, la Dra Marisol Orozco. En primer lugar le quiero agradecer por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo. Comprendí gracias a usted y su labor como asesora que una mentoría responsable impacta de manera positiva en el alumno/a. Gracias por la paciencia que me tuvo, por todos los consejos que me brindó, por sus retroalimentaciones, las cuales siempre fueron acertadas y me ayudaron a mejorar. Sobretodo le agradezco que me permitiera acercarme a la investigación con este proyecto qué, sin duda alguna, representa mucho para mí.

A los sinodales, quienes a través de sus comentarios y sugerencias contribuyeron a la mejora de esta tesis.

A mi Alma máter, la Universidad Nacional Autónoma de México, Institución que me dió las herramientas necesarias para crecer como persona y profesional.

*“La verdadera generosidad en relación al futuro es dárselo todo al presente”*

Albert Camus

## DEDICATORIA

**A mis padres:**

Sandra Moreno

Ricardo Galindo

**A mi abuelo:**

Juan Galindo López

## Tabla de abreviaturas

CTE	Cadena de transporte de electrones
ATC	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HIF	Factor inducible a hipoxia
PHD	Prolilhidroxilasa
HRE	Elemento sensible a hipoxia
ADM1	Adenosilmetionina descarboxilasa
GLUT	Glucotransportador
EPO	Eritropoyetina
SOD	Superóxido dismutasa
GPX1	Glutación peroxidasa
CAT	Catalasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
LDH	Lactato deshidrogenasa
IRP	Proteína reguladora de hierro
IRE	Elemento sensible a hierro
SFB	Suero fetal bovino
SC	Suero de caballo

# Contenido

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Oxígeno y la producción de ATP.	11
1.2 Hipoxia	12
1.3 Factor inducible por hipoxia	12
1.4 Cambios metabólicos durante la hipoxia	14
1.5 Hipoxia y la producción de ERO	15
1.6 El <i>CoCl<sub>2</sub></i> para generar un modelo de hipoxia	16
1.7 Hierro y su relación con la producción de ERO	16
1.8 Homeostasis del Hierro	17
1.9 Frataxina	17
1.10 Frataxina e Hipoxia	20
1.11 Líneas celulares	21
1.12 El estado de proliferación celular y la hipoxia	21
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
4.1 General	22
4.2 Particulares	22
5. METODOLOGÍA	23
5.1 Materiales y Reactivos	23
5.2 Diseño experimental	23
5.3 Cultivo Celular	24
5.4 Viabilidad celular	24
5.5 Producción de especies reactivas de oxígeno	24
5.6 Inmunofluorescencia	25
5.7 Análisis Estadístico	25
6. RESULTADOS	26
6.1 Prueba de viabilidad celular	26
6.2 Producción del anión superóxido.	29
6.3 Producción de ERO	31
6.4 Expresión de la frataxina	32

7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIÓN	38
9. PERSPECTIVAS	38
10. REFERENCIAS	39

## RESUMEN

**Introducción:** La hipoxia se presenta tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y tiene como resultado un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), debido a esto se da una respuesta adaptativa ante la hipoxia orquestada por el factor inducible a hipoxia (HIF). La proteína mitocondrial frataxina es crucial para la vida celular; no hay consenso sobre su función, pero parece participar en la homeostasis del hierro mitocondrial, la biogénesis del grupo Fe-S y la modulación de la producción de ERO. Se ha visto que la frataxina se regula a la alza en condiciones de hipoxia en algunas células cancerígenas lo que implica que tiene un papel crítico en la supervivencia y/o progresión tumoral. Sin embargo, aún no queda claro si la relación frataxina-hipoxia es un evento común en líneas celulares distintas.

**Objetivo:** Determinar la expresión de frataxina posterior a exponer a las líneas celulares PC12 y DBTRG-05MG a  $CoCl_2$ , agente mimético de hipoxia.

**Metodología:** Las células PC12 y DBTRG-05MG se trataron con  $CoCl_2$  0-1 mM. Se midió la viabilidad celular mediante la reducción de MTT, la producción de anión superóxido a 0, 16 y 24 h usando MitoSOX™ Red, la producción de otras ERO a 0, 0.5 y 1 h usando CellROX™ green, así como la expresión de frataxina a 0, 8 y 16 h por inmunocitoquímica.

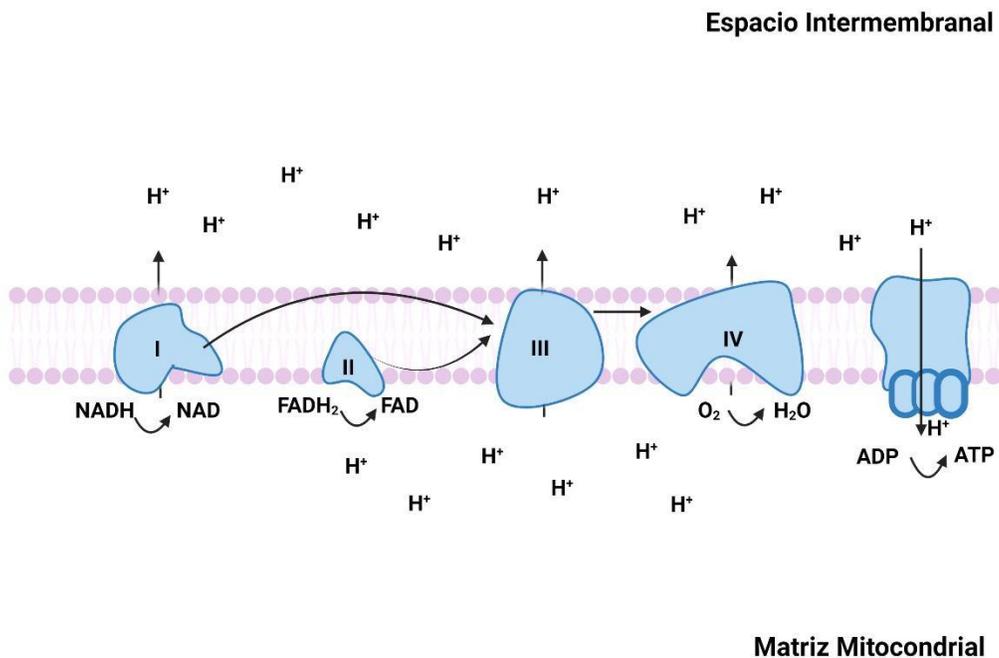
**Resultados:** El  $CoCl_2$ , agente mimético de hipoxia disminuyó la viabilidad celular tanto en células PC12 como en DBTRG-05MG. Se observó un aumento en la producción del anión superóxido. Ambas líneas celulares mostraron una producción basal de ERO. La expresión de frataxina aumentó en ambas líneas celulares posterior a la exposición del agente mimético.

**Discusión y conclusión:** La regulación positiva de frataxina observada después de la exposición a la hipoxia es consistente con estudios previos. La expresión de frataxina se reguló al alza en ambas líneas celulares evaluadas, lo que indica que la frataxina tiene un papel importante tanto en líneas celulares cancerosas como no cancerosas bajo condiciones de hipoxia

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Oxígeno y la producción de ATP.

El oxígeno es una molécula esencial para la vida, es necesario para llevar a cabo procesos catabólicos que derivan en la producción de ATP. Esta molécula es el último aceptor de transporte de electrones (CTE), de la cadena respiratoria. Las coenzimas NADH y FADH<sub>2</sub>, resultantes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC) son oxidadas de manera que los electrones pasan por los complejos I a IV de la cadena de CTE. El paso de los electrones a través de los complejos permite el flujo continuo de protones a través de la membrana mitocondrial interna lo que genera un gradiente electroquímico. En el complejo IV, los electrones reducen al oxígeno produciendo de manera natural moléculas de agua. Sin embargo, una baja proporción de electrones escapa, principalmente de los complejos I y III, y reduce parcialmente al oxígeno produciendo especies reactivas de oxígeno (ERO). El gradiente electroquímico impulsa la formación de ATP a través de la fosforilación del ADP, proceso que se da por la actividad de una ATP sintasa (figura 1) (Martínez-Reyes & Chandel 2020).



**Figura 1.** Cadena de transporte de electrones. Las coenzimas NADH y FADH<sub>2</sub> se oxidan cediendo electrones a los complejos I y II, respectivamente. De éstos, los electrones pasan al complejo III y luego al IV, generando el gradiente electroquímico que impulsa la formación de ATP por medio de la ATP sintasa. Modificado de Martínez-Reyes & Chandel (2020). Creado con BioRender.com

## 1.2 Hipoxia

Las células requieren de un suministro constante de oxígeno para la producción continua de ATP. La disminución en la concentración de oxígeno se define como hipoxia. Aunque la disponibilidad de oxígeno depende de varios factores y de los requerimientos energéticos de cada tejido, es común que en condiciones fisiológicas o patológicas se presente una disminución en su concentración. La hipoxia fisiológica suele presentarse de manera moderada, lo cual permite que se presenten respuestas adaptativas como la angiogénesis y eritropoyesis fisiológica (Taylor & Colgan., 2017), por ejemplo, durante el desarrollo embrionario temprano, específicamente durante la gastrulación, se requiere llevar a cabo procesos de vascularización y proliferación celular, la vascularización será producida principalmente por células privadas de oxígeno (Keith et al., 2011). En el ámbito patológico la hipoxia puede contribuir al desarrollo y progresión de la enfermedad (Taylor & Colgan., 2017), patologías como el cáncer y la isquemia suelen estar acompañadas de disminuciones en la concentración del oxígeno.

Debido a la importancia de la biodisponibilidad del oxígeno para la supervivencia de las células, éstas han desarrollado mecanismos para la detección del oxígeno y para responder adaptativamente en caso de que se presenten fluctuaciones en la cantidad de oxígeno disponible (Wilson et al., 2020). La presión normal de oxígeno varía en cada tejido (tabla I). A nivel celular, las respuestas a la adaptación por hipoxia inician a una presión de oxígeno que oscila entre los 7-10 mmHg (McKeon., 2014).

<b>Tabla I.</b> Presión parcial de oxígeno en algunos Órganos del cuerpo humano	
<b>Órgano</b>	<b>PO<sub>2</sub> (mmHg)</b>
Cerebro	35 mmHg
Pulmón	40 mmHg
Hígado	40 mmHg
Sangre Arterial	100 mmHg

**PO<sub>2</sub>**, presión parcial de oxígeno; **mmHg**, milímetros de mercurio. Modificado de Chen, Y., & Gaber, T. (2021).

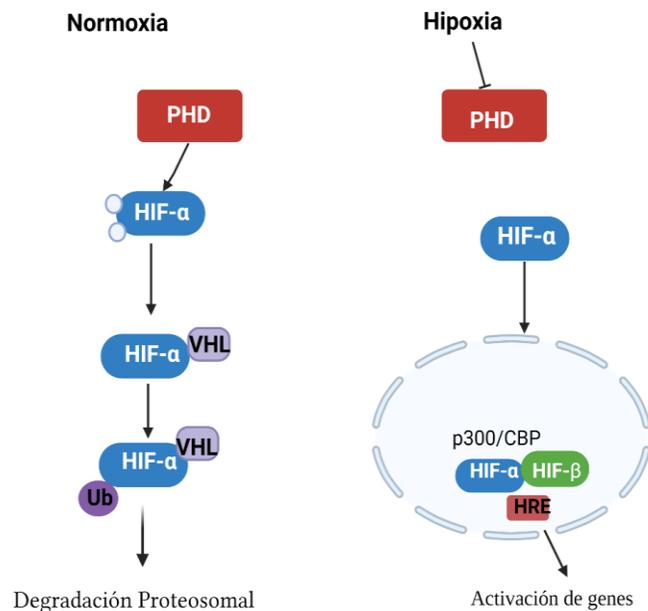
La falta de oxígeno se puede dar durante un periodo corto (hipoxia aguda) o un periodo prolongado (hipoxia crónica).

## 1.3 Factor inducible por hipoxia

La respuesta adaptativa ante la hipoxia se da a nivel sistémico, celular y molecular con la finalidad de mantener la homeostasis de oxígeno (Michiels, 2004). La respuesta a nivel molecular ante la hipoxia crónica está dirigida principalmente por

un factor de transcripción, conocido como factor inducible por hipoxia (HIF): HIF-1, HIF-2 (Tirpe et al., 2019).

HIF es un heterodímero compuesto por dos subunidades, HIF- $\alpha$  y HIF- $\beta$ . La expresión de la subunidad HIF- $\beta$  es constante, por el contrario, la subunidad HIF- $\alpha$  está regulada negativamente por la prolil hidroxilación dependiente de las concentraciones de O<sub>2</sub> (Semenza, 2013). En condiciones normóxicas, la subunidad HIF- $\alpha$  se hidroxila a dos residuos de prolina (Pro402 y Pro564) dentro del dominio de degradación dependiente de oxígeno, la hidroxilación se llevará a cabo por la actividad de las enzimas prolilhidroxilasas (PHD). Posterior a la hidroxilación, los residuos de prolina son reconocidos por la proteína Von Hippel-Lindau (VHL), esta proteína es el componente de reconocimiento para la ligasa ubiquitina E3, una vez que ocurre el reconocimiento la proteína es llevada a una degradación proteosómica. En condiciones de hipoxia se inhibe la actividad de la PHD, lo cual impide que exista un reconocimiento de HIF- $\alpha$  con la proteína VHL, por lo tanto, no se da la degradación proteosómica. En este caso, HIF- $\alpha$  se transloca al núcleo donde la subunidad HIF- $\alpha$  se dimeriza con la subunidad HIF- $\beta$ , donde además las subunidades se unen al coactivador de la transcripción p300/CBP. Una vez formado este complejo, el HIF queda activo y está listo para unirse al elemento sensible a la hipoxia (HRE, por sus siglas en inglés) e iniciar con la activación de múltiples genes diana (figura 2) (Correira & Moreira, 2010).



**Figura 2.** Representación esquemática del HIF en condiciones de Normoxia e Hipoxia. En condiciones de normoxia HIF- $\alpha$  es llevada a degradación proteosómica. Mientras que en condiciones de Hipoxia el HIF queda activo para lograr transcribir y activar a una serie de genes diana. La subunidad HIF- $\beta$  permanece constante en el núcleo. Modificado de Correira & Moreira (2010). Creado con BioRender.com

Una vez que el HIF queda activo, tiene la capacidad de transcribir genes, por lo que se conoce al HIF como un regulador central que actúa en respuesta a hipoxia para establecer cambios ante una disminución crónica de oxígeno. La tabla II presenta algunos genes que se activan por la translocación de HIF-1 $\alpha$  como HIF-2 $\alpha$ .

<b>Tabla II. Algunos genes activados por el HIF</b>		
<b>Genes Diana</b>	<b>Función</b>	<b>Isoforma que activa al gen</b>
ADM1	Angiogénesis	HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$
GLUT	Transportador de glucosa	HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$
EPO	Eritropoyesis	HIF-2 $\alpha$
TGF $\alpha$	Factor de crecimiento	HIF-2 $\alpha$
SOD	Enzima Antioxidante	HIF-2 $\alpha$
HK1, HK2	Glucólisis	HIF-1 $\alpha$
<b>ADM1</b> , adenosilmetionina descarboxilasa 1 ; <b>GLUT</b> , glucotransportadores; <b>EPO</b> , eritropoyetina; <b>TGF<math>\alpha</math></b> , factor de crecimiento transformante alfa; <b>SOD</b> , superóxido dismutasa, <b>HK</b> hexocinasa (Keith et al., 2011)		

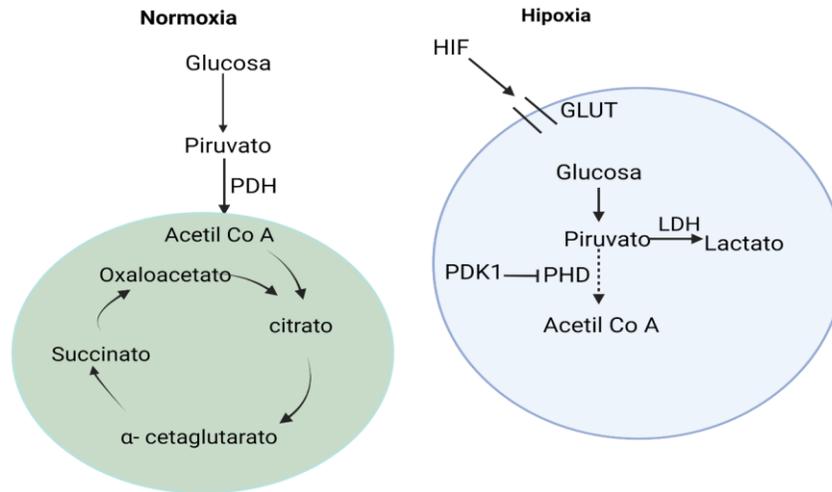
#### 1.4 Cambios metabólicos durante la hipoxia

Las respuestas adaptativas ante la hipoxia se dan a múltiples niveles, dada la importancia del oxígeno en el catabolismo, una de las adaptaciones más importantes ocurre a nivel metabólico. En condiciones de normoxia, la glucosa, a través de la glucólisis, produce dos moléculas de piruvato para que en la mitocondria se convierta a Acetil CoA por acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH). El Acetil CoA se utiliza en el ciclo de los ATC para finalmente lograr obtener a las coenzimas reductoras NADH y FADH<sub>2</sub>, las cuales son utilizadas en la cadena de transporte de electrones.

Durante la exposición a la hipoxia, la activación de HIF interfiere en los cambios metabólicos disminuyendo principalmente el flujo de carbono y activando transportadores de glucosa como GLUT1. De acuerdo a Wheanton & Chandel (2011) se presenta una disminución en la conversión de piruvato a Acetil CoA, a través de un aumento en los niveles de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1); con el aumento en los niveles de los PDK1 inhibe a la PDH, disminuyendo la conversión de piruvato a Acetil CoA. Aunado a esto, se impulsa la conversión de piruvato a lactato con acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (figura 3). La conversión de piruvato a lactato disminuye la actividad del ciclo de Krebs lo cual impacta en el descenso de la producción de NADH y FADH<sub>2</sub> coenzimas que ceden electrones a la cadena de transporte de electrones.

Dada la alta dependencia de la mitocondria al oxígeno para la respiración celular, este organelo se ve gravemente afectado ante la hipoxia. Por lo tanto, la hipoxia

altera la actividad metabólica de la mitocondria y se ha reportado que también impacta en la fusión y fisión mitocondrial (Fuhrmann & Brüne, 2017).



**Figura 3.** El HIF induce cambios metabólicos. Uno de ellos a través de la activación de GLUT para aumentar la glucólisis. Así mismo, se observan cambios en la actividad enzimática donde se promueve la conversión de piruvato a lactato por acción de la enzima LDH. Hay una disminución en la conversión de Piruvato a Acetil CoA por la inhibición de la actividad de la PHD, por lo que se presenta una disminución en el metabolismo oxidativo. Modificado de Wheanton & Chandel 2011. Creado con BioRender.com

### 1.5 Hipoxia y la producción de ERO

Adicional a los cambios metabólicos, la hipoxia tiene como consecuencia una sobreproducción de ERO. En condiciones de normoxia, las mitocondrias son una fuente de ERO, las cuales están implicadas en distintos procesos de señalización celular, apoptosis o proliferación (Fuhrmann & Brüne, 2017). Sin embargo, la mitocondria responde ante la hipoxia generando mayor cantidad de ERO (Hielscher & Gerecht, 2015). Algunos autores plantean que el aumento en la producción de ERO proviene del complejo III mitocondrial durante la hipoxia aguda (Hernansanz-Agustin et al., 2020). La liberación de ERO al citosol se ha propuesto como un mecanismo que puede estabilizar a la proteína HIF- $\alpha$  (Goyal et al., 2004; Guzy et al., 2005; Bell et al., 2007). Se desconoce el mecanismo mediante el cual las ERO pueden inactivar a las prolihidroxilasas, sin embargo, se ha propuesto que estas podrían oxidar al  $Fe^{2+}$ , lo que derivaría en la inhibición de la PHD (Gerald et al., 2004). Los aumentos en la producción de ERO representan una amenaza para las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, cuya oxidación puede conducir al declive celular.

## 1.6 El $CoCl_2$ para generar un modelo de hipoxia

Para conocer los mecanismos que subyacen a la estabilización de HIF se han propuesto diversos modelos experimentales. Uno de los modelos para el estudio de la hipoxia es el uso de agentes miméticos, tal es el caso del cloruro de cobalto ( $CoCl_2$ ), que es un modelo ampliamente utilizado y se ha documentado que su uso conduce a un aumento en la producción de ERO (Tripathi et al., 2019).

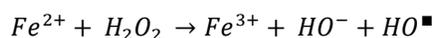
Pese a que no hay un consenso acerca de cómo el  $CoCl_2$  estabiliza a HIF, se sabe que este agente químico puede bloquear la actividad de la PHD, inhibiendo la degradación proteosomal de HIF (Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas 2019). El cloruro de cobalto podría activar a HIF a través de varios mecanismos, sin embargo, de acuerdo con Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas (2019), la hipótesis de reemplazo ha sido la más aceptada. Esta hipótesis propone que el mecanismo responsable para la estabilización de HIF, es el reemplazo del  $Fe^{2+}$  por el  $Co^{2+}$  en el sitio activo de PHD.

Se ha demostrado que las prolihdroxilasas tienen un sitio de unión al hierro, que puede ser remplazado por el cobalto, lo que resultaría en la inhibición de la degradación del HIF. También se ha planteado que el cobalto inhibe la interacción de HIF con la proteína VHL (Lee et al., 2018).

## 1.7 Hierro y su relación con la producción de ERO

El hierro es un elemento esencial para diversas funciones celulares y sistémicas, este metal es un componente de diversas metaloproteínas involucradas en el transporte de oxígeno, respiración mitocondrial, y señalización celular. El hierro se utiliza en reacciones de óxido-reducción y participa en el ensamblaje de grupos Fe-S (Wang & Babitt., 2019).

La capacidad del hierro para participar en reacciones de óxido-reducción le permite unirse a varios ligandos, sin embargo, estas propiedades químicas también le permiten participar en reacciones nocivas no deseadas como la generación de ERO mediante la reacción de Fenton. La reacción de Fenton es una reacción química donde el peróxido de hidrógeno reacciona con el hierro ferroso para producir un radical hidroxilo (Torti et al., 2018).



En presencia de superóxido, el hierro férrico puede reducirse nuevamente a hierro ferroso, que es capaz de producir más reacciones de Fenton, a este ciclo se le conoce como reacción de Heber-Weiss, este ciclo logra producir una mayor cantidad de ERO. Debido a la capacidad del hierro para aumentar la producción de ERO, es que se debe regular la concentración sistémica y celular de este metal.

## 1.8 Homeostasis del Hierro

La regulación del hierro ocurre a nivel celular y sistémico mediante la actividad de múltiples proteínas. A nivel sistémico, la regulación del hierro está orquestada por una hormona reguladora de las concentraciones plasmáticas de hierro. La hepcidina es una hormona polipeptídica que regula la absorción y distribución del hierro en los tejidos. La regulación del hierro a nivel celular se da mediante la actividad de la proteína reguladora de hierro 1 y 2 (IRP, por sus siglas en inglés) (Martelli et al., 2015). Las IRP modulan a nivel transcripcional proteínas que participan en la absorción, transporte y almacenamiento de hierro, a través de las interacciones de las IRP con los elementos sensibles a hierro (IRE, por sus siglas en inglés), que están dentro de la región no traducida (UTR). Las IRP por lo tanto, regulan negativa o positivamente la traducción, dependiendo de si hay deficiencia o acumulación del hierro en la célula (Zhou & Tan, 2017). Algunas de las proteínas reguladas por las IRP se mencionan en la tabla III.

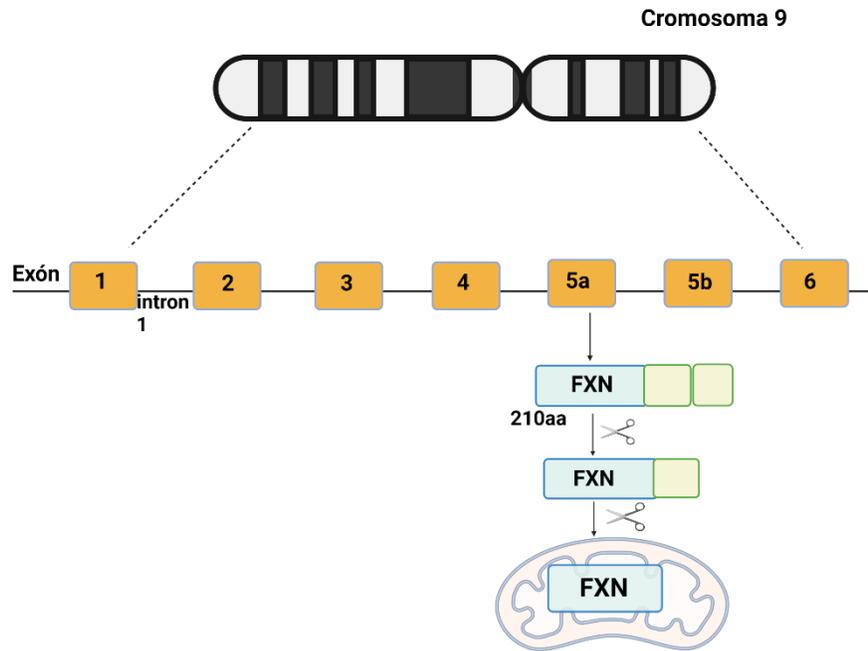
<b>Tabla III: Proteínas reguladas por la IRP</b>	
<b>Proteína</b>	<b>Función</b>
Ferritina	Almacenamiento de hierro
Transferrina (TfR)	Transporte de hierro
Transportador de dimetales 1 (DMT1)	Absorción de hierro
Ferroportina	Transporte de hierro
Frataxina	Síntesis de grupos Fe-S

(Zhou & Tan, 2017; Martelli et al 2015).

## 1.9 Frataxina

La frataxina es una proteína que ha sido recientemente caracterizada. Por primera vez, Campuzano y colaboradores (1996) clonaron y secuenciaron el gen *FXN* que codifica para la proteína. Localizado en el cromosoma 9, el gen que codifica para esta proteína está compuesto por siete exones (figura 4), el transcrito principal proveniente del exón 5A codifica para una proteína de 210 aminoácidos que tiene localización mitocondrial. La frataxina es codificada en el núcleo, tiene una secuencia con dirección mitocondrial N-terminal (Abruzzo et al., 2013). Cuando la proteína se transloca desde el citosol hasta las mitocondrias sufre dos escisiones para que se dé lugar a la frataxina madura activa. La primera escisión da como resultado una forma intermedia de la proteína que consta de 169 aminoácidos, la

segunda escisión produce la forma madura de la frataxina, proteína que consta de 130 aminoácidos (Weng et al., 2019; Guo et al., 2018).



**Figura 4:** Esquema que ejemplifica la estructura del gen que codifica a frataxina. Creado con BioRender.com

Se han reportado transcritos adicionales que dan lugar a cuatro isoformas de la frataxina (tabla IV) (Abruzzo et al., 2013). Una isoforma de la frataxina (FXN-E) fue descubierta en eritrocitos, hecho que llama la atención debido a que éstos carecen de mitocondrias, la proteína carece de dirección N-terminal, por lo que permanece en el citosol (Guo et al., 2018). Se ha sugerido que la frataxina extramitocondrial tiene un papel importante en proteínas dependientes de grupos Fe-S involucradas en la reparación del ADN (Lill, R. et al., 2015), la isoforma E podría estar implicada en el ensamblaje de grupos Fe-S, de manera similar a como lo hace la proteína mitocondrial (Guo et al., 2018). La frataxina se expresa mayoritariamente en tejidos que requieren de una alta demanda energética tales como: cerebro, corazón, hígado, páncreas y médula espinal (Agró & Díaz, 2020).

<b>Tabla IV: Isoformas de la frataxina</b>			
<b>Isoforma</b>	<b>Transcrito (Exones)</b>	<b>Longitud</b>	<b>Localización</b>
FXN-1	1A, 2-4 y 5A	210 aa	mitocondrial
FXN-2	1 A, 2-4 y 5B	171 aa	mitocondrial
FXN-3	5A (empalme alternativo)	196 aa	mitocondrial
FXN-E	1B,2-4 y 5A	135 aa	citosólica

**FXN**, frataxina; **aa**, aminoácidos

Aunque continua en debate la función de la frataxina, se han hecho varias propuestas acerca de los posibles papeles de esta proteína, algunos de estas se mencionan en la tabla V. La razón por la cual no se ha esclarecido la función de la proteína es porque hay información contradictoria, por ejemplo, se ha propuesto que la sobreexpresión de frataxina tiene funciones antioxidantes (Runko et al., 2008; Schultz et al., 2018), sin embargo, también un estudio muestra que la sobreexpresión de la frataxina puede causar daño mitocondrial al tener cambios sobre la actividad enzimática de los complejos I y II (Belbellaa et al., 2020). Por otra parte, se ha visto que la hipoxia rescata la deficiencia de frataxina. De acuerdo con Ast y colaboradores (2019), las líneas celulares, larvas de nematodo y levaduras en condiciones de hipoxia y que no expresan frataxina, continúan proliferando. Lo cual podría parecer contradictorio con las funciones descritas previamente debido a que la hipoxia promueve la producción de ERO por lo que se esperaría que la ausencia de la frataxina exacerbara el efecto de la sobreproducción de ERO y la proliferación fuera menor. Finalmente, aunque se ha propuesto que la frataxina participa en la biogénesis de los grupos Fe-S, hay estudios que parecen indicar que la frataxina no es esencial para la biogénesis de los grupos Fe-S (Fox et al., 2015; Ast et al., 2019). Lo que sí es claro al respecto de la frataxina es que la ausencia de esta proteína es letal (Cosee et al., 2000; Lu et al., 2009; Poburski et al., 2016). Aunado a esto, la deficiencia de la frataxina es causa de una enfermedad autosómica recesiva conocida como ataxia de Friedreich (FDRA). La disminución de la proteína funcional se da por repeticiones de trinucleótidos guanina-adenina-adenina (GAA), en el primer intrón del gen que codifica para la frataxina (Clark et al., 2018; Campuzano et al., 1996). La disminución de la frataxina en pacientes con ataxia está relacionada con la disfunción mitocondrial, la acumulación de hierro y la acumulación de ERO (Clark et al., 2018). Dada la importancia de la proteína para la supervivencia celular y que los hallazgos acerca de su función aún son contradictorios, es necesario generar más estudios en pro de los posibles papeles de esta proteína en la célula.

<b>Tabla V: Posibles funciones de la frataxina</b>	
<b>Función</b>	<b>Referencias</b>
Formación de los grupos Fe-S	Kondapalli et al., (2008); Yoon & Cowan (2003); Tsai & Barondeau (2010).
Chaperona de hierro	Adamec et al., (2000); Cavadini et al.,(2002)
Participación en mecanismos antioxidantes	Shoichet et al., (2002); Calabrese et al., (2005); Gakh et al., (2006);
Regulador de la ferroptosis	Du et al., (2020)
Almacenamiento de hierro	Bencze et al., (2006)

La frataxina ha sido mayoritariamente estudiada en el contexto de la ataxia y dado que la disminución en su expresión de esta proteína termina influyendo en el metabolismo mitocondrial y la homeostasis del hierro, podemos pensar que la

frataxina también podría tener un papel en otras condiciones patológicas ligadas a fallas en el metabolismo mitocondrial o en la homeostasis del hierro. Por otra parte, también se ha documentado que la frataxina es un regulador clave en el proceso de ferroptosis, el cual está implicado en la carcinogénesis, enfermedades degenerativas e isquemia/reperfusión (Du et al., 2020). La frataxina, por lo tanto, es una proteína que se debe estudiar más allá del contexto de la ataxia.

### **1.10 Frataxina e Hipoxia**

Se han realizado algunos estudios con la finalidad de saber si hay relación entre la frataxina y la hipoxia. Se evaluó la expresión de frataxina en líneas celulares tumorales las cuales fueron expuestas a hipoxia. Se observó que la expresión de frataxina aumenta en respuesta al estrés hipóxico. Al silenciar la expresión de HIF-1 $\alpha$ , la expresión de frataxina disminuyó, con lo que los autores concluyen que la inducción de frataxina en respuesta a la hipoxia está regulada por HIF-1 $\alpha$  (Guccini et al., 2011).

Nanayakkara y colaboradores (2015) estudiaron la expresión de frataxina en un modelo de isquemia-reperfusión en cardiomiocitos. Al atenuar la expresión de HIF-1 $\alpha$ , la expresión de frataxina disminuyó, posteriormente los autores evaluaron la regulación transcripcional de frataxina por HIF-1 $\alpha$ , encontrando que la presencia de HIF-1 $\alpha$  activa al promotor de la frataxina, encontrando también el HRE en el promotor de frataxina. Finalmente, los autores evaluaron el posible papel cardioprotector de la frataxina, midieron la carga de hierro mitocondrial la cual aumentó en células con una baja expresión de frataxina. Sobreexpresaron la frataxina y observaron una disminución en la producción de ERO. Un estudio realizado en células retinales ganglionares expuestas a una lesión de isquemia-reperfusión muestra que la sobreexpresión de la frataxina aumenta la supervivencia celular y la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Los autores correlacionan la mayor supervivencia posterior a la isquemia-reperfusión con la sobreexpresión de la frataxina y el aumento en la expresión genética de enzimas antioxidantes (Schultz et al., 2016).

Pese a que se ha observado que la expresión de frataxina se eleva en condiciones de hipoxia, también se ha evidenciado que la disminución de oxígeno puede rescatar la pérdida de frataxina. Ast y colaboradores (2019) trabajaron con líneas celulares k562 y HEK243, así como en larvas de nemátodo. Encontraron que las células que carecían de frataxina pero crecían en condiciones de hipoxia presentaban una mayor proliferación. Por otra parte, las larvas de nematodo que carecían de la expresión de frataxina pero crecían en condiciones de hipoxia lograban completar su ciclo de vida. Aunque lo anterior resulta interesante, la explicación que brindan los autores parte de la premisa de que la hipoxia aumenta la biodisponibilidad de hierro, al haber mayor cantidad de hierro disponible no se compromete la producción de los grupos Fe-S.

### **1.11 Líneas celulares**

La línea celular DBTRG-05MG deriva de un tumor de una paciente diagnosticada con un glioblastoma multiforme (Kruze et al., 1992). Las células DBTRG-05MG al ser cancerosas, captan glucosa produciendo lactato, aun cuando el suministro de oxígeno es adecuado, esto se logra gracias al efecto Warburg (Liberti & Locasale, 2016). Además, este tipo de células tienen una mayor producción de ERO que permiten la activación de vías de señalización y factores de transcripción que promueven la tumorigénesis, así mismo, presentan una mayor cantidad de enzimas antioxidantes para evitar que las ERO dañen las células (DeBerardinis & Chandel., 2016). El microambiente tumoral es esencial para la progresión del cáncer y la quimioresistencia (Jing et al., 2019). El cáncer se suele presentar en el microambiente hipóxico, el cual es necesario para promover la angiogénesis necesaria para el crecimiento tumoral e invasión (Cheng et al., 2017). El glioblastoma es uno de los tipos de cáncer que hace uso del microambiente tumoral para la resistencia terapéutica (Da Ros et al., 2018), es por eso que el uso de esta línea celular es un buen modelo para el estudio de la hipoxia inducida de forma química.

Por su parte, la línea celular PC12 deriva de un feocromocitoma de rata, el cual es un tumor benigno, esta línea celular es ampliamente utilizada para estudios de hipoxia debido a que las células responden de manera similar a las células de los cuerpos carotídeos, las cuales son las primeras en detectar la disminución de oxígeno (Conrad et al., 2001; Wiatrak et al., 2020).

### **1.12 El estado de proliferación celular y la hipoxia**

Uno de los componentes primordiales de los medios de cultivo son los sueros, los cuales son esenciales para el metabolismo, crecimiento y para estimular la proliferación dado el efecto mitogénico que tienen (Brunner et al., 2010).

Disminuir las concentraciones de suero en los medios de cultivo influye directamente en el estado de proliferación celular, las células que se ven privadas de nutrientes disminuyen la proliferación (Pawar et al., 2021).

Dado que durante la hipoxia hay un reacomodo metabólico, resulta interesante ver si los efectos de la hipoxia sobre células quiescentes y proliferantes son similares o si la hipoxia influye de manera distinta en células en diferentes etapas del ciclo celular. De inicio, Semenza (2011) plantea que la mayoría de las células en condiciones de hipoxia inhiben la proliferación celular debido a que un aumento en el número de células incrementaría la demanda de oxígeno.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La función de la frataxina continúa en debate, pero se ha propuesto que es una proteína que participa en modular el estrés oxidativo. Estudios previos reportan que la hipoxia regula al alza la expresión de la frataxina y se especula que esta regulación en células cancerígenas sea indispensable para la supervivencia y progresión tumoral, sin embargo, aún no queda clara la función de la frataxina en condiciones de hipoxia, y tampoco es claro si el aumento de frataxina en la hipoxia es un evento común en distintas líneas celulares. El presente trabajo pretende contribuir a la comprensión de la relación entre la hipoxia y la frataxina al utilizar  $CoCl_2$  como agente mimético de hipoxia en dos líneas celulares: PC12 y DBTRG-05MG.

## 3. HIPÓTESIS

Se espera que la exposición al agente mimético aumente la expresión de frataxina. Dado que la línea celular DBTRG-05MG deriva de un glioblastoma humano, es probable que la exposición a la hipoxia aumente la expresión de frataxina en mayor proporción en comparación con la línea celular PC12.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

- Evaluar la expresión de frataxina bajo condiciones de hipoxia en las líneas celulares DBTRG-05MG y PC12

### 4.2 Particulares

- Evaluar la viabilidad celular en células PC12 y DBTRG-05MG tratadas con  $CoCl_2$  0 mM, 0.5 mM, 0.75 mM y 1.0 mM y a diferentes concentraciones de suero
- Monitorear la producción de ERO después del tratamiento con  $CoCl_2$
- Evaluar cuál de las líneas celulares presenta una mayor expresión de frataxina después del tratamiento con  $CoCl_2$

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Materiales y Reactivos

La poli-L-lisina, las placas de cultivo, el  $CoCl_2$  y el Hoechst 33258 se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) El medio DMEM, RPMI-1640, Suero Fetal Bovino (SFB), Antibiotic-antimycotic (100X) y triple express se adquirieron de GIBCO (Waltham, MA, EUA). El Suero de Caballo (SC) se adquirió de Invitrogen (Waltham, MA, EUA). El anticuerpo primario de Frataxina se adquirió de abcam # CAT 113691 (Inglaterra, Reino Unido). Las sondas MitoSOX™ y CellROX™ Green se adquirieron de ThermoFisher (Waltham, MA, EUA)

El lector de placas multimodal Synergy y Cytation 5 de Biotek Instruments (Winooski, Vermont, Estados Unidos)

### 5.2 Diseño experimental

Se trabajó con las líneas celulares PC12 y DBTRG-05MG, las cuales se trabajaron a una confluencia del 80% y se trataron con  $CoCl_2$  durante 24 h en las concentraciones 0.5 mM, 0.75 mM y 1.0 mM, se mostró previamente que a estas concentraciones se logra estabilizar a HIF- $\alpha$  (Orozco-Ibarra et al., 2016) Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular con la técnica de MTT, así como la producción de ERO. Finalmente, se midió la expresión de la frataxina con la técnica de inmunofluorescencia (Figura 5).

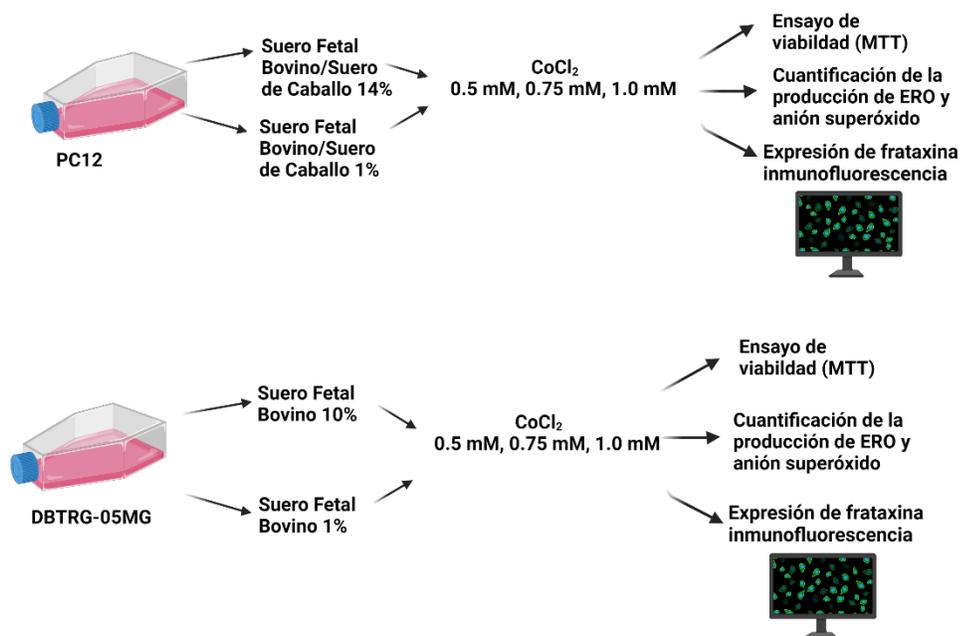


Figura 5: Diseño experimental del proyecto. Creado con BioRender.com

### 5.3 Cultivo Celular

Las células PC12 se sembraron en cajas petri de 100 mm<sup>2</sup> previamente tratadas con poli-L-lisina. Se trabajó con dos condiciones de concentración de suero por lo que el medio DMEM fue suplementado con SFB 7% más SC al 7% (células proliferantes) y DMEM con SFB y SC al 1% (células quiescentes) más antibiótico-antimycotic al 1%. Las células se incubaron a 37° en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. Las células DBTRG-05MG se sembraron en cajas petri de 100 mm<sup>2</sup>, el medio RPMI-1640 complementado con 5.95 g/l de HEPES, 0.11 g/l de piruvato de sodio, 2.5 g/l de 14 glucosa, 1.5 g/l de bicarbonato de sodio, 30 mg/l de L-Prolina, 35 mg/l de L-Cistina, 15 mg/l de Hipoxantina, 1 mg/l de ATP, 10 mg/l de Adenina, 1 mg/l de Timidina. Fue suplementado con SFB al 10% (células proliferantes) y SFB 1% (células quiescentes) más anti-anti al 1%. Se incubaron a 37° en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire.

### 5.4 Viabilidad celular

Se estimó mediante la técnica de MTT, la cual consiste en la reducción de sales de tetrazolio. Esta técnica es un indicador de la actividad metabólica que nos permite hacer una estimación indirecta de la viabilidad celular. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos. Las placas para las células PC12 fueron tratadas previamente con poli-L-lisina y se sembraron 5x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Las células DBTRG-05MG se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 4x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. El tratamiento con CoCl<sub>2</sub> se adicionó 48 h después de haber sembrado las células. Pasadas las 24 h de tratamiento con CoCl<sub>2</sub> se retiró 200 µl de medio y se adicionó 160 µl de MTT (0.5mg/ml). Las placas se incubaron durante hora y media. El formazan se solubilizó con isopropanol ácido. Se midió la absorbancia (570nm) con un lector de placas multimodal (Synergy).

### 5.5 Producción de especies reactivas de oxígeno

Se midieron utilizando las sondas MitoSOX™ Red y CellROX™ green. El MitoSOX™ Red sirve como indicador de la formación de superóxido mitocondrial, mientras que CellROX™ green sirve para la detección general de ERO. La sonda MitoSOX™ se disolvió con DMSO para generar un stock de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se diluyó en medio Ringer Krebs hasta lograr una solución de trabajo de 5 mM. Las células fueron sembradas en placas de 12 pozos a una densidad de 3.5x10<sup>4</sup> para las células PC12 y de 3x10<sup>4</sup> para las células DBTRG-05MG. Se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con solución salina, después se adicionó la sonda. Finalmente se agregó el CoCl<sub>2</sub>, y se inició la captura de imágenes con ayuda del lector de placas multimodal Cytation 5 (Biotek Instruments) 510/570 nm, la cual se realizó a las 0, 16 h y 24 h, debido a los tiempos en los cuales la sonda da señal y se satura. Después del tratamiento. La sonda CellROX™ se trabajó con una concentración 2.5 mM y se diluyó en medio Ringer Krebs, se realizaron dos lavados con solución salina y posteriormente se agregó la sonda, posterior a ello se adicionó el CoCl<sub>2</sub> 0.5 mM y 1.0 mM. Finalmente se tomó

captura de imágenes con Cytation 5 (Biotek Instruments) 485/520nm, la captura se realizó a 0, 0.5 y 1h después de la exposición al agente mimético. Para ambas sondas, se cuantificó la intensidad media de la fluorescencia y se dividió entre el número de células en el campo.

### **5.6 Inmunofluorescencia**

Las células se sembraron en placas de 12 pozos. Pasadas las 24h de tratamiento con  $CoCl_2$ . Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 min a 4°C. Posteriormente se realizó la permeabilización con tritón al 0.01% y se dejó actuar durante 10 min. El bloqueo se realizó con albumina sérica bovina al 2% en PBS por una hora. Se agregó el anticuerpo primario anti-frataxina, el cual se preparó a una dilución 1:250 y se incubó durante 24 h a 4°C, se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados con PBS. Se adicionó el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 anti-ratón a una dilución 1:250 y se dejó incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora. Se adicionó Hoechst 33258 (1 ng/ml), dilución 1:100 y se realizaron tres lavados con PBS. Se realizó el montaje con Vectashield. Finalmente, las muestras se observaron en un lector de placas multimodal con captura de imagen Cytation 5 (Biotek Instruments), las longitudes de excitación y emisión de Alexa fluor 488 495/519nm y para Hoechst 352/455nm. Se cuantificó la intensidad media de la fluorescencia y se dividió entre el número de células en el campo.

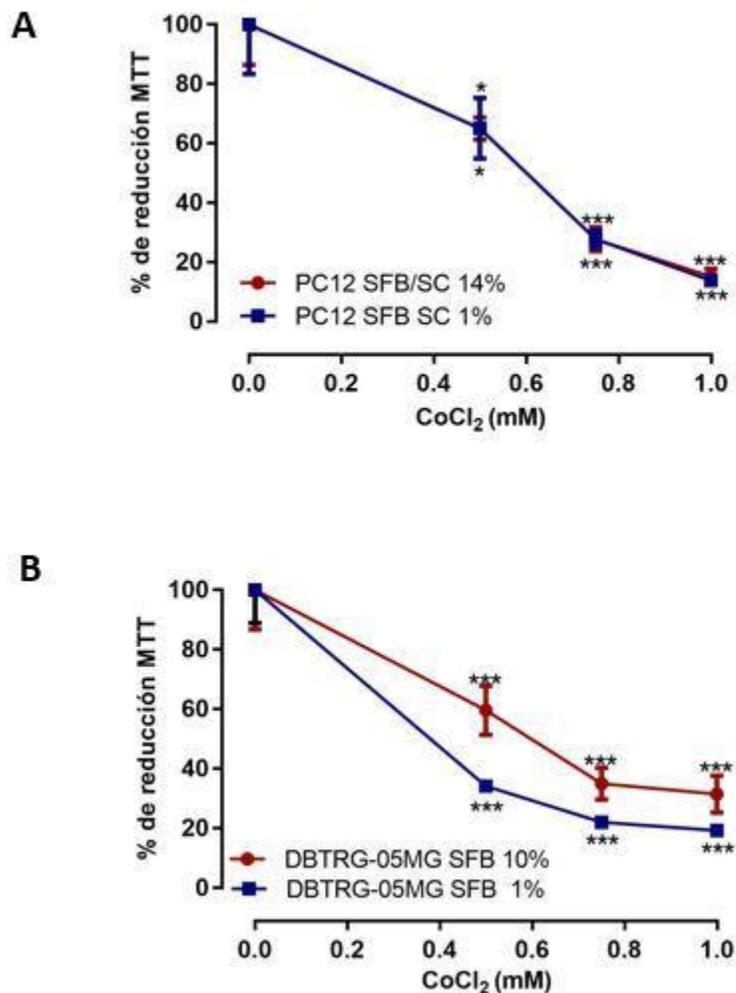
### **5.7 Análisis Estadístico**

Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar. Para el análisis estadístico se hizo uso del programa Graph Prism 5.0. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza seguida de la prueba *post-hoc* de Bonferroni \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

## 6. RESULTADOS

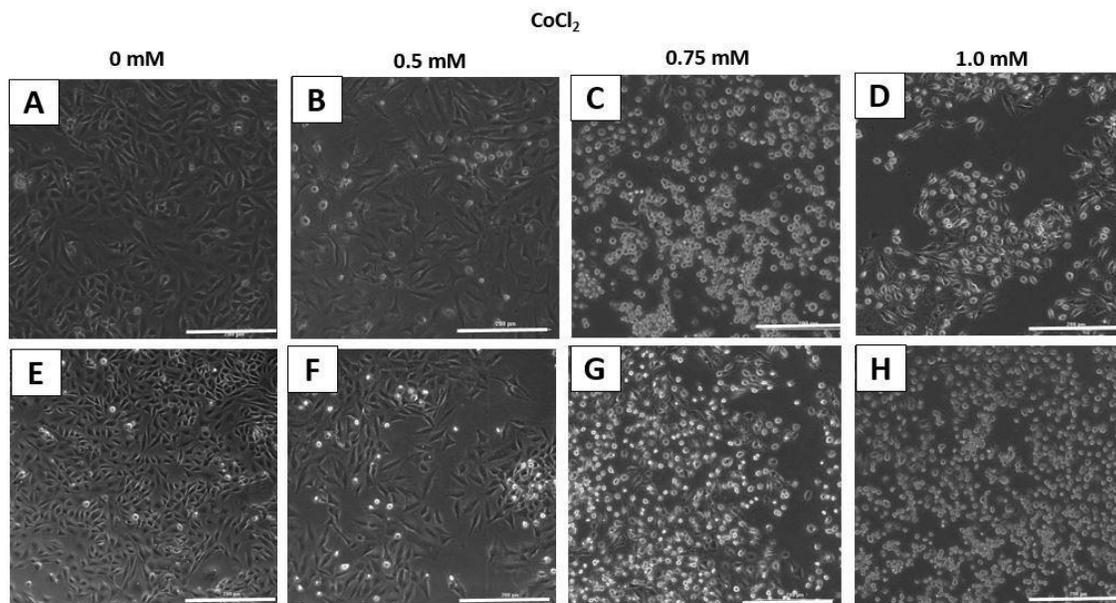
### 6.1 Prueba de viabilidad celular

Para determinar los efectos del  $CoCl_2$  sobre la viabilidad celular, se llevó a cabo la prueba colorimétrica de MTT. En la línea celular PC12 se observó la disminución de la viabilidad dependiente del aumento de la concentración del  $CoCl_2$ , la cual es significativa para las concentraciones de 0.5 mM, 0.75 mM y 1.0 mM (figura 6), lo anterior concuerda con las imágenes obtenidas en contraste de fases, donde se observan cambios en el tamaño de las células, es decir, se ven más pequeñas y adquieren una forma esférica, así mismo, hay cambios en la densidad celular posterior a la exposición del agente mimético (Figura 7 y 8).

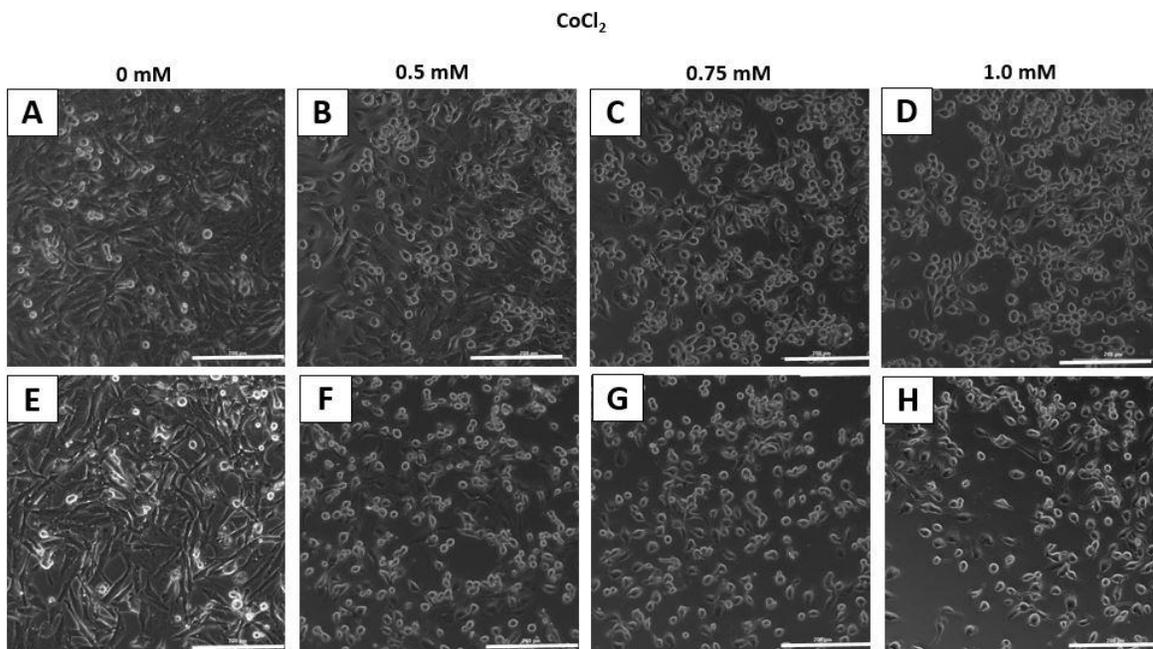


**Figura 6:** Efectos del  $CoCl_2$  a diferentes concentraciones (0.5 mM - 1.0 mM) sobre la viabilidad celular. **A)** Células PC12 en diferentes concentraciones de suero **B)** Células

DBTRG-05MG en diferentes concentraciones de suero. Media  $\pm$  ESM n=6. ANOVA de dos vías seguida de prueba de Bonferroni \*p < 0.05, \*\*\* p < 0.001



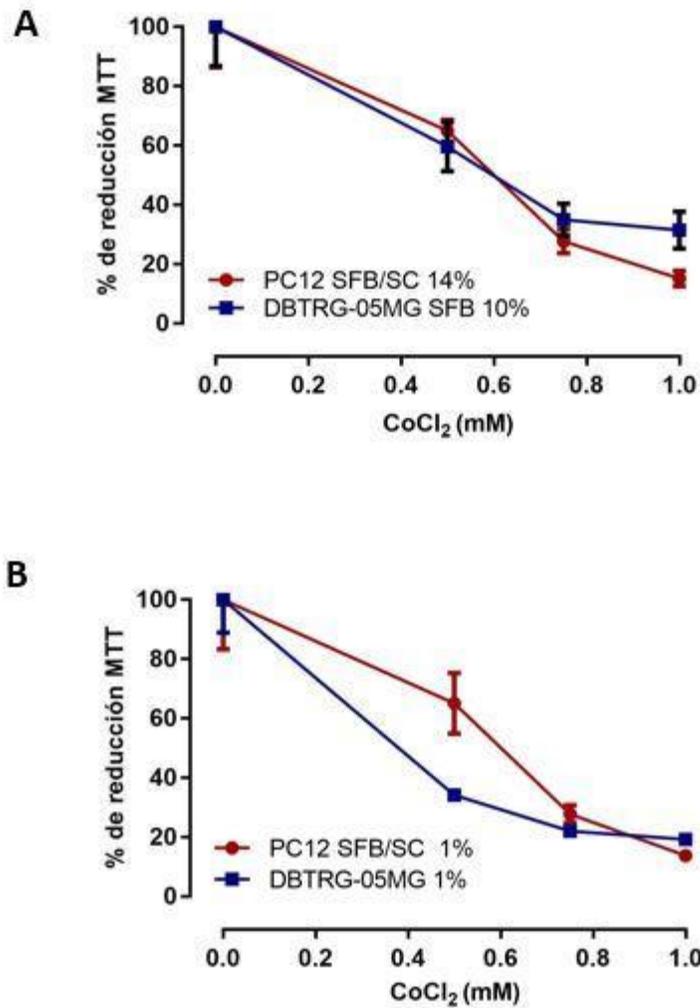
**Figura 7:** El  $\text{CoCl}_2$  tiene efectos sobre la morfología de las células PC12, las cuales se hacen más pequeñas y adquieren una forma esférica. **A-D** células PC12 con SFB/SC 14%. **E-H** células PC12 con SFB/SC. Contraste de fases, barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8:** El  $\text{CoCl}_2$  tiene efectos sobre la morfología de las células DBTRG-05MG, las cuales se hacen más pequeñas, pierden densidad celular y adquieren una forma esférica.

**A-D** células DBTRG-05MG con SFB 10%. **E-H** células DBTRG-05MG con SFB 1%. Contraste de fases, barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

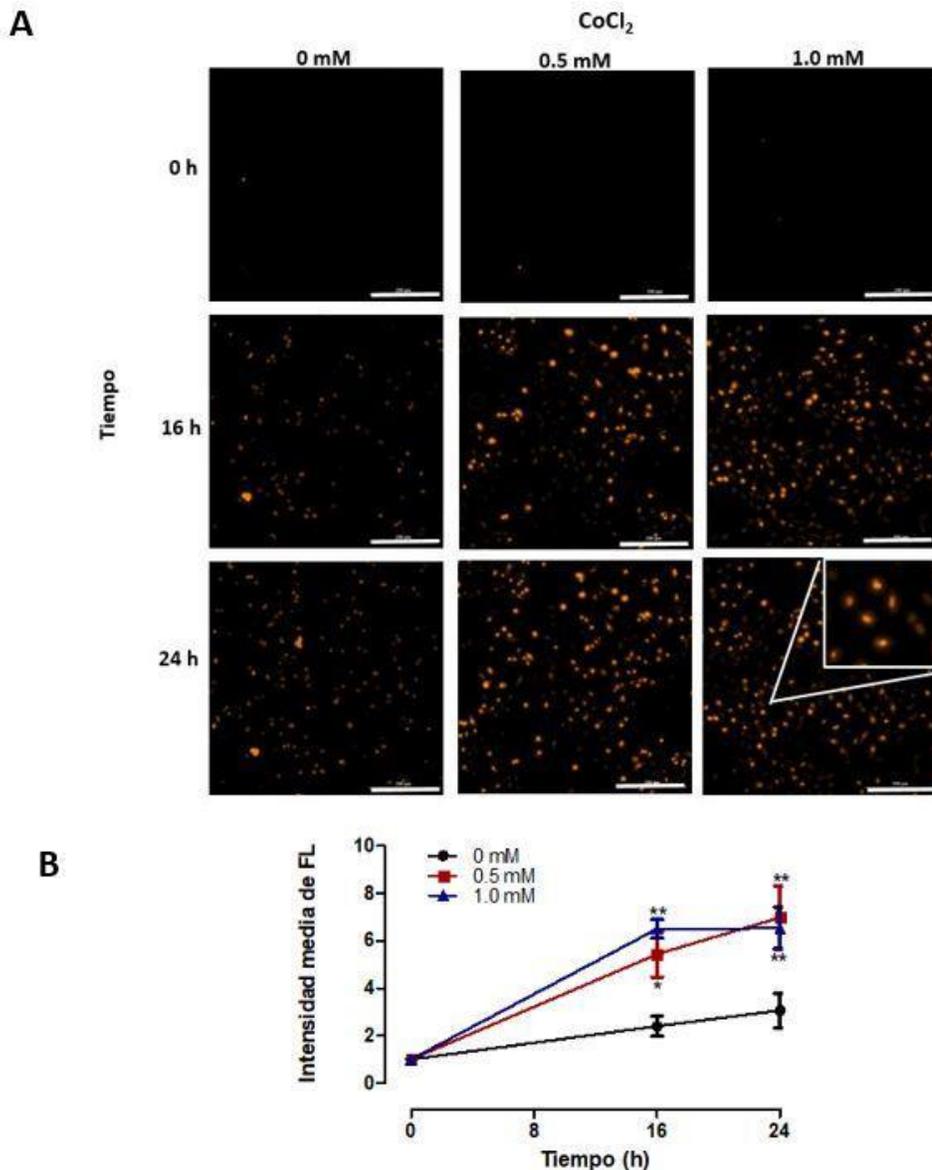
El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas en la viabilidad celular al trabajar con células proliferantes o quiescentes. Debido a esto, los siguientes experimentos se trabajaron únicamente con SFB/SC al 1% y SFB 1% y con las concentraciones de 0 mM, 0.5 mM y 1.0 mM. Así mismo, se evaluó si existían diferencias significativas en la viabilidad entre ambas líneas celulares. Los resultados de la ANOVA de dos vías indican que no hay diferencias significativas al comparar células PC12 y DBTRG-05MG en distintas concentraciones de suero (figura 9).



**Figura 9:** Comparación de los efectos del  $\text{CoCl}_2$  en las líneas celulares PC12 y DBTRG-05MG (0.5 mM-1.0 mM) sobre la viabilidad celular. **A)** Células PC12 SFB/SC 14% y Células DBTRG-05MG SFB 10% **B)** Células PC12 SFB/SC 1% vs células DBTRG-05mg SFB 1%. Media  $\pm$  ESM n=6. ANOVA de dos vías seguida de prueba de Bonferroni

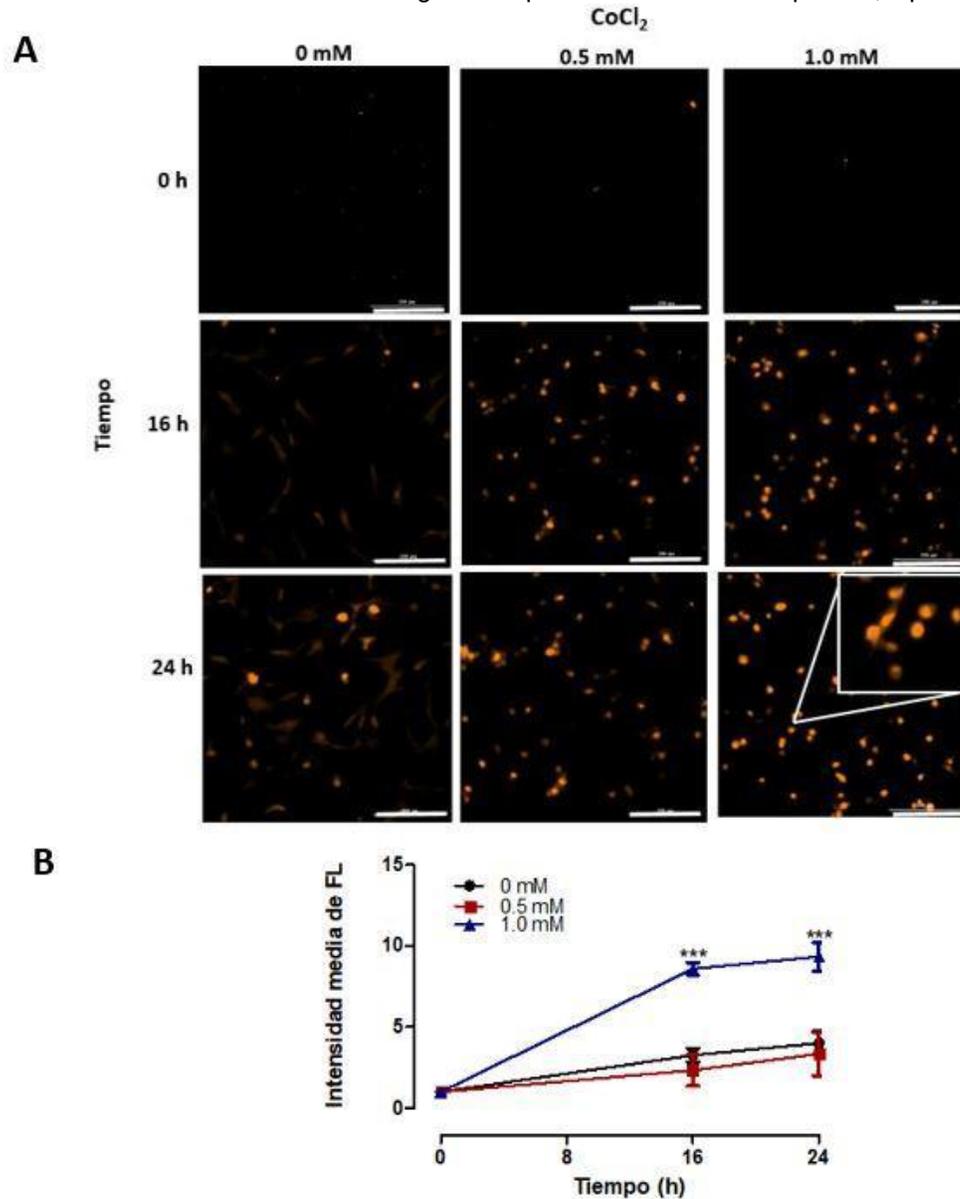
## 6.2 Producción del anión superóxido.

Para evaluar la producción ERO, en primer lugar, medimos la producción de anión superóxido en las líneas celulares PC12 y DBTRG-05MG. Los tiempos a los que se realizó el registro fueron 0 h, 16 h y 24 h. En las figuras 10-A y 11-A observamos las imágenes representativas obtenidas con microscopía de fluorescencia de la producción del anión superóxido en células PC12 y DBTRG-05MG respectivamente. Así mismo, se muestran los resultados de manera gráfica (10-B y 11-B). La producción del anión superóxido mostró un incremento significativo en ambas líneas celulares.



**Figura 10:** Generación del anión superóxido en células PC12 ante diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición a *CoCl<sub>2</sub>*. **A)** Imágenes que indican aumento en la generación del anión superóxido mitocondrial, el cual es visible por el aumento de la fluorescencia de la sonda

MitoSOX™Red. Barra de escala 200 µm. **B)** Cuantificación de la generación del anión superóxido Media ± ESM n=3. ANOVA de dos vías seguida de prueba de Bonferroni \*p<0.05, \*\*p<0.01

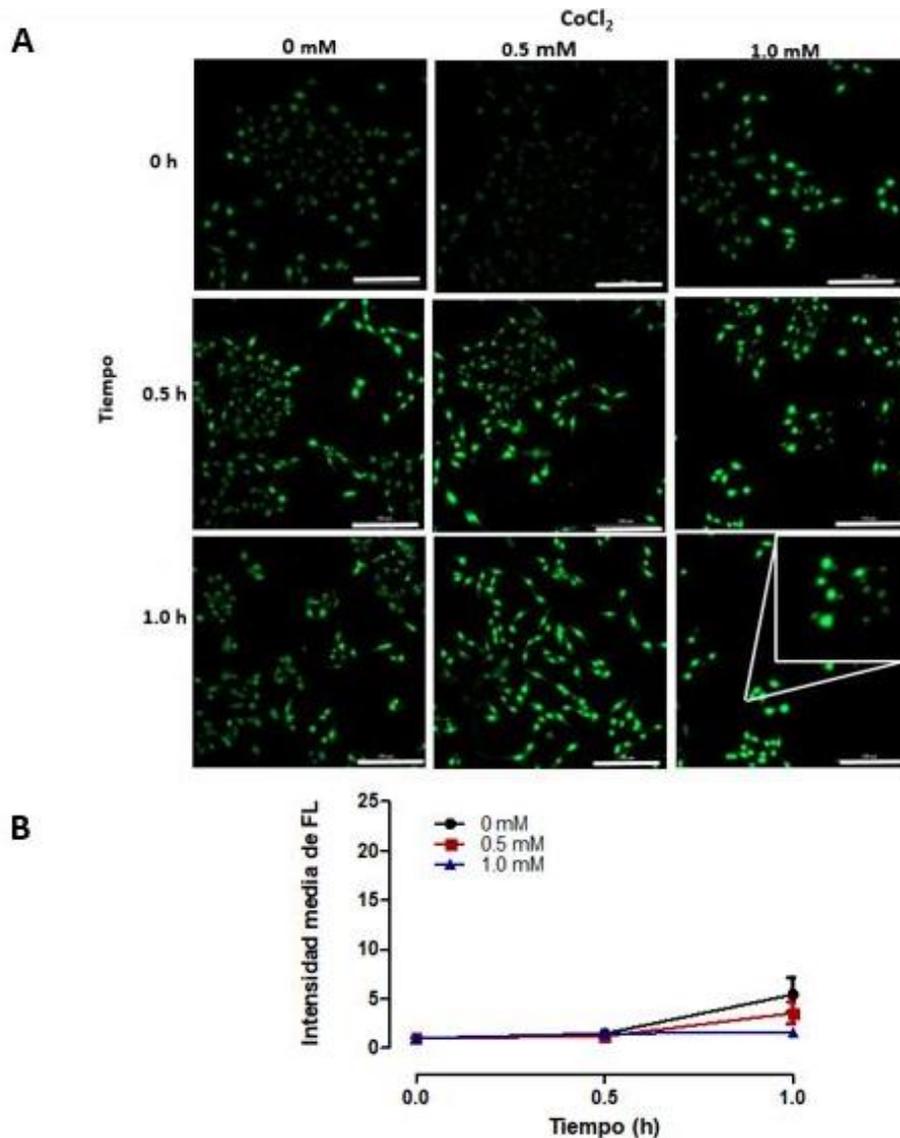


**Figura 11:** Generación del anión superóxido en células DBTRG-05MG. **A)** Imágenes que indican aumento en la generación del anión superóxido el cual es visible por el aumento de la fluorescencia de la sonda MitoSOX™Red. Barra de escala 200 µm. **B)** Cuantificación de la generación del anión superóxido Media ± ESM n=3. Anova de dos vías seguida de prueba de Bonferroni \*\*\*p<0.001

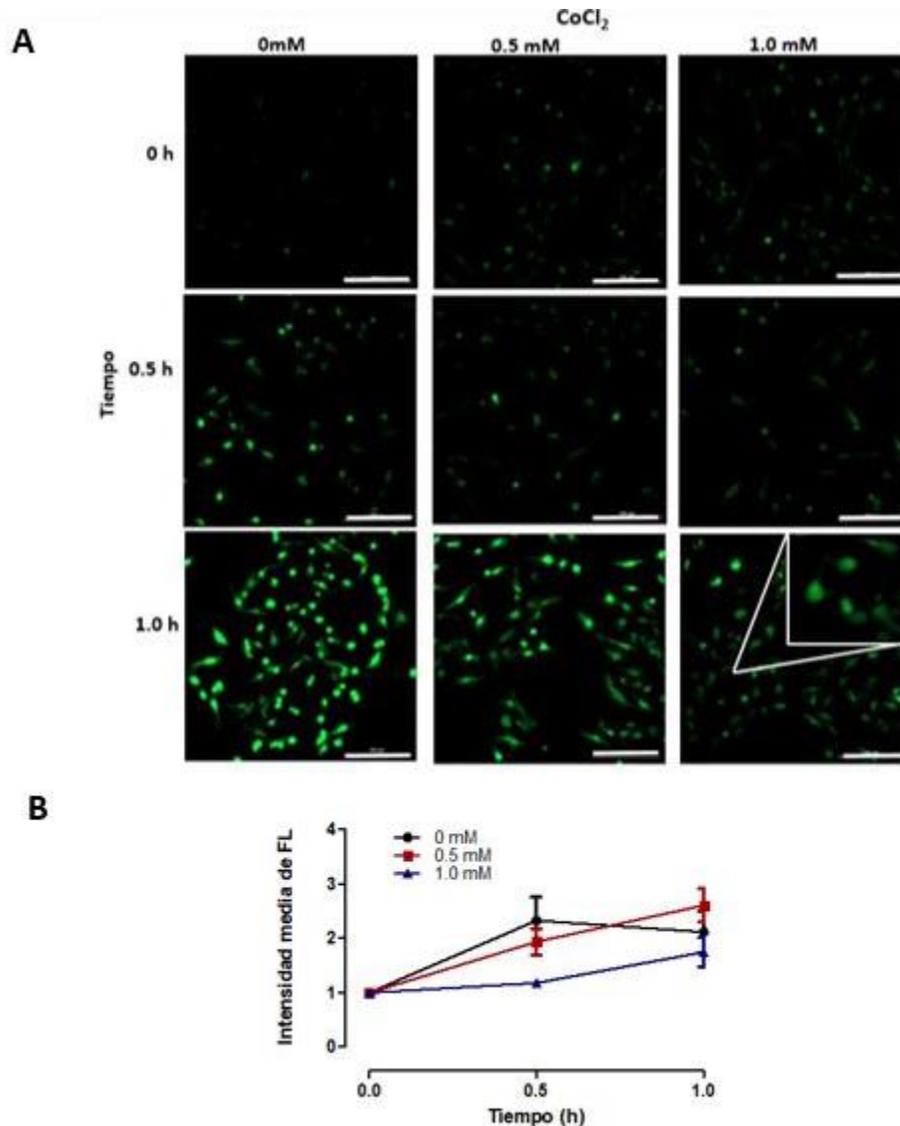
Debido a que observamos que la producción de anión superóxido se daba después de las 16 h a la exposición del agente mimético, decidimos utilizar la sonda CellROX™ green para observar si había producción de otras ERO previo a la formación del anión superóxido.

### 6.3 Producción de ERO

La producción de ERO se midió con la sonda CellROX™ green a los tiempos 0 h, 0.5 h y 1 h posterior a la exposición del  $CoCl_2$ . Podemos observar las imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia para las líneas celulares PC12 y DBTRG-05MG (Figura 12-A y 13-A), también se muestran los resultados de forma gráfica (Figura 12-B y 13-B). La producción de ERO en ambas líneas celulares no fue significativa, sin embargo, es importante recalcar que ambas líneas celulares muestran una producción basal de ERO.



**Figura 12:** Generación de ERO en células PC12. **A)** Imágenes la generación de ERO el cual es visible por el aumento de la fluorescencia, el aumento no fue significativo. Barra de escala 200  $\mu$ m. **B)** Cuantificación de la generación de ERO Media  $\pm$  ESM n=3. ANOVA dos vías seguida de prueba de Bonferroni.

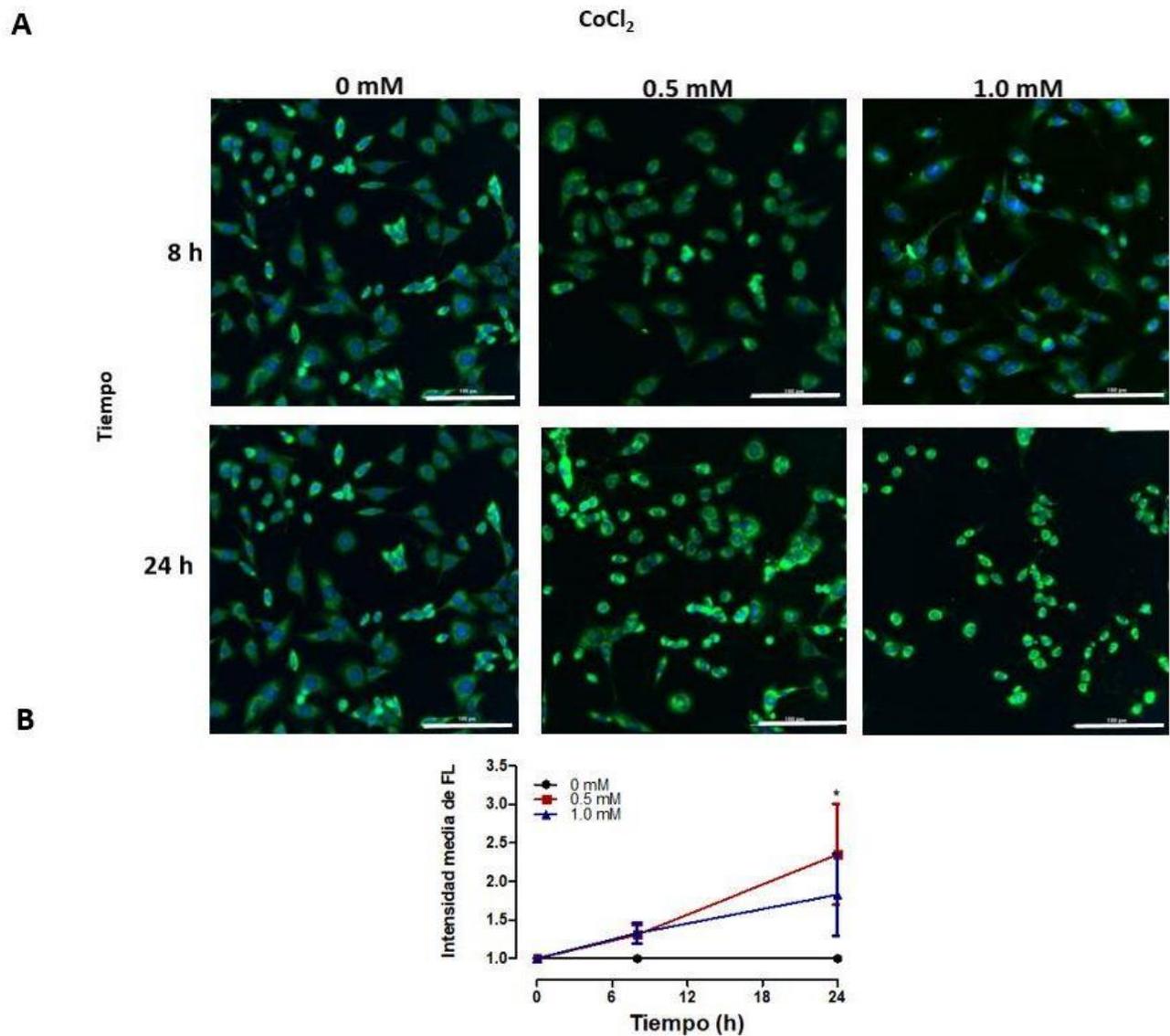


**Figura 13:** Generación de ERO en células DBTRG-05MG. **A)** Imágenes que indican aumento en la generación de ERO el cual es visible por el aumento de la fluorescencia, el aumento no fue significativo, barra de escala 200  $\mu\text{m}$  **B)** Cuantificación de la generación de ERO Media  $\pm$  ESM n=3. ANOVA dos vías seguida de prueba de Bonferroni.

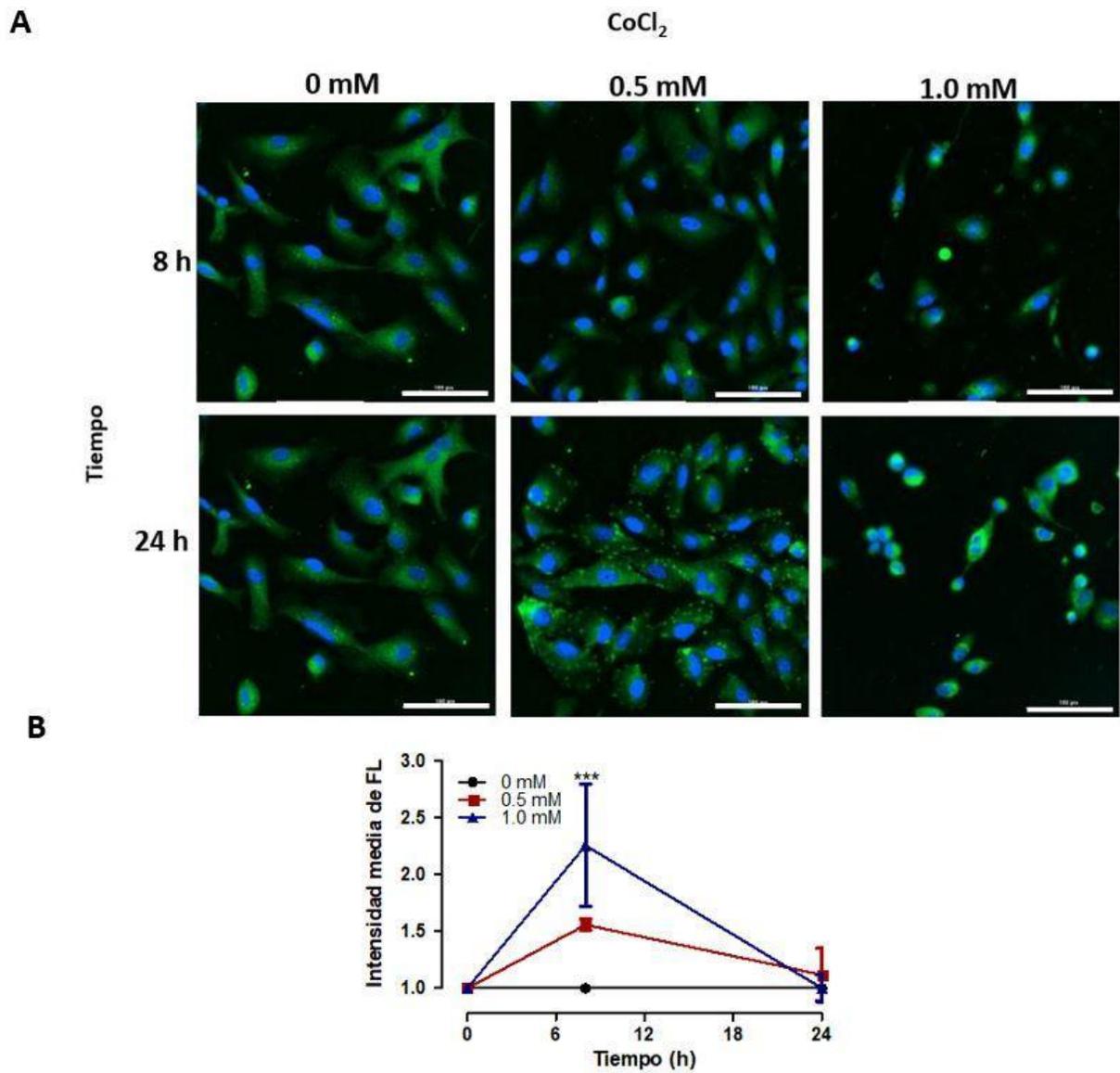
#### 6.4 Expresión de la frataxina

La exposición a la hipoxia química aumentó la expresión de la frataxina. Se muestran las imágenes representativas de fluorescencia de la proteína frataxina y con Hoechst para teñir núcleos en células PC12 y DBTRG-05MG tratadas con  $\text{CoCl}_2$ . En la figura 14-A podemos observar células PC12 con  $\text{CoCl}_2$  0.5 y 1.0 mM a 8 y 24 h, se puede observar que hay un aumento de la fluorescencia que nos indicaría una mayor expresión de la proteína, el aumento en la expresión de la frataxina fue significativo únicamente para la concentración de 0.5 mM a 24 h. El cambio de la intensidad media de la fluorescencia se cuantificó y los resultados se observan de manera gráfica en la figura 14-B. Para las células DBTRG-05MG el

aumento significativo de frataxina ocurrió a las 8 h a 1 mM y se observa una disminución en la expresión de la proteína a las 24 h.



**Figura 14:** Expresión de la frataxina en células PC12 posterior a la exposición del agente mimético. **A)** Imágenes que muestran el aumento de la fluorescencia. La Frataxina se visualiza en color verde, Hoechst en color azul. Barra de escala 100  $\mu$ m. **B)** Cuantificación de la expresión de frataxina. Media  $\pm$  ESM n=3. ANOVA de dos vías seguida de prueba de Bonferroni \*p<0.05



**Figura 15:** Expresión de la frataxina en células DBTRG-05MG posterior a la exposición del agente mimético. **A)** Imágenes que muestran el aumento de la fluorescencia. Frataxina se visualiza en color verde, Hoechst color azul. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$ . **B)** Cuantificación de la expresión de frataxina. Media  $\pm$  ESM n=3. ANOVA de dos vías seguida de prueba de Bonferroni \*\*\*p<0.001

## 7. DISCUSIÓN

En este estudio evaluamos la expresión de la frataxina en dos líneas celulares distintas después de ser expuestas a hipoxia química. Las líneas celulares expuestas a  $CoCl_2$  presentaron disminución en la viabilidad celular así como cambios en la morfología. Estudios previos reportan que posterior a la exposición al  $CoCl_2$  las células experimentan apoptosis (He et al., 2018; Lee et al., 2013). Se ha reportado que el  $CoCl_2$  induce apoptosis y autofagia en la línea celular DBTRG-05MG (Cheng et al., 2017), para el caso de las células PC12 algunos estudios indican que la muerte celular posterior al uso del agente mimético, también, se da mediante apoptosis (Orozco-Ibarra et al., 2016; Jung et al., 2004). Lo anterior concuerda con lo observado en el presente estudio puesto que en ambas líneas celulares disminuyó la viabilidad celular posterior a la exposición al agente mimético, aunque no evaluamos un marcador de apoptosis, si observamos cambios en la morfología celular que son característicos de este proceso, como son la fragmentación nuclear y la reducción del volumen celular (Atale et al., 2014). Era importante evaluar si el efecto del agente mimético sobre la viabilidad celular era mayor o menor dependiendo el estado de proliferación celular, es por ello que se trabajó con células que se encontraban en estado quiescente, es decir, aquellas que crecieron con una concentración reducida de suero. Sin embargo, al comparar la viabilidad celular en estado proliferativo o quiescente no se mostraron diferencias significativas, lo anterior se podría explicar porque se ha visto que la hipoxia a través del arresto del ciclo celular y de la disminución de la actividad metabólica influye en la capacidad proliferativa de las células, por lo que el uso de medios con menores concentraciones de suero no influye de manera indistinta en el estado de proliferación de las células, y por lo tanto el efecto sobre la viabilidad celular es similar. De igual manera inhibe la proliferación celular, tanto en células cancerosas como en células no cancerosas (Biswas et al., 2010; Gordan et al., 2008).

Es paradójico pensar que en condiciones de hipoxia se generen especies reactivas de oxígeno, sin embargo, previamente se ha reportado que el  $CoCl_2$  induce un aumento en la producción de ERO (Lan et al., 2012; Orozco-Ibarra et al., 2016). El aumento de las ERO puede estar implicado en la propia respuesta adaptativa ante la hipoxia debido a que el aumento de ERO aumenta la estabilización de HIF (Chandel et al., 2000; Guzy et al., 2005). En el presente trabajo, no observamos un aumento significativo en la producción de ERO, lo que observamos es que ambas líneas celulares evaluadas exhiben una producción basal de ERO. Lo anterior es importante ya que se ha reportado que células cancerosas, como es el caso de la línea DBTRG-05MG, suelen tener una sobreproducción de ERO para promover la proliferación, migración y supervivencia celular (Reczek & Chandel., 2018), por lo que no es sorpresivo observar la producción basal de ERO. Para el caso de la línea celular PC12 no se ha reportado hasta el momento que en condiciones basales presente una gran cantidad de ERO.

El anión superóxido se forma mayoritariamente en el complejo III de la mitocondria (Turrens., 2003), tanto el complejo III como el complejo I son necesarios para la producción de ERO y la adaptación a la hipoxia (Hernansanz-Agustin et al., 2020). Observamos que el anión superóxido producido en la mitocondria aumenta de manera significativa en células PC12 y DBTRG-MG, lo cual concuerda con datos reportados anteriormente, donde se observa un aumento del superóxido mitocondrial en condiciones de hipoxia (Yu et al., 2019; Quintero et al., 2006). Evaluar la expresión de la frataxina en condiciones de hipoxia resulta interesante debido a que el hierro se debe regular para evitar exacerbar la producción de ERO ante la hipoxia. El aumento de frataxina se dio en ambas líneas celulares después de que fueron expuestas al agente mimético. Aunque esperábamos ver una mayor expresión de frataxina en células cancerosas, parece ser que el papel biológico de la frataxina y su aumento dependen de las características de cada célula. En este estudio se mostró un incremento en la expresión de la frataxina en la línea celular cancerosa durante las primeras horas de la exposición al agente mimético, mientras que en la línea celular no cancerosa el aumento significativo se da 24 h después de la exposición al agente mimético, lo anterior es un indicio de que el papel biológico de la frataxina depende del tipo del tipo celular.

La línea celular PC12 mostró un aumento significativo a las 24 h, lo curioso es que para este momento y debido a la exposición al agente mimético, la mayoría de las células ya no son viables, por lo que podemos cuestionarnos a qué se debe el aumento de la proteína cuando las células en su mayoría ya están muertas, la respuesta la podemos encontrar en p53, como mencionamos anteriormente el  $CoCl_2$  induce apoptosis y se ha demostrado que esto es dependiente de p53 (Lee et al., 2013), este es un factor de transcripción que participa en procesos de detención del ciclo celular y apoptosis. En células de mamíferos, p53 induce una gran cantidad de genes involucrados en la ejecución de apoptosis, lo cual involucra a proteínas proapoptóticas (Chen., 2016). Shimizu y colaboradores (2014) demostraron que la expresión de frataxina depende de p53, es decir, p53 regula de manera directa la transcripción del gen FXN por lo que es posible que la regulación a la alza en las células PC12 se deba a la interacción p53-FXN. Las células PC12 derivan de un feocromocitoma de rata y no es raro observar un aumento en expresión de la frataxina puesto que se conoce que la proteína está conservada evolutivamente tanto en procariontes como en eucariontes (Poburski et al., 2016). Así mismo, se sabe que HIF-2 $\alpha$  regula positivamente la expresión de la frataxina y se ha evidenciado que la frataxina murina posee un elemento sensible a hipoxia (Oktay et al., 2007). Las células cancerosas tienen dependencia glucolítica y ante la hipoxia se presenta una disminución en el metabolismo mitocondrial, la regulación positiva de la frataxina podría ser parte de un mecanismo clave que nos permita entender esta paradoja. Es posible que la expresión de la frataxina sea crucial como parte de un mecanismo de defensa para estas células o para la supervivencia de las mismas. Previamente se ha observado en líneas celulares de glioblastoma incubadas en hipoxia, la expresión de frataxina aumentó de forma dependiente de HIF-1 $\alpha$ . La expresión al alza de la frataxina en hipoxia podría ser parte de un mecanismo que

permita la supervivencia de las células cancerígenas al regular la respuesta antioxidante (Guccini et al., 2011). Se ha reportado que el aumento en la expresión de la frataxina incrementa niveles de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPX1), SOD 1 y 2 (Schultz et al., 2018). Kirches y colaboradores (2011) observaron cantidades reducidas de frataxina en distintas líneas derivadas de gliomas, sin embargo, al crecer las células en condiciones de hipoxia aquellas que sobreexpresaban frataxina tuvieron mejoras en la supervivencia lo cual también le da soporte a la premisa acerca de la importancia de la frataxina en la progresión de células cancerosas. En contraparte, se ha reportado que la sobreexpresión de la frataxina en células de cáncer de colon promueve mejoras en el metabolismo oxidativo y tasas de crecimiento reducidas (Schulz et al., 2006). Por lo anterior, podemos pensar en un posible papel dual de esta proteína en células cancerígenas el cual es dependiente de la disponibilidad de oxígeno: La frataxina puede ayudar a la progresión del tumor bajo condiciones de hipoxia, sin embargo, en condiciones de normoxia la sobreexpresión de la proteína puede disminuir el crecimiento de las células cancerígenas al activar el metabolismo oxidativo. Es posible que el aumento en la expresión de la frataxina se dé también como parte de la respuesta adaptativa ante la hipoxia puesto que la frataxina podría ayudar a mejorar la bioenergética mitocondrial al surtir a las proteínas correspondientes los grupos Fe-S, los cuales tienen funciones reguladoras y participan activamente en el metabolismo. Los grupos Fe-S forman parte de la metaloenzima aconitasa, la cual es la enzima encargada de la isomerización del citrato en el TCA. En la cadena de transporte de electrones, los grupos Fe-S aceptan y transfieren electrones (Read et al., 2021). No dejamos atrás el hecho de que para ambas líneas celulares el aumento en la expresión de la frataxina se diera en pro de respuesta adaptativa ante el aumento del anión superóxido. Aunque no está del todo claro cuál es el papel de la frataxina como parte de la defensa antioxidante, se ha reportado que la frataxina está estrechamente relacionada con Nrf2, factor de transcripción que regula la respuesta antioxidante (Sahdeo et al., 2014). Un estudio demostró que en ratones hemicigóticos, es decir, con deficiencia en la expresión de frataxina, la expresión del factor de transcripción Nrf2 también se veía afectada, así como la transcripción de genes diana de Nrf2 como SOD1 y 2 (Shan et al., 2013), por otra parte, un estudio hecho con motoneuronas deficientes de frataxina, exhibían una activación defectuosa Nrf2, lo cual aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo (D'Orta et al 2013). Aun cuando hemos visto que el aumento de la proteína se dio en ambas líneas celulares, aun quedan algunos puntos por explorar. Por lo tanto, todavía queda por definirse la función de la frataxina en condiciones de hipoxia así como los mecanismos que subyacen al aumento de la expresión de frataxina.

## 8. CONCLUSIÓN

La exposición al agente mimético disminuyó la viabilidad celular en ambas líneas celulares, trabajar con suero a distintas concentraciones no cambió el efecto del agente mimético en la viabilidad celular. La exposición al agente mimético aumentó la producción significativa del anión superóxido en las líneas celulares PC12 y DBTRG-MG. La producción basal de ERO se dio en ambas líneas celulares.

La expresión de frataxina aumentó en ambas líneas celulares después de la exposición a la hipoxia química. Este aumento se dio a distintos tiempos, lo cual es un indicio de que el papel de la proteína depende del tipo celular. Sin dejar de lado el posible papel protector de la frataxina ante el aumento del anión superóxido. Los resultados son un buen acercamiento para entender de mejor manera la relación entre el eje frataxina-hipoxia, el cual se comporta de manera similar en células con características distintas.

## 9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el estado del ciclo celular.
- Medir la expresión de proteínas involucradas en la apoptosis, como p53, así como proteínas que regulan las cascadas de señalización, como las caspasas.
- Medir la expresión de enzimas antioxidantes, de manera particular superóxido dismutasa 1 y 2.
- Medir la expresión del factor de transcripción Nrf2 posterior a la exposición a la hipoxia
- Ampliar los tiempos en los que se mide la expresión de la frataxina
- Determinar por otros métodos la presencia de la proteína (inmunoblot)

## 10. REFERENCIAS

- Abruzzo, P. M., Marini, M., Bolotta, A., Malisardi, G., Manfredini, S., Ghezzi, A., Pini, A., Tasco, G., & Casadio, R. (2013). Frataxin mRNA isoforms in FRDA patients and normal subjects: effect of tocotrienol supplementation. *BioMed research international*, 2013, 276808. <https://doi.org/10.1155/2013/276808>
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W. G., Naylor, S., Benson, L. M., Gacy, A. M., & Isaya, G. (2000). Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *American journal of human genetics*, 67(3), 549–562. <https://doi.org/10.1086/303056>.
- Agrò, M., & Díaz-Nido, J. (2020). Effect of Mitochondrial and Cytosolic FXN Isoform Expression on Mitochondrial Dynamics and Metabolism. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8251. <https://doi.org/10.3390/ijms21218251>.
- Ast, T., Meisel, J. D., Patra, S., Wang, H., Grange, R., Kim, S. H., Calvo, S. E., Orefice, L. L., Nagashima, F., Ichinose, F., Zapol, W. M., Ruvkun, G., Barondeau, D. P., & Mootha, V. K. (2019). Hypoxia Rescues Frataxin Loss by Restoring Iron Sulfur Cluster Biogenesis. *Cell*, 177(6), 1507–1521.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.045>.
- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C., & Rani, V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of microscopy*, 255(1), 7–19. <https://doi.org/10.1111/jmi.12133>
- Belbellaa, B., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Monassier, L., & Puccio, H. (2020). High Levels of Frataxin Overexpression Lead to Mitochondrial and Cardiac Toxicity in Mouse Models. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 19, 120–138. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.08.018>
- Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Moraes, C. T., Murphy, M. P., Budinger, G. R., & Chandel, N. S. (2007). The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *The Journal of cell biology*, 177(6), 1029–1036. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609074>.
- Bencze, K. Z., Kondapalli, K. C., Cook, J. D., McMahon, S., Millán-Pacheco, C., Pastor, N., & Stemmler, T. L. (2006). The structure and function of frataxin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 41(5), 269–291. <https://doi.org/10.1080/10409230600846058>.
- Biswas, S., Roy, S., Banerjee, J., Hussain, S. R., Khanna, S., Meenakshisundaram, G., Kuppusamy, P., Friedman, A., & Sen, C. K. (2010). Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 6976–6981. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001653107>
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*, 27(1), 53–62. <https://doi.org/10.14573/altex.2010.1.53>
- Calabrese, V., Lodi, R., Tonon, C., D'Agata, V., Sapienza, M., Scapagnini, G., Mangiameli, A., Pennisi, G., Stella, A. M., & Butterfield, D. A. (2005). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *Journal of the neurological sciences*, 233(1-2), 145–162. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.03.012>
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., ... Pandolfo, M. (1996).

Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* (New York, N.Y.), 271(5254), 1423–1427. <https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423>.

Cavadini, P., O'Neill, H. A., Benada, O., & Isaya, G. (2002). Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Human molecular genetics*, 11(3), 217–227. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.3.217>

Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., & Schumacker, P. T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *The Journal of biological chemistry*, 275(33), 25130–25138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200>

Chen J. (2016). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(3), a026104. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>

Cheng, B. C., Chen, J. T., Yang, S. T., Chio, C. C., Liu, S. H., & Chen, R. M. (2017). Cobalt chloride treatment induces autophagic apoptosis in human glioma cells via a p53-dependent pathway. *International journal of oncology*, 50(3), 964–974. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3861>

Chen, Y., & Gaber, T. (2021). Hypoxia/HIF Modulates Immune Responses. *Biomedicines*, 9(3), 260. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030260>

Clark, E., Johnson, J., Dong, Y. N., Mercado-Ayon, E., Warren, N., Zhai, M., McMillan, E., Salovin, A., Lin, H., & Lynch, D. R. (2018). Role of frataxin protein deficiency and metabolic dysfunction in Friedreich ataxia, an autosomal recessive mitochondrial disease. *Neuronal signaling*, 2(4), NS20180060. <https://doi.org/10.1042/NS20180060>

Conrad, P. W., Conforti, L., Kobayashi, S., Beitner-Johnson, D., Rust, R. T., Yuan, Y., Kim, H. W., Kim, R. H., Seta, K., & Millhorn, D. E. (2001). The molecular basis of O<sub>2</sub>-sensing and hypoxia tolerance in pheochromocytoma cells. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 128(2), 187–204. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(00\)00326-2](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(00)00326-2)

Correia, S. C., & Moreira, P. I. (2010). Hypoxia-inducible factor 1: a new hope to counteract neurodegeneration?. *Journal of neurochemistry*, 112(1), 1–12.

Cossée, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dollé, P., & Koenig, M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Human molecular genetics*, 9(8), 1219–1226. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.8.1219>

Da Ros, M., De Gregorio, V., Iorio, A. L., Giunti, L., Guidi, M., de Martino, M., Genitori, L., & Sardi, I. (2018). Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 2879. <https://doi.org/10.3390/ijms19102879>

DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*, 2(5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200> .

D'Oria, V., Petrini, S., Travaglini, L., Priori, C., Piermarini, E., Petrillo, S., Carletti, B., Bertini, E., & Piemonte, F. (2013). Frataxin deficiency leads to reduced expression and impaired translocation of NF-E2-related factor (Nrf2) in cultured motor neurons. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7853–7865. <https://doi.org/10.3390/ijms14047853>

- Du, J., Zhou, Y., Li, Y., Xia, J., Chen, Y., Chen, S., Wang, X., Sun, W., Wang, T., Ren, X., Wang, X., An, Y., Lu, K., Hu, W., Huang, S., Li, J., Tong, X., & Wang, Y. (2020). Identification of Frataxin as a regulator of ferroptosis. *Redox biology*, 32, 101483. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101483>
- Fox, N. G., Chakrabarti, M., McCormick, S. P., Lindahl, P. A., & Barondeau, D. P. (2015). The Human Iron-Sulfur Assembly Complex Catalyzes the Synthesis of [2Fe-2S] Clusters on ISCU2 That Can Be Transferred to Acceptor Molecules. *Biochemistry*, 54(25), 3871–3879. <https://doi.org/10.1021/bi5014485>
- Fuhrmann, D. C., & Brüne, B. (2017). Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox biology*, 12, 208–215.
- Gakh, O., Park, S., Liu, G., Macomber, L., Imlay, J. A., Ferreira, G. C., & Isaya, G. (2006). Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Human molecular genetics*, 15(3), 467–479. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi461>
- Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y. M., Chan, D. A., Giaccia, A. J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M., & Mechta-Grigoriou, F. (2004). JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*, 118(6), 781–794.
- Gordan, J. D., Lal, P., Dondeti, V. R., Letrero, R., Parekh, K. N., Oquendo, C. E., Greenberg, R. A., Flaherty, K. T., Rathmell, W. K., Keith, B., Simon, M. C., & Nathanson, K. L. (2008). HIF- $\alpha$  effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer cell*, 14(6), 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.016>
- Goyal, P., Weissmann, N., Grimminger, F., Hegel, C., Bader, L., Rose, F., Fink, L., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Schmidt, H. H., Seeger, W., & Hänze, J. (2004). Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine*, 36(10), 1279–1288. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.071>
- Guccini, I., Serio, D., Condò, I., Rufini, A., Tomassini, B., Mangiola, A., Maira, G., Anile, C., Fina, D., Pallone, F., Mongiardi, M. P., Levi, A., Ventura, N., Testi, R., & Malisan, F. (2011). Frataxin participates to the hypoxia-induced response in tumors. *Cell death & disease*, 2(2), e123. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.5>
- Guo, L., Wang, Q., Weng, L., Hauser, L. A., Strawser, C. J., Mesaros, C., Lynch, D. R., & Blair, I. A. (2018). Characterization of a new N-terminally acetylated extra-mitochondrial isoform of frataxin in human erythrocytes. *Scientific reports*, 8(1), 17043. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35346-y>
- Guzy, R. D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K. D., Simon, M. C., Hammerling, U., & Schumacker, P. T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell metabolism*, 1(6), 401–408.
- Hernansanz-Agustín, P., Choya-Foces, C., Carregal-Romero, S., Ramos, E., Oliva, T., Villa-Piña, T., Moreno, L., Izquierdo-Álvarez, A., Cabrera-García, J. D., Cortés, A., Lechuga-Vieco, A. V., Jadiya, P., Navarro, E., Parada, E., Palomino-Antolín, A., Tello, D., Acín-Pérez, R., Rodríguez-Aguilera, J. C., Navas, P., Cogolludo, Á., ... Martínez-Ruiz, A. (2020). Na<sup>+</sup> controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain. *Nature*, 586(7828), 287–291. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2551-y>
- Hielscher, A., & Gerecht, S. (2015). Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships. *Free radical biology & medicine*, 79, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.01>

- He, Y., Gan, X., Zhang, L., Liu, B., Zhu, Z., Li, T., Zhu, J., Chen, J., & Yu, H. (2018). CoCl<sub>2</sub> induces apoptosis via a ROS-dependent pathway and Drp1-mediated mitochondria fission in periodontal ligament stem cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 315(3), C389–C397. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2017>
- Jing, X., Yang, F., Shao, C., Wei, K., Xie, M., Shen, H., & Shu, Y. (2019). Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular cancer*, 18(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1089-9>
- Jung, J. Y., & Kim, W. J. (2004). Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis of rat PC12 cells. *Neuroscience letters*, 371(2-3), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.06.069>
- Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. (2011). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews. Cancer*, 12(1), 9–22.
- Kirches, E., Andrae, N., Hoefler, A., Kehler, B., Zarse, K., Leverkus, M., Keilhoff, G., Schonfeld, P., Schneider, T., Wilisch-Neumann, A., & Mawrin, C. (2011). Dual role of the mitochondrial protein frataxin in astrocytic tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 91(12), 1766–1776. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.130>
- Kondapalli, K. C., Kok, N. M., Dancis, A., & Stemmler, T. L. (2008). Drosophila frataxin: an iron chaperone during cellular Fe-S cluster bioassembly. *Biochemistry*, 47(26), 6917–6927. <https://doi.org/10.1021/bi800366d>
- Kruse, C.A., Mitchell, D.H., Kleinschmidt-DeMasters, B.K. et al. Characterization of a continuous human glioma cell line DBTRG-05MG: growth kinetics, karyotype, receptor expression, and tumor suppressor gene analyses. *In Vitro Cell Dev Biol - Animal* 28, 609–614 (1992). <https://doi.org/10.1007/BF02631035>.
- Lan, A. P., Xiao, L. C., Yang, Z. L., Yang, C. T., Wang, X. Y., Chen, P. X., Gu, M. F., & Feng, J. Q. (2012). Interaction between ROS and p38MAPK contributes to chemical hypoxia-induced injuries in PC12 cells. *Molecular medicine reports*, 5(1), 250–255. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.623> .
- Lee, H. R., Leslie, F., & Azarin, S. M. (2018). A facile in vitro platform to study cancer cell dormancy under hypoxic microenvironments using CoCl<sub>2</sub>. *Journal of biological engineering*, 12, 12.
- Lee, J. H., Choi, S. H., Baek, M. W., Kim, M. H., Kim, H. J., Kim, S. H., Oh, S. J., Park, H. J., Kim, W. J., & Jung, J. Y. (2013). CoCl<sub>2</sub> induces apoptosis through the mitochondria- and death receptor-mediated pathway in the mouse embryonic stem cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 379(1-2), 133–140. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1635-5>
- Lee, M., Kang, H., & Jang, S. W. (2013). CoCl<sub>2</sub> induces PC12 cells apoptosis through p53 stability and regulating UNC5B. *Brain research bulletin*, 96, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.04.007>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001> .
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Heidenreich, T., Mascarenhas, J., Netz, D. J., Paul, V. D., Pierik, A. J., Richter, N., Stümpfig, M., Srinivasan, V., Stehling, O., & Mühlenhoff, U. (2015). The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *European journal of cell biology*, 94(7-9), 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.05.002>

Lu, C., Schoenfeld, R., Shan, Y., Tsai, H. J., Hammock, B., & Cortopassi, G. (2009). Frataxin deficiency induces Schwann cell inflammation and death. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(11), 1052–1061. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.07.011>

Martelli, A., Schmucker, S., Reutenauer, L., Mathieu, J. R. R., Peyssonnaud, C., Karim, Z., Puy, H., Galy, B., Hentze, M. W., & Puccio, H. (2015). Iron regulatory protein 1 sustains mitochondrial iron loading and function in frataxin deficiency. *Cell metabolism*, 21(2), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.010>

Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature communications*, 11(1), 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>

McKeown S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *The British journal of radiology*, 87(1035), 20130676. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130676> .

Michiels C. (2004). Physiological and pathological responses to hypoxia. *The American journal of pathology*, 164(6), 1875–1882. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63747-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63747-9)

Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol*. 2019 Apr;39(4):556-570. doi: 10.1002/jat.3749. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30484873.

Nanayakkara, G., Alasmari, A., Mouli, S., Eldoumani, H., Quindry, J., McGinnis, G., Fu, X., Berlin, A., Peters, B., Zhong, J., & Amin, R. (2015). Cardioprotective HIF-1 $\alpha$ -frataxin signaling against ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 309(5), H867–H879.

Oktay, Y., Dioum, E., Matsuzaki, S., Ding, K., Yan, L. J., Haller, R. G., Szweda, L. I., & Garcia, J. A. (2007). Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates expression of the mitochondrial aconitase chaperone protein frataxin. *The Journal of biological chemistry*, 282(16), 11750–11756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611133200> .

Orozco-Ibarra, M., Muñoz-Sánchez, J., Zavala-Medina, M. E., Pineda, B., Magaña-Maldonado, R., Vázquez-Contreras, E., Maldonado, P. D., Pedraza-Chaverri, J., & Cháñez-Cárdenas, M. E. (2016). Aged garlic extract and S-allylcysteine prevent apoptotic cell death in a chemical hypoxia model. *Biological research*, 49, 7.

<https://doi.org/10.1186/s40659-016-0067-6>

Pawar, M., Pawar, V., Renugalakshmi, A., Albrakati, A., Uthman, U. S., Dewan, H., Mugri, M., Sayed, M., Bhandi, S., Patil, V. R., Reda, R., Testarelli, L., & Patil, S. (2021). Glucose and Serum Deprivation Led to Altered Proliferation, Differentiation Potential and AMPK Activation in Stem Cells from Human Deciduous Tooth. *Journal of personalized medicine*, 12(1), 18. <https://doi.org/10.3390/jpm12010018>

Poburski, D., Boerner, J. B., Koenig, M., Ristow, M., & Thierbach, R. (2016). Time-resolved functional analysis of acute impairment of frataxin expression in an inducible cell model of Friedreich ataxia. *Biology open*, 5(5), 654–661. <https://doi.org/10.1242/bio.017004> .

Quintero, M., Colombo, S. L., Godfrey, A., & Moncada, S. (2006). Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), 5379–5384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601026103>

Read, A. D., Bentley, R. E., Archer, S. L., & Dunham-Snary, K. J. (2021). Mitochondrial iron-sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology. *Redox biology*, 47, 102164. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102164>

- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2018). ROS Promotes Cancer Cell Survival through Calcium Signaling. *Cancer cell*, 33(6), 949–951. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.05.010>
- Runko, A. P., Griswold, A. J., & Min, K. T. (2008). Overexpression of frataxin in the mitochondria increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *FEBS letters*, 582(5), 715–719. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.046>
- Sahdeo, S., Scott, B. D., McMackin, M. Z., Jasoliya, M., Brown, B., Wulff, H., Perlman, S. L., Pook, M. A., & Cortopassi, G. A. (2014). Dyclonine rescues frataxin deficiency in animal models and buccal cells of patients with Friedreich's ataxia. *Human molecular genetics*, 23(25), 6848–6862. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu408>.
- Schultz, R., Witte, O. W., & Schmeer, C. (2016). Increased Frataxin Levels Protect Retinal Ganglion Cells After Acute Ischemia/Reperfusion in the Mouse Retina In Vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(10), 4115–4124.
- Schultz, R., Krug, M., Precht, M., Wohl, S. G., Witte, O. W., & Schmeer, C. (2018). Frataxin overexpression in Müller cells protects retinal ganglion cells in a mouse model of ischemia/reperfusion injury in vivo. *Scientific reports*, 8(1), 4846. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22887-5>
- Schulz, T. J., Thierbach, R., Voigt, A., Drewes, G., Mietzner, B., Steinberg, P., Pfeiffer, A. F., & Ristow, M. (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *The Journal of biological chemistry*, 281(2), 977–981. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511064200>
- Semenza G. L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of clinical investigation*, 123(9), 3664–3671.
- Semenza G. L. (2011). Hypoxia. Cross talk between oxygen sensing and the cell cycle machinery. *American journal of physiology. Cell physiology*, 301(3), C550–C552. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00176.2011>
- Shan, Y., Schoenfeld, R. A., Hayashi, G., Napoli, E., Akiyama, T., Iodi Carstens, M., Carstens, E. E., Pook, M. A., & Cortopassi, G. A. (2013). Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich's ataxia YG8R mouse model. *Antioxidants & redox signaling*, 19(13), 1481–1493. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4537>
- Shimizu, R., Lan, N. N., Tai, T. T., Adachi, Y., Kawazoe, A., Mu, A., & Taketani, S. (2014). p53 directly regulates the transcription of the human frataxin gene and its lack of regulation in tumor cells decreases the utilization of mitochondrial iron. *Gene*, 551(1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.043>
- Shoichet, S. A., Bäumer, A. T., Stamenkovic, D., Sauer, H., Pfeiffer, A. F., Kahn, C. R., Müller-Wieland, D., Richter, C., & Ristow, M. (2002). Frataxin promotes antioxidant defense in a thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation in vitro. *Human molecular genetics*, 11(7), 815–821. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.7.815> .
- Taylor, C. T., & Colgan, S. P. (2017). Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nature reviews. Immunology*, 17(12), 774–785. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.103>
- Tirpe, A. A., Gulei, D., Ciortea, S. M., Crivii, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6140. <https://doi.org/10.3390/ijms20246140>
- Tripathi, V. K., Subramaniyan, S. A., & Hwang, I. (2019). Molecular and Cellular Response of Co-cultured Cells toward Cobalt Chloride (CoCl<sub>2</sub>)-Induced Hypoxia. *ACS omega*, 4(25), 20882–20893.

- Torti, S. V., Manz, D. H., Paul, B. T., Blanchette-Farra, N., & Torti, F. M. (2018). Iron and Cancer. *Annual review of nutrition*, 38, 97–125. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051732>
- Tsai, C. L., & Barondeau, D. P. (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry*, 49(43), 9132–9139. <https://doi.org/10.1021/bi1013062>
- Turrens J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(Pt 2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Wang, C. Y., & Babitt, J. L. (2019). Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood*, 133(1), 18–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-815894>
- Weng, L., Wang, Q., Yu, S., Yang, X., Lynch, D. R., Mesaros, C., & Blair, I. A. (2019). Evaluation of antibodies for western blot analysis of frataxin protein isoforms. *Journal of immunological methods*, 474, 112629. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.07.001>
- Wheaton, W. W., & Chandel, N. S. (2011). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(3), C385–C393. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>
- Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piowar, A., & Barg, E. (2020). PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, 9(4), 958. <https://doi.org/10.3390/cells9040958>
- Wilson, J. W., Shakir, D., Batie, M., Frost, M., & Rocha, S. (2020). Oxygen-sensing mechanisms in cells. *FEBS Journal*, 287(18), 3888–3906.
- Yoon, T., & Cowan, J. A. (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *Journal of the American Chemical Soc*
- Yu H, Alruwaili N, Hu B, Kelly MR, Zhang B, Sun D, Wolin MS. Potential role of cartilage oligomeric matrix protein in the modulation of pulmonary arterial smooth muscle superoxide by hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019 Nov 1;317(5):L569-L577. doi: 10.1152/ajplung.00080.2018. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31389735; PMCID: PMC6879907. *iety*, 125(20), 6078–6084. <https://doi.org/10.1021/ja027967i>
- Zhou, Z. D., & Tan, E. K. (2017). Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0218-4>