



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFFECTOS DE LA HIPOXIA SOBRE EL
METABOLISMO ENERGÉTICO TUMORAL
HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

**LILIANA CARREÑO
FUENTES**



Tutores: DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ
DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ

MÉXICO, D. F.

Marzo 2009



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.

EFFECTOS DE LA HIPOXIA SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO TUMORAL HUMANO

Reconocimientos

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de los doctores Sara Rodríguez Enríquez y Rafael Moreno Sánchez en el departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Rafael Moreno Sánchez	Instituto Nacional de Cardiología
Dra. Sara Rodríguez Enríquez	Instituto Nacional de Cardiología
Dr. Adolfo García Sainz	Instituto de Fisiología, UNAM
Dra. Vilma Maldonado Lagunas	Instituto Nacional de Cancerología

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Vilma Maldonado Lagunas para la preparación de extractos nucleares e inmunoblots de p53.

Se reconoce la asesoría del Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez, del M. en C. Álvaro Marín Hernández y del Dr. José Salud Rodríguez Zavala del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología por su invaluable asesoría para la realización de diversos experimentos.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (80534 y 60085). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT.

El Jurado de Examen de Grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jesús Adolfo García Sainz	Instituto de Fisiología, UNAM
Vocal	Dr. Alfonso Dueñas González	Instituto Nacional de Cancerología
Secretario	Dra. Sara Rodríguez Enríquez	Instituto Nacional de Cardiología
Suplente	Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto Nacional de Cancerología
Suplente	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto Nacional de Nutrición

Agradecimiento y dedicatoria.

A mis papás, Dolores Fuentes y Jorge Carreño por todo el amor y apoyo que me han brindado siempre y principalmente por estos últimos 3 años. No hay palabras que expresen mi agradecimiento.

A mis hermanos Sonia, Lety y Jorge. A Rayo y Mirna. A Pablo. Gracias por estar y compartir los altibajos de estos tiempos.

A Joss y Giovana. Va por ustedes.

A mis cuñados Rosa y Gabriel. A Alan y Leslie.

A Viridiana Olin, Jorge D. García y Eduardo Martínez. No hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A los doctores José S. Rodríguez, Juan Carlos Gallardo y Alvaro Marín, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia.

A todos mis amigos y compañeros de Cardio. Gracias por el día a día.

A los integrantes de mi Comité Tutoral y Jurado de Examen por enriquecer mi trabajo con sus comentarios.

A los doctores Sara Rodríguez y Rafael Moreno Sánchez por su interés en mi formación académica, su confianza y su invaluable asesoría.

Índice.

Reconocimientos	2
Agradecimiento y dedicatoria	3
1. Abreviaturas	5
2. Resumen	6
3. Abstract	8
4. Introducción	10
Hipoxia	10
La hipoxia en los tumores	12
Métodos para medir las pO ₂ en los tumores	14
Estado energético y metabolismo glucolítico tumoral en hipoxia	16
La hipoxia tumoral y sus efectos sobre la fosforilación oxidativa	20
Las enzimas mitocondriales y la hipoxia tumoral	23
Factores moleculares relacionados con hipoxia	30
El cáncer en México	33
5. Hipótesis	35
6. Objetivos	36
General	36
Particulares	36
7. Métodos	37
8. Resultados	54
Condiciones de hipoxia	54
Crecimiento celular en normoxia e hipoxia	54
Vías energéticas	57
Glucólisis	57
Fosforilación oxidativa	58
Concentración de ATP	59
Actividad y expresión enzimática en normoxia e hipoxia	61
Efecto de la hipoxia sobre la expresión de factores de HIF-1 α y p53	75
9. Discusión	78
10. Conclusiones	92
11. Perspectivas	93
12. Referencias	95

1. Abreviaturas

ADP	Adenosin difosfato
AMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa 6	Subunidad 6 de la ATP sintetasa
CoA	Coenzima A
COX	Citocromo oxidasa
Cox III	Subunidad III de la COX
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
FSall	Fibrosarcoma de ratón
FO	Fosforilación oxidativa
GA	Glutaminasa
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HK	Hexocinasa
HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
HPV	Virus del papiloma humano
KPa	Kilo Pascales
LDH	Lactato deshidrogenada
mmHg	Milímetros de mercurio
NAD ⁺	Nicotin adenin dinucleótido oxidado
NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
ND	Complejo I de la cadena respiratoria
ND I	Subunidad I del ND
NMR	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
OxPhos	Oxidative phosphorylation
PBS	Buffer salino de fosfatos
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK	Piruvato deshidrogenasa cinasa
PFK	Fosfofructo cinasa
PLI	Imágenes de vida media de fosforecencia
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
siRNA	Pequeño RNA de interferencia
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
α-KG	α-cetoglutarato
α-KGDH	α-cetoglutarato deshidrogenasa
ε	Coefficiente de extinción molar
2DOG	2-desoxiglucosa

2. Resumen.

En los tumores sólidos el suministro de O_2 no es homogéneo y existen regiones donde la concentración de oxígeno es tan baja como $1 \mu M$. En estas condiciones de oxígeno, la velocidad de la fosforilación oxidativa (FO) disminuye mientras que se incrementa la de la glucólisis. Se ha propuesto que este fenómeno se debe a que las bajas concentraciones de oxígeno limitan a la FO. Sin embargo, la $K_{m_{oxígeno}}$ de la citocromo oxidasa (COX) es muy baja ($0.1-0.4 \mu M$) y la enzima es funcional aún a las concentraciones de O_2 encontradas en los tumores. En este trabajo se propone que la disminución de la FO por hipoxia se debe a la reducción en la actividad de enzimas mitocondriales importantes, así como de la expresión de p53 y no a la baja disponibilidad de O_2 .

Se emplearon dos líneas tumorales humanas MCF-7 (tumor de mama) y HeLa (cervico uterino) cultivadas en monocapa. La hipoxia ($20 \mu M O_2$, 24 h) abatió el crecimiento celular de ambas líneas e incrementó 4 veces la velocidad de glucólisis comparada con normoxia ($100 \mu M O_2$). La FO de MCF-7 disminuyó 4 veces (14 vs 3 nAtgO/min/mg prot), mientras que en HeLa no hubo cambio (4-6 nAtgO/min/mg prot). Los complejos respiratorios I y IV de ambas líneas tumorales se mantuvieron sin cambios por hipoxia. La cantidad de α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH) y de glutaminasa (GA) no se modificó por hipoxia en ninguna de las dos líneas celulares; tampoco su actividad varió en HeLa, en cambio en MCF-7 ambas enzimas redujeron 3 veces su actividad (α -KGDH: de 4.8 a 1.6 mU/mg prot. GA: 138 a 46 mU/mg prot.). En ambas líneas celulares, la hipoxia sobreexpresó a HIF-1 α . Por otra parte, el factor

transcripcional p53 no se detectó en HeLa pero en MCF-7 aumentó su expresión en condiciones de hipoxia.

Se concluye que la exposición a hipoxia prolongada disminuye la FO de MCF7 al reducir la actividad de la α -KGDH y GA y por tanto, reduce la disponibilidad de sustratos oxidables para la cadena respiratoria; además, éste evento puede estar relacionado con p53.

3. Abstract

Solid tumors maintain a three-dimensional structure in which oxygen's availability is not homogeneous. Thus, some micro-areas inside tumor maintain really low oxygen concentrations (1 μM). Under these scarce-oxygen conditions, the oxidative phosphorylation (OxPhos) rate decreases whereas glycolytic flux augments. It has been proposed that a possible mechanism is the low oxygen availability for the respiratory chain. However, the $K_{m_{\text{oxygen}}}$ of cytochrome c oxidase is lower than 1 μM . In the present study we propose that the diminished tumor OxPhos is the result of prolonged low-oxygen exposition, which induces changes in the activities of several mitochondrial enzymes. Also, we propose that these enzymatic changes may be associated with the reduction in p53 expression levels, a transcription factor that is reported to be involved in cellular respiration.

Two human tumor lines cultures in monolayer were assayed, MCF-7 (breast) and HeLa (cervix). Prolonged hypoxia (20 $\mu\text{M O}_2$, 24 h) arrested the cellular growth in both tumor lines compared with normoxic conditions (100 $\mu\text{M O}_2$). Under this condition, glycolysis rate increased 4-times whereas OxPhos proportionally diminished in MCF-7 cells (14 vs 3 nAtgO/min/mg protein). In contrast, glycolysis also increased 4-times in HeLa cells but not changes in OxPhos were detected (4-6 nAtgO/min/mg protein). Respiratory chain complexes I and IV were not affected in this tumor cell lines. However, severe reductions (3-fold) were observed in α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH, from 4.8 to 1.6 mU/mg protein) and glutaminase (GA, from 138 to 46 mU/mg protein) activities in MCF-7 cells although protein levels were not altered. For HeLa cells, no changes were observed in these mitochondrial enzymes. In both

tumor lines, hypoxia induced an over-expression of HIF-1 α compared with normoxic conditions. Also, in MCF-7 the p53 levels were increased in hypoxia. In HeLa no p53 signal was detected in both normoxia and hypoxia. It is concluded that hypoxia diminished the OxPhos flux by reducing α -KGDH and GA activities in MCF-7 cells. These severe enzymatic reductions may reduce the availability of respiratory chain substrates promoting OxPhos inhibition. Interestingly, GA activity reduction may be related to p53 over- expression in MCF-7.

4. Introducción.

Hipoxia.

El oxígeno es la molécula de la vida. Los animales que lo consumen se adaptaron evolutivamente para vivir a presiones parciales (presión individual del oxígeno en la mezcla de aire) de aproximadamente 150 -160 mmHg a nivel del mar. No obstante, la concentración de oxígeno varía de tejido a tejido y entre los diferentes estadios de desarrollo de un individuo. Por ejemplo, la presión parcial de oxígeno (pO_2) promedio en la mucosa gástrica es de 47 mmHg, mientras que en el hígado es de 24 mmHg (1); por otra parte, en mamíferos adultos la pO_2 arterial es 3 veces mayor que la del feto (100 mmHg vs 35 mmHg) (2). Estas variaciones dependen de la difusión del oxígeno a través de los capilares y de la velocidad de su consumo por las mitocondrias, la cual será mayor o menor dependiendo de la actividad metabólica del tejido.

La pO_2 intracelular es mucho menor que la del aire y las arterias, lo cual se representa en el siguiente esquema.

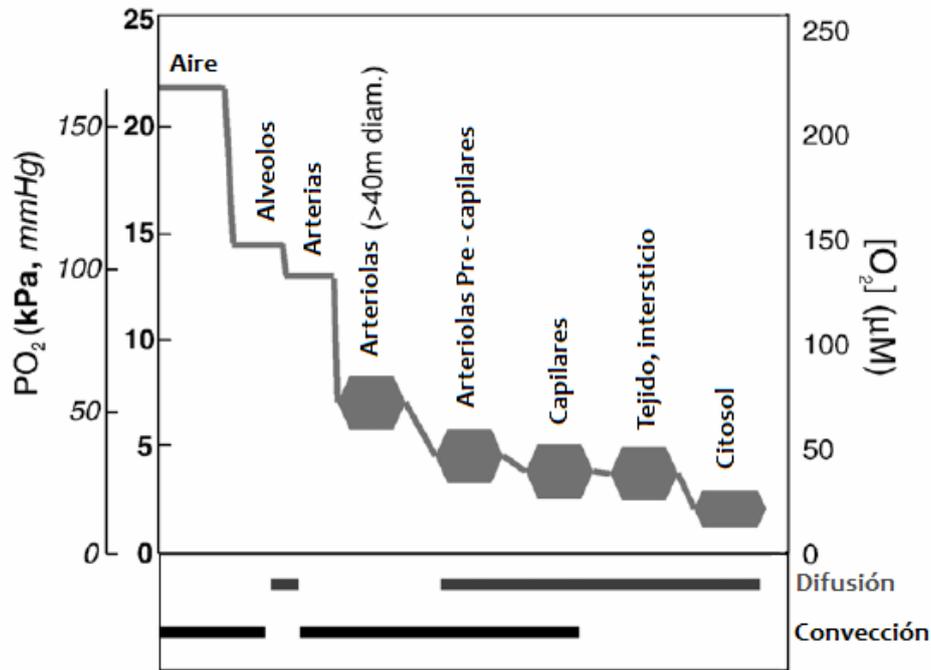


Figura 4.1. Representación de la distribución regional de la pO₂ desde el ambiente hasta el citosol. Las barras muestran el tipo de transporte (difusión o convección). Modificado de (2).

La gráfica muestra que el oxígeno que entra al organismo a partir del aire atmosférico, es transportado hasta los capilares principalmente por el movimiento sanguíneo (convección) y a partir de éstos por difusión hacia el citosol. Por lo tanto existe un gradiente de oxígeno en el cuál la presión parcial disminuye desde 160 mmHg en el aire, pasando por 100 mmHg (150 µM) en las arterias y llegando a ser menor que 20 mmHg (28 µM) en el interior de las células. Consecuentemente, en el citosol la cantidad de oxígeno es solamente un 10% del atmosférico.

De manera global, se considera que en los tejidos normales la hipoxia se genera a concentraciones de oxígeno menores de 49 µM y en tumores a concentraciones iguales o menores de 14 µM (3). Sin embargo, dado que los intervalos son muy amplios y dependen de muchos factores, Vaupel y Zander

definieron a la hipoxia como un estado en el que la disponibilidad o la presión parcial de oxígeno están reducidas y que restringen o incluso abaten las funciones de órganos, tejidos o células (4), lo cual dependerá de las concentraciones normales de oxígeno en esos sistemas.

La hipoxia en los tumores.

Las células tumorales presentan claras diferencias genéticas, bioquímicas y morfológicas con respecto al tejido de origen. Diversos factores están involucrados en la generación de dichos cambios, tales como el flujo sanguíneo y el suministro de nutrientes, la oxigenación del tejido, la distribución del pH y el estado energético celular, entre otros.

El crecimiento y expansión de los tumores sólidos requiere del oxígeno y de los nutrientes transportados por el flujo sanguíneo. Para obtenerlos, el tumor emplea los vasos sanguíneos preexistentes en el hospedero y además, promueve la angiogénesis a través de la expresión de proteínas como el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), el cual estimula la formación, el crecimiento y el mantenimiento de vasos sanguíneos. Sin embargo, la morfología y función de estos vasos es anormal. Por ejemplo, los vasos sanguíneos del hospedero al ser integrados al tumor pueden desintegrarse, obstruirse o comprimirse, y por otra parte, los vasos formados por el tumor desarrollan paredes incompletas o estructuralmente frágiles y además pueden presentar irregularidades en sus contornos, ser sinuosos y estar distribuidos de

manera caótica. Lo anterior ocasiona disminución e inestabilidad en el flujo sanguíneo, frecuentes hemorragias y aumento en la viscosidad sanguínea (1). Todas estas alteraciones provocan que la irrigación no sea homogénea ni suficiente en el tumor y por tanto, aún en tumores con profusa vascularización se presenten zonas hipóxicas.

En 1919, Krogh demostró que las concentraciones de oxígeno en músculo disminuyen proporcionalmente con el incremento en la distancia entre las células y los capilares, de tal modo que las células bien oxigenadas se encuentran a distancias menores de 150 μm de los vasos sanguíneos (5). En 1997, Helmlinger y colaboradores (6) demostraron *in vivo* que el microambiente tumoral es heterogéneo, dependiendo de la distancia entre las células y los vasos sanguíneos (figura 4.2).

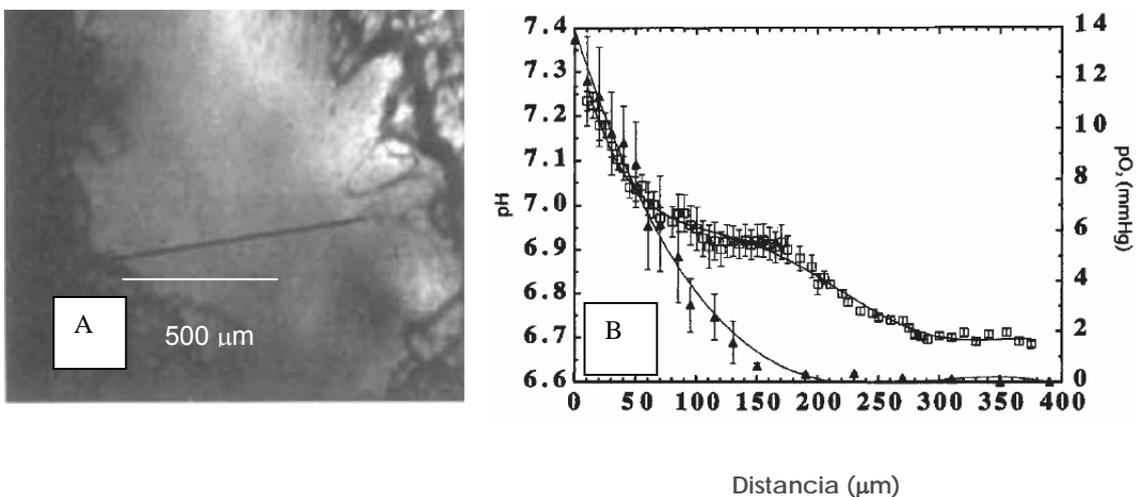


Figura 4. 2. Relación entre el pH y la presión parcial de oxígeno en tumores de LS174T (adenocarcinoma de colon humano) al incrementar la distancia a los vasos sanguíneos. **A**) Imagen transiluminada de tumor. **B**) Promedio de las mediciones de pH y pO₂ realizadas en aprox. 7 tumores. La línea trazada en A es representativa de los puntos donde se sensó el pH y la pO₂ en los diferentes tumores. Triángulos, pO₂; cuadros, pH. (Tomado de 6)

Este trabajo demostró que la pO_2 disminuye considerablemente a distancias mayores o iguales que 100 μm de los vasos sanguíneos, llegando a presiones cercanas a cero a distancias de 150 μm . Estudios posteriores confirmaron estas mediciones en tumores generados a partir de R3230AC (adenocarcinoma mamario) (7).

Métodos para medir las pO_2 en los tumores.

Existen diversos métodos para medir el estado de oxigenación en los tumores sólidos, los más empleados son:

- a) Uso de microelectrodos que miden directamente la pO_2 en el tumor. Este método es invasivo y puede destruir parte del tejido, además de sobreestimar la medición al facilitar la difusión del O_2 desde el medio externo.
- b) Unión de drogas nitroheterocíclicas como el misonidazol, pimoniazola, EF5, etc., a las células hipóxicas y que se cuantifican, ya sea *in vivo* o *ex vivo*, por inmunohistoquímica, fosforescencia, etc. y que pueden ser o no invasivos (8).
- c) Por resonancia magnética nuclear (NMR) que emplea isótopos como el ^{19}F (fluorina).

En la tabla 4.1 se presentan algunas de las mediciones de oxígeno más bajas que se han encontrado en diversos tipos de tumores.

Tabla 4.1. Concentraciones de O₂ en tumores y los métodos de medición.

Tumor	Método Medición	[O ₂] (μM)	Referencia
Carcinoma escamoso de cabeza y cuello	Inmunotinción	1	9
Adenocarcinoma mamario	PLI	> 1	10
Próstata (región central)	Espectroscopia NMR	2.0 – 9.1	11
Mama	Electrodo	3.5 – 42	12
Médula, mama, pulmón	Electrodo	< 7	13
Cervix	-	7 – 29	14
Próstata Dunning (periferia)	¹⁹ F Espectroscopia NMR	11 – 110	15
Próstata Dunning	FREDOM	14 – 61	16
Fibrosarcoma	EPR	15	17

NMR- resonancia magnética nuclear.

EPR – resonancia paramagnética electrónica

PLI – imágenes de vida media de fosforescencia

FREDOM - ¹⁹F nuclear magnetic resonance echo planar imaging relaxometry

Para efectos de comparación, los valores originales se transformaron a unidades molares usando el factor: 1 mmHg = 1.4 μM.

Sin importar el método empleado, las mediciones realizadas demuestran que en los tumores existen zonas con altas concentraciones de oxígeno (40, 112 μM), así como zonas francamente hipóxicas (1, 2, 15 μM), y también es claro que no existe uniformidad en las concentraciones de oxígeno, ni siquiera entre tumores del mismo tipo.

A pesar de esta heterogeneidad, existe una correlación entre el tamaño del tumor y la hipoxia, pues en tumores pequeños (< 1 cm³) las concentraciones son cercanas a normoxia (28 a 60 μM), mientras que en tumores que han alcanzado 5 – 6 cm³ las concentraciones se hallan por debajo de 14 μM, siendo mayor también la fracción hipóxica del tejido (8).

Estado energético y metabolismo glucolítico tumoral en hipoxia.

La hipoxia tumoral es un factor determinante en la generación de fenotipos más agresivos y con mayor metástasis, pues promueve la inestabilidad genética, es decir, incrementa la tasa de mutaciones puntuales, la amplificación de genes, la hiper-mutagénesis y la ruptura de las cadenas de ADN, todo lo cual se asocia con la aparición de fenotipos resistentes a fármacos, con potencial apoptótico disminuido o con mayor capacidad angiogénica. Por otra parte, en melanomas humanos y en otros tipos de cáncer la hipoxia aumenta la metástasis debido al aumento en la expresión de genes específicos, tales como el PLAU, la interleucina 8 (IL8) y el VEGF (revisado en 18).

A partir del conocimiento de las repercusiones que tiene la hipoxia sobre la malignidad del cáncer, se realizaron estudios para conocer si la oxigenación del tumor tiene algún impacto sobre el estado energético celular, lo que se describe a continuación.

En tumores generados a partir de líneas celulares procedentes de sarcomas de ratón (KHT, RIF-1) y de líneas humanas de carcinoma de ovario (MLS, OWI) se encontró que cuando éstos alcanzan volúmenes mayores a 500 mm³ las concentraciones de moléculas de alta energía como ATP y fosfocreatina (PCr) disminuyen, mientras la concentración de fosfato (Pi) incrementa, es decir, el estatus energético celular está disminuido en tumores cuyo tamaño correlaciona con la presencia de hipoxia (19, 20).

Los estudios realizados por Vaupel y colaboradores a principios de los años 90's en tumores generados con FSall (fibrosarcoma de ratón) mostraron la existencia de una estrecha relación entre la pO_2 , el contenido de ATP y lactato y el pH intracelular (21). Estos autores encontraron que a pO_2 mayores o iguales a 10 mmHg (14 μM) el ATP se mantiene constante (1 – 1.2 mM), mientras que a pO_2 menores que 14 μM las concentraciones de ATP disminuyen hasta un 60% y el pH disminuye de 7.2 a 6.75, mientras que el Pi se incrementa de 5 hasta 10 mM (Figura 4.3).

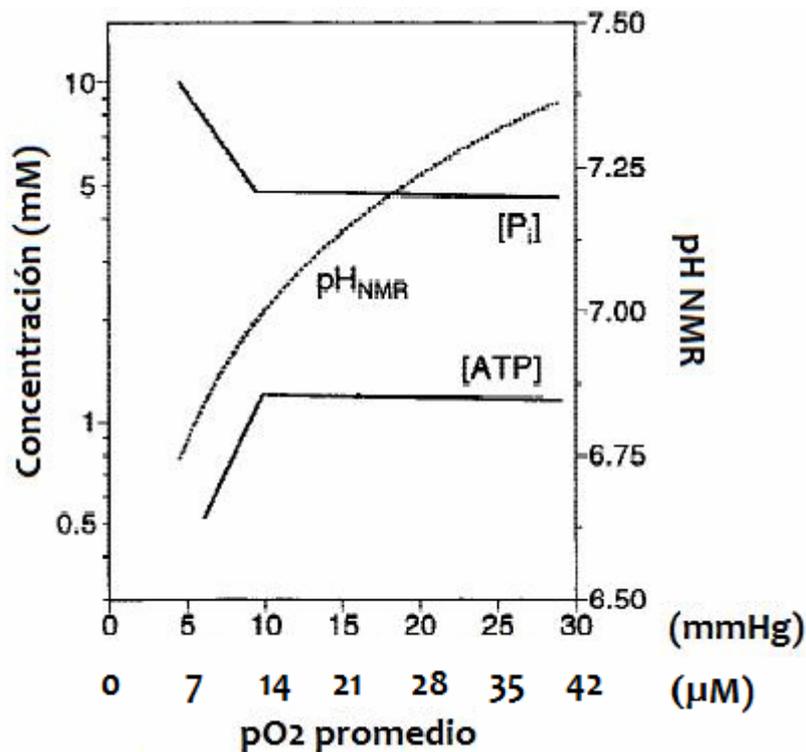


Figura 4. 3. Relación entre la presión parcial de oxígeno y las concentraciones de Pi y ATP y el pH intracelular. (Modificado de 3).

La disminución en la concentración de ATP y el incremento de Pi (que puede provenir de la conversión del ATP en ADP y Pi), sugiere que a concentraciones de oxígeno menores que 10 mmHg se generan cambios en las rutas

consumidoras de ATP, como la síntesis de proteína y la duplicación celular o en las rutas productoras de energía, glucólisis y fosforilación oxidativa (FO).

Una característica común de los tumores es su alta capacidad glucolítica. En 1956, Otto Warburg postuló que la respiración de las células cancerosas se encuentra irreversiblemente dañada, por lo cual dichas células dependen completamente de la glucólisis como fuente energética, siendo este fenómeno la causa fundamental del cáncer (22). A pesar de que el supuesto daño en la respiración de las células tumorales señalado por Warburg no se ha comprobado totalmente, sí es claro que la glucólisis está aumentada en la mayoría de los tumores con respecto al tejido de origen, aún en presencia de oxígeno. Por ejemplo, diferentes hepatomas (Reuber, Morris, Dunning y LC18) presentan velocidades de formación de lactato de $0.2 - 2.7 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$, mientras que las células hepáticas tienen velocidades de $0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ (23).

El aumento en la glicólisis también puede estar relacionado con la malignidad de los tumores. Por ejemplo, MCF-7 y MDA-MB-231 son líneas de cáncer mamario con diferente grado de agresividad. MCF-7 es una línea no invasiva y presenta velocidades de hasta $15 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$, mientras que MDA-MB-231, que es un cáncer altamente metastático, tiene velocidades de $40 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ (24).

Con el uso de la 2-[^{18}F] fluoro-2-deoxi-D-glucosa (FDG) en la tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) se ha demostrado *in vivo*

que las regiones hipóxicas de diferentes tumores, tanto experimentales como de pacientes, pueden acumular 10 veces más glucosa que el tejido normal (revisado en 25). En tumores generados a partir del hepatoma de rata KDH-8 y de líneas de cáncer de pulmón humanas (SCLC) se determinó una relación lineal entre la acumulación de FDG y el incremento en la expresión de GLUT-1, GLUT-3 y hexocinasa II (HK II) (26, 27); es decir, la sobreexpresión de estas proteínas se genera en las zonas tumorales con menor grado de oxigenación. De hecho, se ha descrito que la hipoxia eleva más de dos veces los niveles de mRNA de GLUT-1 en carcinomas de ovario y pulmón y en fibroblastos de roedor oncogénicamente transformados (revisado en 28). En líneas tumorales humanas (HeLa, HepG2, Hep3B) y de roedor (P493-6) la hipoxia incrementa 2 a 10 veces la expresión de ocho de las enzimas glucolíticas: HK II, fosfoglucosa isomerasa (PGI), aldolasa (ALD), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicerato cinasa (PGK), enolasa 1 (ENO1), piruvato cinasa (PYK) y lactato deshidrogenasa (LDH) (28-37). Recientemente se demostró mediante experimentación *in silico* que la hipoxia también sobreexpresa a la fosfofructo cinasa (PFK), a la triosafosfato isomerasa (TPI) y a la fosfoglicerato mutasa (PGM), todas provenientes de células tumorales (38).

Con todos los datos mencionados hasta el momento es evidente que las células cancerígenas sometidas a hipoxia incrementan su velocidad de glucólisis debido a la sobreexpresión de las enzimas glucolíticas, lo cual supone una adaptación a las bajas concentraciones de oxígeno y posiblemente sea un fenotipo necesario para las células altamente metastásicas. Pero, retomando la hipótesis de Warburg, no está claro si el incremento en la

glucólisis está necesariamente relacionado con una reducción en la actividad de la FO.

La hipoxia tumoral y sus efectos sobre la fosforilación oxidativa.

La FO consiste de dos sistemas, uno oxidativo y otro fosforilante (39). El primero incluye los transportadores de los sustratos oxidables (piruvato, succinato, glutamato, etc.) hacia la matriz mitocondrial, el ciclo de Krebs que oxida los sustratos generando NADH y FADH₂ y finalmente, la transferencia de los electrones de estas últimas moléculas a través de los cuatro complejos que forman la cadena respiratoria. El complejo I (NADH deshidrogenasa) oxida al NADH y el complejo II (succinato deshidrogenasa) al succinato, ambos transfieren los electrones a la ubiquinona (Q). El complejo III, que contiene a los citocromos b y c₁ recibe los electrones de la ubiquinona reducida (QH₂) y los acarrea al citocromo c (Cit c), del cual los extrae el complejo IV (Citocromo oxidasa, COX) el cual, a través de los citocromos a y a₃ los transfiere al O₂, formando agua. La transferencia sucesiva de electrones es favorecida termodinámicamente debido a que los electrones fluyen espontáneamente de un potencial redox estándar negativo (E'°) a uno menos negativo o positivo, así la cadena inicia con el par redox NADH/NAD⁺ que tiene un E'° de -320 mV y termina con el par O₂/H₂O cuyo E'° es de 816mV, siendo el ΔE'° de 1.14 V (40).

La energía generada por la transferencia de electrones es usada por los complejos I, III y IV para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. La ecuación total para este proceso es:



Donde N es la matriz mitocondrial y P el espacio intermembranal.

El bombeo de protones genera un gradiente en el espacio intermembranal que es empleado por el complejo V (ATP sintetasa) para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi (Figura 4.4). La ATP sintetasa en conjunto con el translocador de adenin nucleótidos (ANT), que intercambia ADP por ATP, y el transportador de fosfato, forman el sistema fosforilante de la FO.

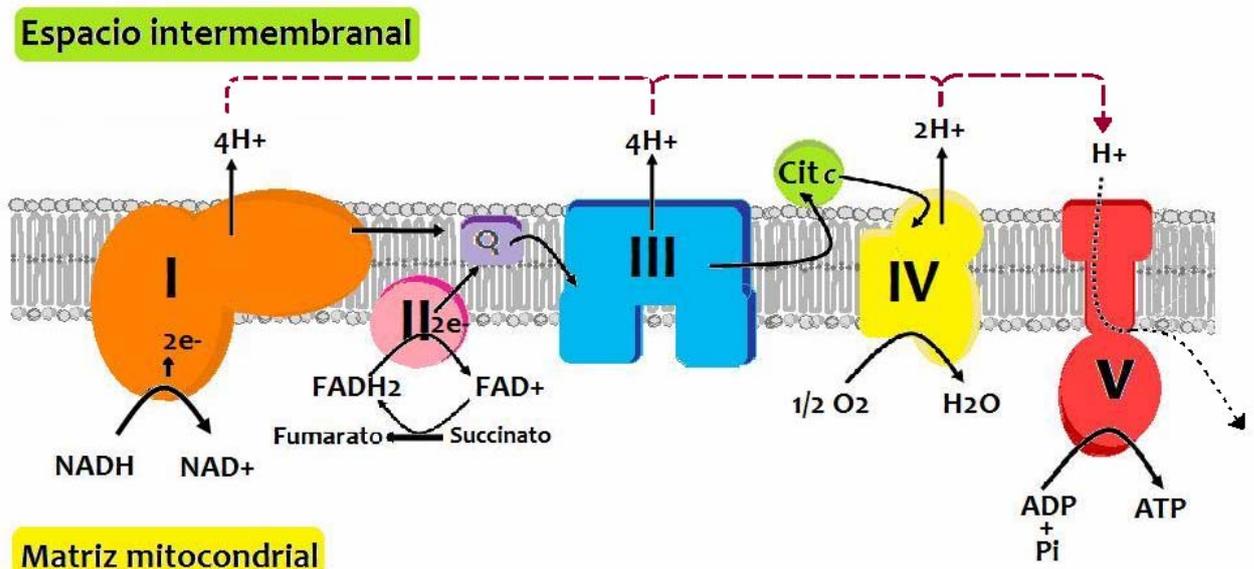


Figura 4. 4. Esquema de la cadena respiratoria, en la cual se transfieren electrones hasta el oxígeno a partir del NADH y el succinato, generando un gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP. I: Complejo I, NADH deshidrogenasa; II: Complejo II, succinato deshidrogenasa; Q: ubiquinona; III: Complejo III, complejo citocromo bc₁; IV: Complejo IV, citocromo oxidasa; V: Complejo V, ATP sintetasa.

A raíz de la hipótesis de Warburg, se afirma que los tumores tienen dañada la respiración y que ello se debe a que la hipoxia tumoral limita la cadena respiratoria. Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se haya medido la velocidad de respiración de células cancerosas en condiciones de hipoxia. En la siguiente tabla se muestran los dos más característicos.

Tabla 4.2. Disminución de la velocidad de respiración en hipoxia.

Tipo Celular	Decremento	Condiciones de hipoxia	Referencia
Hepatoma Ehrlich	90 %	0.7 $\mu\text{M O}_2$	41
Cáncer renal (RCC4) y de colon (RKO)	50%	5 $\mu\text{M O}_2$, 24 hr	42

Estas evidencias indican que la hipoxia altera la respiración celular, pero las causas de este fenómeno no se han esclarecido aún. Se ha propuesto que este fenómeno se debe a que la hipoxia intermitente disminuye la disponibilidad de O_2 y por tanto, limita la función de la cadena respiratoria (revisado en 43). Sin embargo, los valores de K_m conocidos de la citocromo oxidasa (COX) por oxígeno tienen valores muy bajos (tabla 4.3).

Tabla 4.3. K_m por oxígeno de la citocromo oxidasa (COX).

Modelo	$K_m\text{O}_2$ (μM)	Referencia
Partículas submitocondriales de corazón de res	0.1 – 0.15	44
Mitocondrias de corazón de rata	0.45	45
Fibroblastos de piel humano	0.39	46
Hepatoma Ehrlich (roedor)	0.187	41

Estos valores de K_m indican que la afinidad de la COX por O_2 es muy alta (valores pequeños de K_m , afinidad alta) y que por tanto, la citocromo oxidasa y la cadena respiratoria pueden funcionar, incluso en concentraciones de oxígeno tan bajas como las reportadas en tumores (hasta 1 μM), es decir, no existe la limitación por oxígeno propuesta para explicar el efecto Warburg. Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de los valores de K_m conocidos se

obtuvieron en mitocondrias de tejido normal, por lo que es posible que en los tumores sólidos los valores cinéticos sean diferentes y el oxígeno presente en las zonas hipóxicas sí sea limitante.

Entonces, los responsables de que la respiración celular disminuya por hipoxia aún no se han identificado.

Las enzimas mitocondriales y la hipoxia tumoral.

La hipoxia altera la tasa respiratoria y es posible que este cambio se deba a modificaciones en la expresión y actividad de las enzimas mitocondriales. Al contrario de la vasta información que existe sobre los efectos de la hipoxia en las enzimas glucolíticas, la información sobre las enzimas de la FO es escasa.

Chandel y colaboradores (47) observaron en hepatocitos de rata que, al someterlos a concentraciones de 28 y 44 μM de oxígeno durante 5 h, disminuyeron 2 veces la velocidad de respiración y la actividad y expresión de la citocromo oxidasa (COX), pero en forma interesante también notaron que estos cambios se revirtieron al incubar a las células hipóxicas con concentraciones de oxígeno 5 veces mayores (47,48). Por otra parte, está documentado que el citocromo c reduce su expresión en condiciones de 20 μM de O_2 por 72 h en células de músculo esquelético (49) y estos cambios no fueron reversibles, lo que sugiere que para que la hipoxia genere cambios **permanentes** en las células, el tiempo de exposición debe ser **prolongado**.

En la siguiente tabla se resumen los cambios producidos por la hipoxia en células cancerosas.

Tabla 4.4. Cambios en las enzimas mitocondriales provocados por hipoxia en líneas celulares cancerosas.

Enzima	Cambio	Parámetro medido	Condiciones de Hipoxia	Tipo celular	Referencia
ATPasa 6	↓ 59%	mRNA	10 μ M O ₂ , 16 h	HepG2	50
Cox III	↓ 67%				
ND I	↓ 47%				
GA	↓ 60%	mRNA	10 μ M O ₂ , 3-24 h	PC12	51
	↓ 50%	Proteína			
	↓ 30%	Actividad			
PDK 1	↑ (-)	mRNA	0.5 μ M O ₂ , 24 h	RKO	42

↓ Decremento vs normoxia

↑ Incremento vs normoxia

El primer trabajo presentado en la tabla anterior muestra que la hipoxia disminuyó los niveles de RNA mensajero de subunidades de tres complejos de la cadena respiratoria, el complejo I, IV y V, pero desafortunadamente no midieron la velocidad de la FO ni la actividad de dichas enzimas para conocer si la disminución en la cantidad de mRNA influyó en la actividad metabólica.

Kobayashi identificó que la glutaminasa (GA) también se afecta por hipoxia. La glutaminasa (GA) cataliza la reacción de oxidación de la glutamina a glutamato con la concomitante liberación de amonio.

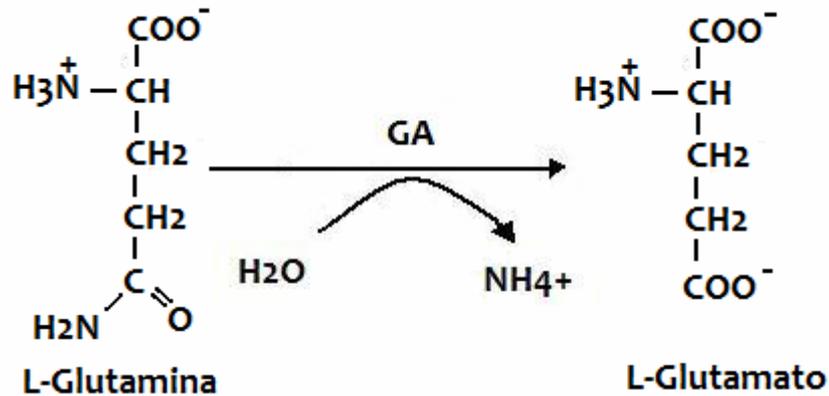


Figura 4. 5. Reacción catalizada por la GA.

La glutamina es el aminoácido en circulación más abundante del cuerpo y es esencial para el crecimiento de células normales y tumorales, ya que se emplea en la síntesis de proteínas y como fuente de energía (52). Células cancerosas como los hepatomas Ehrlich, Ehrlich Letré y AS-30D, así como la línea celular TSE (cáncer de mama) consumen grandes cantidades de glutamina, incluso en presencia de glucosa (53), y pueden llegar a depletar de glutamina a los órganos circundantes. A pesar de su importancia, la información sobre el comportamiento de la GA durante eventos de hipoxia es escasa. En la tabla 4.4 se muestra que la hipoxia disminuyó la actividad de la GA en la línea celular PC12 (tumor de glándula adrenal). En otro trabajo, el grupo de Vaupel (54) demostró que en tumores de cáncer de mama con zonas hipóxicas el consumo de glutamina no es significativo y que la velocidad de consumo igualaba a la velocidad de secreción. Estos datos sugirieron que la ruta de oxidación de la glutamina, de la cual la GA forma parte, es poco activa, pero no se muestran datos de actividades enzimáticas que justifiquen su propuesta.

La última enzima mitocondrial de la que está documentado que se lleva a cabo otra adaptación a la hipoxia es la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK), la cual es parte del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (42). La PDH es un complejo multienzimático, que convierte al piruvato, producto final de la glucólisis aeróbica, en acetil-CoA (figura 4.6), el cual alimenta al ciclo de Krebs para obtener los equivalentes reductores necesarios para la cadena respiratoria. La actividad del complejo de la PDH se regula alostéricamente por ATP, AMP, acetil-CoA, NADH, Ca^{2+} , CoA y es regulada covalentemente por la acción de las enzimas piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) y piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP), cuyas reacciones determinan la cantidad de PDH activa (desfosforilada) o inactiva (fosforilada) (55).

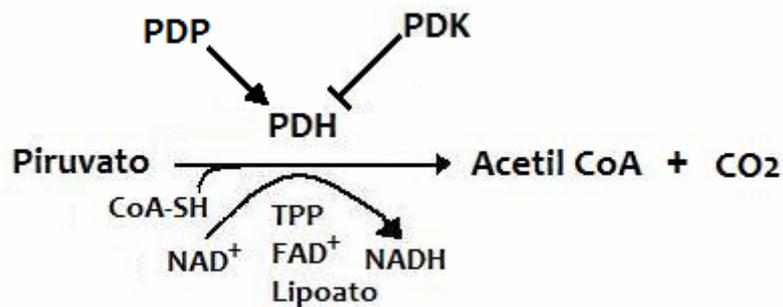


Figura 4. 6. Reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa (PDH). La PDK regula a la PDH mediante fosforilación y evita la oxidación de piruvato a acetil-CoA.

En células RCC4 (cáncer renal) y RKO (cáncer de colon) se encontró que a concentraciones de oxígeno de 0.5% (5 μM), se aumenta considerablemente la expresión de la PDK, mientras que la FO disminuyó hasta en un 50%. Sin embargo, en este estudio no se determinó directamente la actividad de la PDH con el fin de corroborar que la enzima se encontraba inhibida y además, la

disminución en la expresión de la PDK mediante siRNA, no recuperó los niveles de respiración de normoxia, sugiriendo que la sobreexpresión de la PDK no es el único mecanismo que puede alterar la FO. Los autores de este trabajo sugirieron que la hipoxia disminuye la respiración celular debido a que no hay oxidación del piruvato por la PDH, y por lo tanto, el ciclo de Krebs no es alimentado y no se produce el NADH necesario para la cadena respiratoria (Figura 4.7).

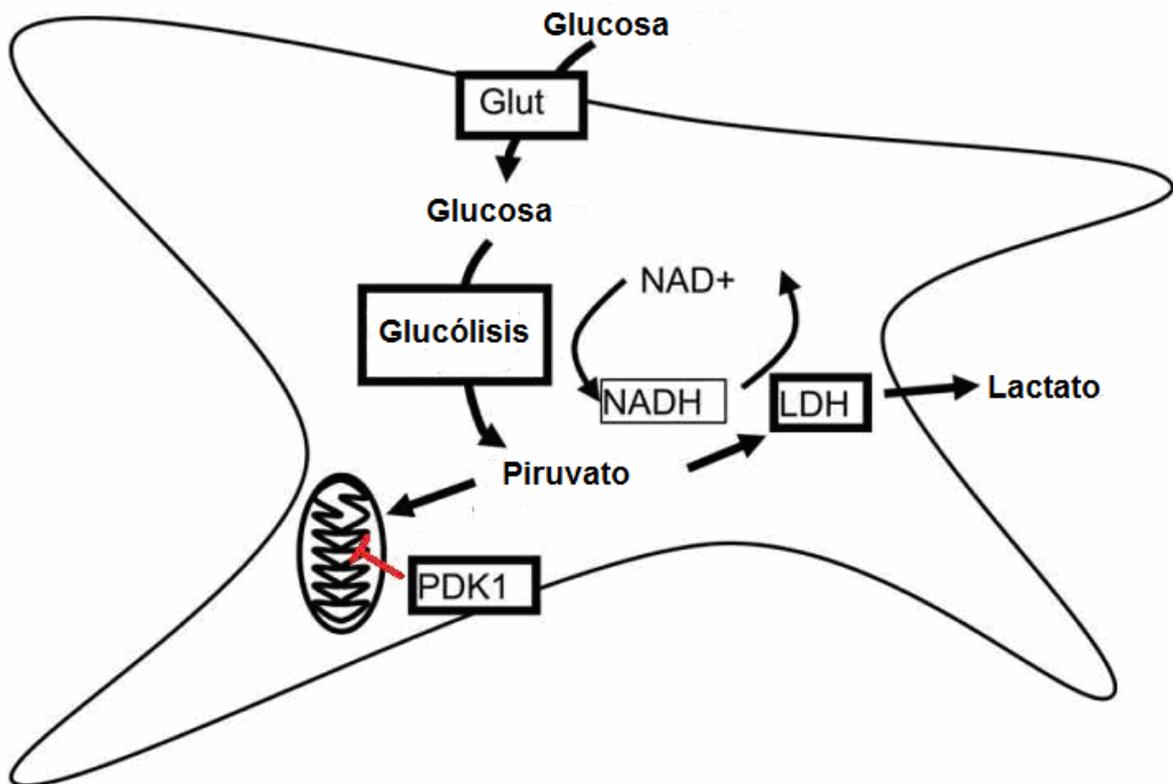


Figura 4.7. Propuesta de Denko y colaboradores que pretende explicar la disminución de la respiración por hipoxia. Debido a la sobreexpresión de la PDK, la PDH se inactiva y el piruvato formado por la glucólisis no es oxidado por la mitocondria y es usado por la lactato deshidrogenasa (LDH) para formar lactato, lo que regenera el NAD^+ necesario para continuar con la glucólisis. (Tomado de 42).

Esta propuesta es aceptada por un gran número de investigadores como el mecanismo responsable de la disminución en la respiración celular por hipoxia,

pero es deficiente, porque no considera que el ciclo de Krebs puede ser alimentado por otras fuentes, como son la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que generan una cantidad considerable de acetil CoA e intermediarios de este ciclo (glutamato, acetil CoA, oxaloacetato, etc) y cuyo metabolismo también pudiera estar afectado por hipoxia.

Hasta el momento, solamente las enzimas mitocondriales mencionadas han sido analizadas en relación con la hipoxia. De acuerdo con la información que se posee, los complejos respiratorios se afectan por hipoxia, pero se desconoce si este estrés afecta al ciclo de Krebs y con ello se modifique la cantidad de NADH y FADH₂ necesarios para la cadena respiratoria. Consideramos que para tener una visión completa de los eventos que provocan que la hipoxia disminuya la respiración celular, es necesario medir la actividad y expresión de enzimas mitocondriales importantes, particularmente de las que se sabe que controlan importantemente el flujo de las vías, como es el caso de la PDH y α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH) en el ciclo de Krebs (56,57) y el complejo I en la cadena respiratoria (53), así como de la glutaminasa por la importancia de la glutamina en los tumores.

La información presentada hasta el momento muestra que aún en condiciones de hipoxia, no existe limitación de oxígeno para el buen funcionamiento de la cadena respiratoria, por lo que no existen motivos para inferir que dicha limitación sea la responsable de la disminución en la respiración y el incremento de la glucólisis. Por lo tanto, el cambio en la FO debe ser generado a nivel molecular. Muchos de los datos presentados en esta introducción están

relacionados con la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1), que es el factor transcripcional más estudiado en relación con este tema. A continuación se ahondará en la información concerniente a este factor y a otros que posiblemente estén involucrados en la adaptación tumoral a hipoxia.

Factores moleculares relacionados con hipoxia.

HIF-1

El factor inducible por hipoxia (HIF-1) fue identificado a través del análisis del gen de la eritropoyetina (EPO), el cual contiene un elemento que responde a hipoxia (la secuencia HRE) y se observó que la expresión de EPO y HIF incrementaban rápidamente con la disminución de oxígeno en el medio (revisado en 58).

HIF-1 es un heterodímero que se encuentra en casi todos los tejidos, está formado por las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β que dimerizan y generan la proteína activa. HIF-1 β es una proteína que se expresa constitutivamente y no responde a cambios en la concentración de oxígeno, mientras que HIF-1 α es la parte del dímero sensible a oxígeno. En condiciones de normoxia HIF-1 α es ubiquitinada y degradada por el proteasoma, en hipoxia, este fenómeno no ocurre y la cantidad de HIF-1 activo se incrementa.

Se ha visto que en hipoxia, el incremento en la expresión del transportador de glucosa y las enzimas glicolíticas HK 1 y 2, PFK-L, aldolasa A y C, triosa fosfato isomerasa (TPI), GAPDH, PGK1, enolasa 1, PK-M y LDH-A, es debida a la acción directa de HIF-1. Este factor también afecta a otras enzimas necesarias para la supervivencia y crecimiento de las células como EPO, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la sintetasa de óxido nítrico 2 (NOS 2), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), etc. (59).

En cuanto a las enzimas mitocondriales, se sabe muy poco de la influencia de HIF sobre ellas. El principal hallazgo fue el realizado por Denko y colaboradores, cuando identificaron que HIF-1 regula la actividad de la cadena respiratoria, a través de la modulación de uno de sus blancos directos, la PDK1 (piruvato dehidrogenasa cinasa) (42). Así, con la sobreexpresión de esta enzima, disminuye la actividad de la PDH y en consecuencia la cadena respiratoria.

Dado que HIF-1 es la “llave maestra” en los cambios celulares que genera la hipoxia, así como con la PDK1, es posible que HIF-1 también provoque alteraciones en otras enzimas mitocondriales, ya sea de forma directa o indirecta.

p53

El factor transcripcional p53 es una fosfoproteína que se activa en respuesta a señales de estrés, como daño al DNA, hipoxia, shock de calor o frío, inflamación, producción de óxido nítrico (NO) o activación de oncogenes. Todos estos factores tienen el potencial de disminuir la fidelidad de la replicación del DNA e incrementar la tasa de mutación. Para contrarrestarlo, p53 se une a secuencias específicas en el DNA, con lo que activa o reprime la expresión de diversos genes (p21, Fas, MDM2, Bax, c-myc, IL-6, etc.) (60) y produce respuestas tales como detener el ciclo celular o inducir apoptosis y autofagia (61). Es de gran relevancia que una de las alteraciones genéticas más importantes en cáncer es precisamente la alta incidencia de mutaciones en p53, estando estos defectos fuertemente asociados con el crecimiento del tumor y la metástasis (62).

La hipoxia es un factor que activa la función pro-apoptótica de p53. Estudios *in vivo*, en los cuales se usaron células deficientes en p53 (p53^{-/-}), mostraron que la pérdida de p53 reduce la apoptosis hasta 3.4 veces en las zonas hipóxicas, comparado con los tumores p53^{+/+} (63). Entonces, se ha propuesto que la hipoxia selecciona aquellas células con defectos en p53 que les permitirán evadir la apoptosis y sobrevivir en el microambiente agresivo.

Con respecto al metabolismo mitocondrial, se encontró que células HCT116 (adenocarcinoma de colon humano) p53^{-/-} consumen menos (20%) oxígeno que las células silvestres (p53^{+/+}). La ausencia de p53 reduce la expresión de la

proteína SCO2 (Síntesis de Citocromo c oxidasa subunidad 2), la cual ensambla a la subunidad 2 de la citocromo oxidasa (COX II) en dicha holoenzima (64).

Esta información muestra que la adaptación celular a los microambientes hipóxicos tumorales incluye, entre otros factores, la inactivación de p53.

Relación entre HIF-1 y p53

Como ya se mencionó, HIF-1 es la proteína clave en la adaptación celular a la hipoxia y existe información que indica que p53 disminuye su actividad. En células HCT116 (adenocarcinoma de colon humano) p53^{-/-} y p53^{+/+}, expuestas a hipoxia (1% O₂, 16 - 32 h), se encontraron mayores niveles de HIF-1 α y de VEGF en la población celular carente de p53 (62). Resultados similares se obtuvieron en un estudio posterior en el que se investigó el efecto, sobre HIF y p53, de la caseína cinasa 2 (CK2), que es una proteína que al fosforilar a p53 provoca su degradación por proteasoma. En este estudio se encontró que disminuyendo la actividad de CK2 se incrementa la actividad de p53 y esto producía un decremento en la actividad de HIF-1. Es interesante que la hipoxia genera la sobreexpresión de CK2, por lo cual p53 se degrada y HIF incrementa su actividad (65).

Todos estos datos indican que en hipoxia, es necesaria la desaparición o mutación de p53 para evitar la apoptosis y estabilizar a HIF-1, generando alteraciones en la respiración celular.

El cáncer en México.

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) el cáncer ocupa el tercer lugar en la lista de las principales causas de muerte en México, lo que representa el 13% de las defunciones registradas (INEGI. Estadísticas vitales, 1997-2006). En los varones promedia el 11.3% de las defunciones y en las mujeres el 15%. Entre la población femenina de 25 a 34 años, los tumores malignos representan la primera causa de muerte, 17.2% de los fallecimientos son causados por éstos.

En las mujeres los tumores de mama y el de cuello del útero, son los que provocan mayor número de decesos, 15 y 14% respectivamente (INEGI. Estadísticas vitales. Defunciones 2006).

Por su importancia en la salud pública y para entender los cambios metabólicos inducidos por hipoxia en estos dos tipos de cáncer, en este trabajo se eligieron dos líneas celulares derivadas de ellos. MCF-7 que es una línea de cáncer de mama, cuyo estadio de malignidad es bajo, y HeLa que proviene de un tumor cérvico uterino altamente metastásico.

5. Hipótesis.

Por lo antecedentes presentados se propone la siguiente hipótesis:

La hipoxia prolongada limita la respiración celular por efecto de la disminución en el grado de expresión y la actividad de algunas enzimas importantes de la fosforilación oxidativa, así como la expresión de p53.

6. Objetivos.

General.

Determinar el efecto de la hipoxia prolongada sobre los flujos de respiración y glucólisis, así como la actividad enzimática y la cantidad de proteína de las enzimas COX, α -cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y glutaminasa, además del nivel de expresión de HIF-1 α y p53, en dos líneas tumorales humanas, MCF-7 y HeLa.

Particulares.

- Establecer cultivos en monocapa de HeLa y MCF-7 en condiciones normales de tensión de oxígeno (5%CO₂ / 95% aire).
- Someter los cultivos en monocapa en condiciones de hipoxia (0.1 – 0.3% de O₂) durante 24 h.
- Determinar los flujos de la glicólisis y FO de cultivos en condiciones de normoxia e hipoxia.
- Evaluar la actividad de la COX, la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH), la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la glutaminasa. Como control se determinará la actividad de la hexocinasa (HK).
- Determinar la concentración intracelular de ADP y ATP.
- Estimar la cantidad de proteína total de COX, complejo 1 de la cadena respiratoria (ND 1), α -KGDH, PDH, glutaminasa y HK, así como de p53 y HIF-1 α .

7. Métodos.

Propagación de las líneas tumorales.

MCF-7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer cérvico uterino) fueron cultivadas con una alícuota inicial de 2×10^5 células/mL en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) enriquecido con 5% de suero fetal bovino (SFB), 200 unidades/mL de penicilina y 200 μ g/mL de estreptomina. Las condiciones de incubación fueron 37°C, 5% CO₂ y 95% aire. Se realizaron uno o dos cambios de medio por semana y las células se cosecharon al alcanzar el 90-95% de confluencia, aproximadamente al día 6 de cultivo.

Generación de hipoxia en cultivos celulares.

La hipoxia se generó en una cámara modular (Billups-Rothenberg, MIC-101, California, USA). Las placas de cultivo con medio fresco se colocaron dentro de la cámara junto con un recipiente con aproximadamente 50 mL de agua destilada (para mantener la humedad), se cerró la tapa de la cámara y se gaseó con una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de nitrógeno, durante 5-10 min a un flujo de 10-15 Lpm (flujómetro sencillo Billups-Rothenberg) hasta alcanzar una concentración de O₂ de 0.1-0.2%, lo que fue monitoreado por un sensor de oxígeno (Billups-Rothenberg). La siguiente figura muestra el sistema empleado.

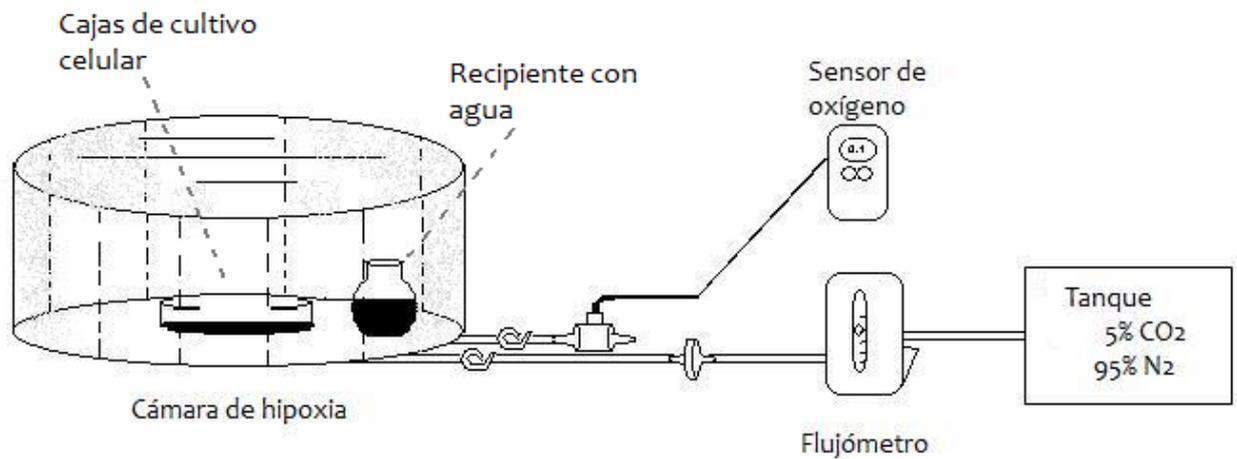


Figura 7. 1. Cámara de hipoxia

Cuando la concentración de oxígeno alcanzó 0.1 – 0.3%, se cerraron las pinzas de la cámara de hipoxia, con lo cual quedó sellada y se colocó dentro de una incubadora a 37°C, donde se mantuvieron por 20-26 h.

Para medir la concentración de oxígeno en el medio de cultivo tanto en normoxia como en hipoxia, se empleó un oxímetro con un electrodo tipo Clark. A la cámara del oxímetro con PBS se le adicionó una solución de ditionita para disminuir la concentración de oxígeno y obtener una línea inicial, después de lo cual se agregaron alícuotas (50 – 200 μL) de las muestras para obtener incrementos en la concentración de oxígeno en la cámara del oxímetro. Las muestras adicionadas al oxímetro provenientes de normoxia e hipoxia fueron tomadas de los frascos de cultivo mediante una jeringa de 1 mL. Con los diferencias obtenidas y sabiendo que el agua a 37°C tiene una concentración de oxígeno de 380 ngAO/mL (190 μM ; nmol/mL), se calcularon las concentraciones de las muestras.

Curvas de crecimiento en normoxia e hipoxia.

Se cosecharon las células de un frasco de cultivo de 25 cm² con 90% de confluencia celular usando 0.5 mL de tripsina (0.25% tripsina –EDTA, GIBCO), se suspendieron en 4 mL de PBS estéril, centrifugando posteriormente a 1500 rpm por 3 min. Las células se resuspendieron en 4 mL de DMEM y se contó el número de células viables en un hemocitómetro, usando el método de exclusión por azul tripano. Se sembraron 1.5x10⁵ células/mL en cajas de 21 cm² con DMEM. Cada 24 h se cosechó una caja y se contó el número de células y la viabilidad. Al llegar a la fase exponencial se colocaron la mitad de las cajas en la cámara en hipoxia y el resto se mantuvo en normoxia. A las 24 h se cambió el medio de cultivo y se cosecharon las células de una placa. Se repitió este procedimiento a las 48 y 72 h. Las curvas se detuvieron después de 72 horas de hipoxia.

Obtención de suspensiones celulares de HeLa y MCF-7 para medición de flujos energéticos y actividad enzimática del complejo I y IV.

Se sembraron 2-3 placas de cultivo (de 175 cm²) con una alícuota inicial de 2x10⁵ células/mL. Una vez que las placas de cultivo alcanzaron 90% de confluencia, se lavaron con buffer Ringer Krebs (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 1.4 mM CaCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, pH 7.4 ajustado con NaOH) y posteriormente se separaron las células con 2 ml de tripsina (0.25% tripsina/EDTA). Se generó una suspensión con 10 mL de Ringer y se centrifugó a 1500 rpm por 3-4 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 0.5-1 mL de

Ringer. Se midió concentración de proteína por el método de biuret (66). Las suspensiones obtenidas se usaron inmediatamente para las mediciones experimentales.

Aislamiento de mitocondrias de HeLa y MCF-7 para la medición de la actividad de α -KGDH y GA.

Las mitocondrias se aislaron mediante el método descrito por Marín-Hernández (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las células de 3-4 placas de 175 cm² con 90-95% de confluencia se cosecharon mediante el uso de rastrillo y se centrifugaron a 2500 rpm, a 4°C por 5 min. El botón se resuspendió en 1-2 mL de SHE (Sacarosa 220 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y pH 7.3), más 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 5 mM ditioneitol (DTT) y 1 mM EDTA. En un baño frío y con agitación constante se agregaron gota a gota 20 μ g de digitonina por cada miligramo de proteína. Se mantuvo agitando y se incubó en hielo durante 3 min. Se agregó el doble del volumen inicial de SHE y se centrifugó a 2500 rpm por 10 min, al finalizar se desechó el sobrenadante y el botón celular se rompió suavemente con la ayuda de un vástago. Se centrifugó a 2500rpm, por 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El procedimiento para obtener el sobrenadante se repitió dos veces más.

Los sobrenadantes recuperados se centrifugaron a 9500 rpm por 10 min a 4°C. Finalmente, el botón obtenido se resuspendió en SHE, se midió proteína por el

método de Lowry (68) y las mitocondrias se emplearon inmediatamente para la medición de actividades enzimáticas.

Medición de flujos energéticos.

Para medir el flujo de la fosforilación oxidativa y la glucólisis se emplearon suspensiones celulares frescas de ambas líneas celulares provenientes de condiciones de normoxia e hipoxia.

Fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa se midió polarográficamente registrando el consumo de oxígeno sensible a oligomicina con un electrodo tipo Clark (53).

Para el ensayo se agregaron 2.5-5 mg proteína celular/mL a la cámara de reacción, la cual contenía 1.9 mL de Ringer Krebs saturado con aire a 37°C y 5 mM de glucosa. Una vez obtenido el trazo inicial de consumo de oxígeno se adicionó 10 μ M de oligomicina. El cero químico se obtuvo reduciendo todo el oxígeno con ditionita. La figura 7.2 muestra un trazo representativo del ensayo.

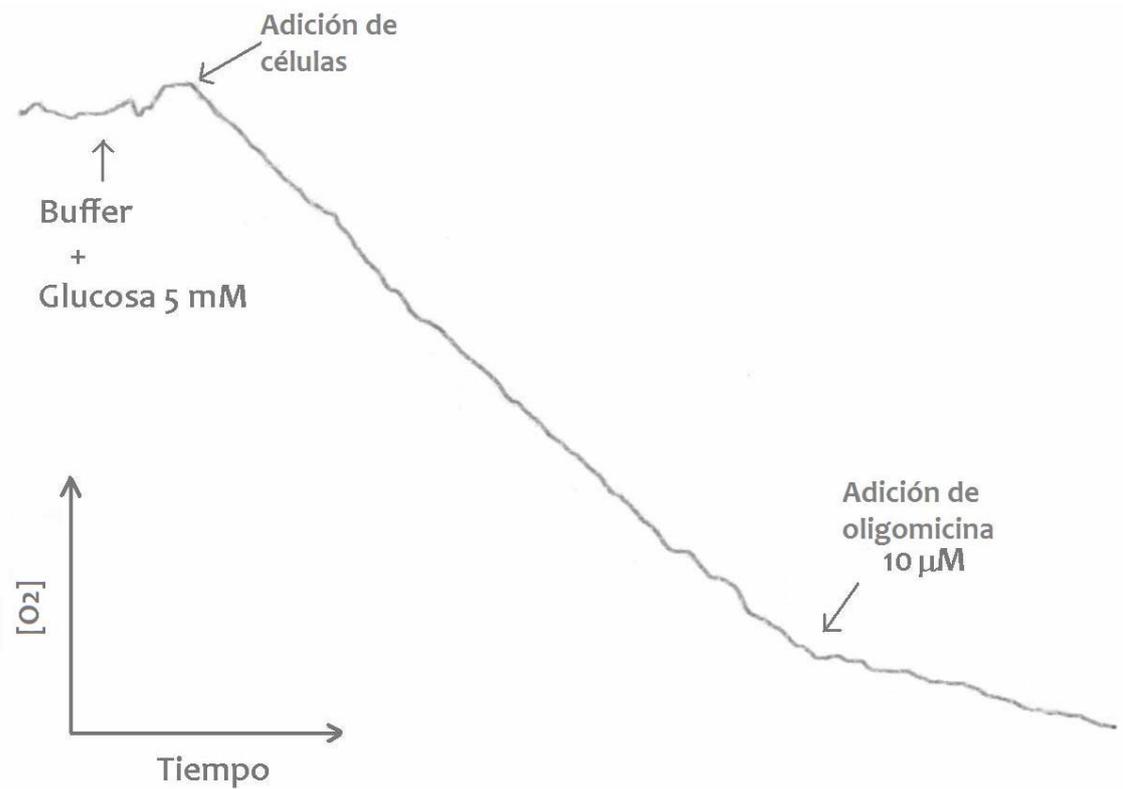


Figura 7. 2. Trazo representativo del ensayo de respiración.

Los cálculos de velocidad se realizaron considerando que a la altura de la Ciudad de México a 37°C hay disueltos 380 nano átomos gramo de oxígeno (nAtgO) por mililitro de Ringer Krebs.

Glucólisis.

En dos viales de plástico se colocaron 2-5 mg de proteína celular / mL de Ringer Krebs en un volumen total de 2.5 mL y se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) a 37°C. Después de 10 minutos de incubación se adicionó 5 mM de glucosa a uno de los viales y al otro vial se adicionó 5 mM de glucosa y 10 mM de 2DOG (2-desoxiglucosa), la cual inhibe a la HPI y permite descartar el lactato formado sin relación con la glucólisis. Al minuto 0 y al minuto 3 para HeLa y al 30 para MCF-7 se detuvo la reacción con 10% de

ácido perclórico frío. Las muestras ácidas obtenidas se neutralizaron con una solución 3M KOH y 0.1M Tris y se congelaron a -70 °C.

El lactato formado se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm mediante la aparición de NADH en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH). La reacción se muestra a continuación:

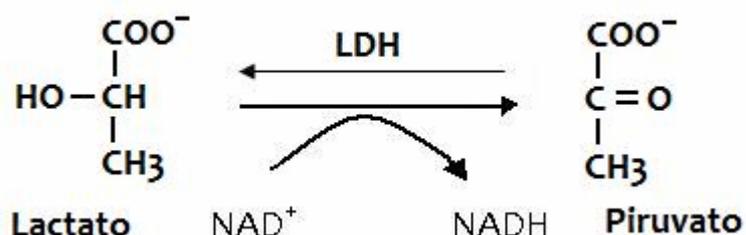


Figura 7. 3. Reacción de la LDH empleada para cuantificar lactato. Cada NADH obtenido por la enzima estequiométricamente representa un lactato consumido.

En un volumen total de 1 mL de medio hidrazina 0.4 M y glicina 0.5 M pH 9.0 se agregó 1 mM de NAD⁺ y 50 µL de una dilución 1:4 de LDH (de músculo de ratón, Roche), una vez que se obtuvo una línea basal se adicionó 20-50 µL de muestra ácida neutralizada. La velocidad de glucólisis se calculó por la diferencia de absorbancias, el coeficiente de extinción molar del NADH (6.22 mM⁻¹) y el tiempo de reacción (69).

Medición de actividades enzimáticas

Complejo I o NADH deshidrogenasa (ND).

La actividad de este complejo se midió en células completas permeabilizadas por descongelación, cuantificando espectrofotométricamente la reducción del 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm.

La reacción se realizó en un cuveta con 1 mL de buffer (sacarosa 0.25 mM, EDTA 1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7.4), 20 µg/mL de proteína, KCN 2 mM, antimicina 1 µM, DCIP 10 µM y comenzando la reacción con 100 µM de NADH.

Se empleó rotenona 2 µM para descartar la reducción del DCIP por reacciones espúreas.

Citocromo oxidasa (COX).

Para medir esta actividad se usaron suspensiones de células completas, cuantificando polarográficamente el consumo de oxígeno con un electrodo tipo Clark y usando citocromo C (cit C) como sustrato en presencia de *N, N, N', N'*-tetrametil-*p*-fenilenediamina (TMPD) y ascorbato como donadores de electrones para la reacción.

A la cámara de reacción a 37°C, con un volumen total de 1.9 mL con KME (KCl 125 mM, MOPS 20 mM y EGTA 1 mM) saturado con aire, se adicionó 5 mM ascórbico, 70-90 µM cit C, 0.02% tritón X-100 y 1 mg proteína /mL. La reacción se inició con la adición de 2.7 mM TMPD. Para descartar el consumo de

oxígeno no relacionado con la actividad de la COX, se agregó al final del ensayo 20mM de azida y/o 1mM de cianuro (CN⁻).

Con la pendiente obtenida y sabiendo que a 37°C y a la altura de la Ciudad de México la solubilidad del es de oxígeno de 380 nAtgO/mL, se calculó la velocidad de la enzima. En la figura 7.4 se muestra un trazo representativo.



Figura 7. 4. Imagen representativa de la reacción del ensayo de la COX.

Hexocinasa (HK).

Para cuantificar la actividad de esta enzima fue necesario preparar extractos citosólicos a partir de las suspensiones de ambas líneas celulares. Los extractos se obtuvieron de la siguiente manera:

La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm por 5 min para obtener el paquete celular, el cual se resuspendió en buffer de lisis (154 µL por cada

miligramo de proteína total), que contiene 1 mM PMSF, 5 mM DTT y 1 mM EDTA en TRIS-HCl 25 mM pH 7.6.

El botón celular resuspendido se congeló en nitrógeno líquido e inmediatamente se descongeló en un baño a 37°C. El ciclo de congelación/descongelación se repitió dos veces más. El lisado celular se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante (extracto citosólico), el cual se usó inmediatamente o se congeló con glicerol al 10%. El extracto congelado conservó entre el 80 y el 90% de la actividad del extracto fresco.

La velocidad de la enzima se cuantificó espectrofotométricamente por la generación de NADPH, en una reacción acoplada a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (figura 7.5).

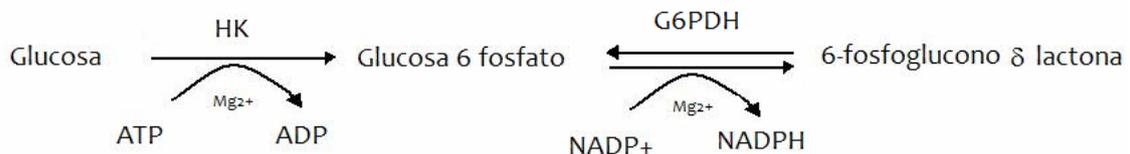


Figura 7. 5. Reacción de la HK de extractos citosólicos, acoplada a G6PDH comercial. La actividad se cuantifica por la aparición de NADH.

En una cuveta con 1 mL de KME, 2 U (10 μ L de dilución 1:10) de G6PDH (1000U, *Leuconostoc mesenteroides*, Roche), 1 mM NADP⁺, 15 mM MgCl₂ y 10 mM ATP se agregó 0.3 – 0.7 mg de extracto citosólico. La reacción se inició con 3 mM glucosa, concentración suficiente para alcanzar la máxima velocidad de reacción.

La velocidad de la enzima se determinó calculando la pendiente inicial y utilizando el coeficiente de extinción molar del NADPH (6.22 mM^{-1}).

Medición de actividades enzimáticas de α -KGDH, PDH y GA.

Para medir la actividad de las enzimas se emplearon mitocondrias frescas aisladas a partir de las líneas celulares MCF-7 y HeLa expuestas a condiciones de normoxia e hipoxia.

α -cetoglutarato Deshidrogenasa (α -KGDH).

La actividad de la α -KGDH se midió en un fluorurómetro, cuantificando la formación de NADH a una longitud de onda de 340 nm de excitación y 460 nm de emisión.

En 2 mL de KME a 37°C y con agitación constante, se adicionó 1 mM DTT, 4 μM Rotenona, 0.01% tritón, 1 mM tiamina pirofosfato (TPP), 0.4 mM NAD^+ , 0.5 mM Coenzima A (CoA), 15 mM P_i , 15 mM MgCl_2 y mitocondrias (0.1-0.25 mg/mL). La mezcla se incubó hasta obtener una línea basal y se inició la reacción adicionando 10 mM de α -KG. Para verificar que la reacción fuera específica, se emplearon cuvetas sin CoA y se observó que no hubo reacción al agregar α -KG (ver figura 7.6).

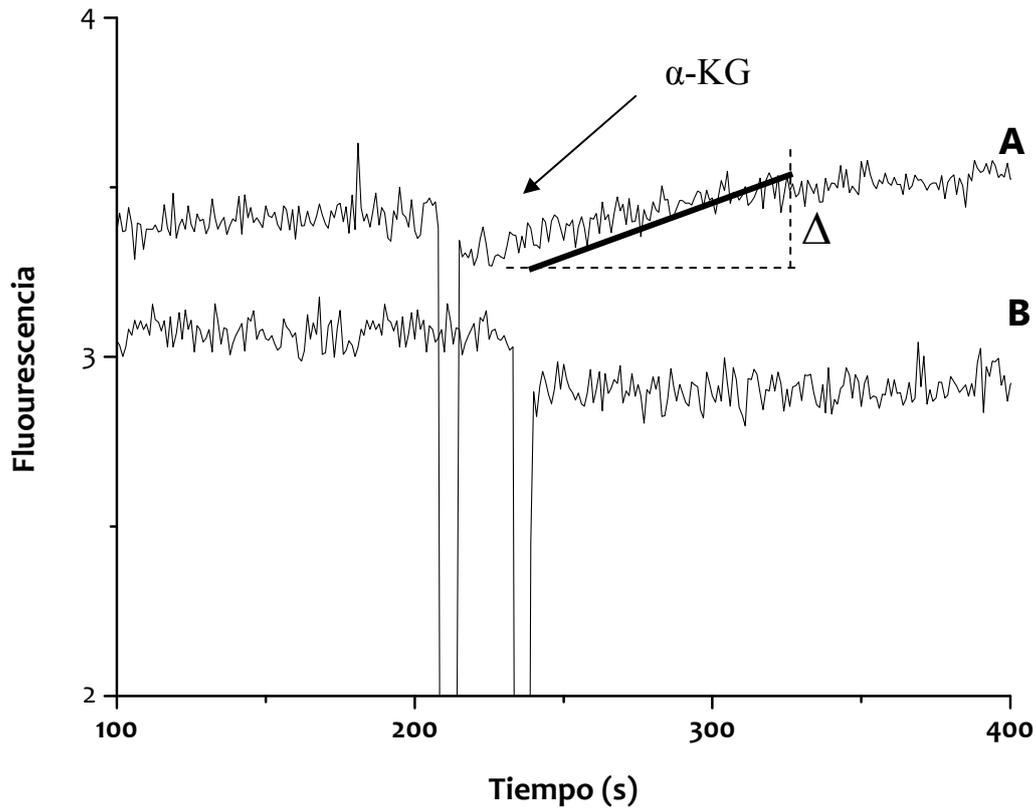


Figura 7. 6. Ejemplo del ensayo de la reacción de la α -KGDH. A. La adición de α -KG genera un incremento en la fluorescencia. B. Control sin CoA.

Δ = incremento de la fluorescencia debido a la reacción.

La actividad de la enzima se calculó con la pendiente obtenida y calibrando la señal de fluorescencia con concentraciones conocidas de NADH (70).

Piruvato Deshidrogenasa (PDH).

La actividad de la PDH se midió fluorométricamente a 340 nm de excitación y 460 nm de emisión. En 2 mL de KME a 37 °C se añadió 0.2 mM TPP, 1 mM DTT, 4 μ M rotenona, 0.01% tritón X-100, 5 mM NAD^+ , 5 mM MgCl_2 , 0.4 mM AMP, 0.1 mM CoA y 0.25 mg/mL de mitocondrias. Después de obtener una

línea basal con la mezcla anterior, se inició la reacción con 0.3 mM de piruvato (71).

Glutaminasa (GA).

La actividad de la GA se determinó colorimétricamente con la formación de un compuesto de amonio con *o*-phtalaldehído (OPA) y β -mercaptoetanol.

En un tubo cónico de 1.5 mL se colocaron 300 μ L de la mezcla de reacción (100 mM KH_2PO_4 , 80 mM glutamina, 1.5 mM NH_4Cl , 0.01% tritón X-100, 10% etilenglicol, pH 8.0) y 1.5 mg/mL de mitocondrias. Se incubó a 37°C con agitación constante de 150 rpm durante 30 min. La reacción se detuvo con 10% de ácido perclórico y se mantuvo en frío durante 15 min. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 3 min. Se tomaron 50 μ L de los sobrenadantes y se mezclaron con 1.5 mL del reactivo OPA – β -mercaptoetanol (0.56 mL de β -mercaptoetanol 72 mM en etanol, 0.56 mL de 186 mM OPA en etanol y 10 mL de fosfato de potasio 0.2 M, pH 7.4).

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad durante 45 min y se midió su absorbancia a 410 nm. La concentración de amonio se calculó interpolando en curvas de calibración (0, 50-300 μ M amonio). En la figura 7.7 se muestra una curva de calibración típica.

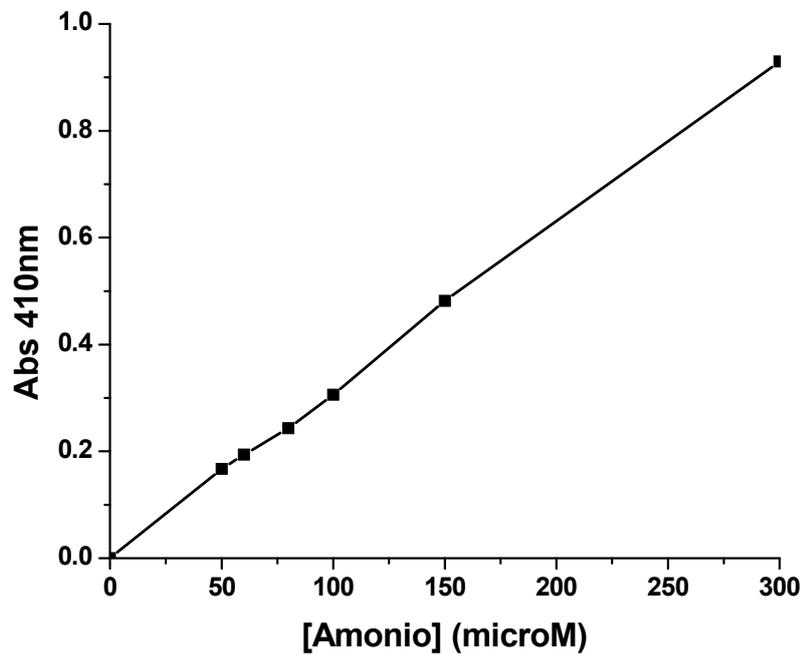


Figura 7. 7. Curva de calibración representativa para el ensayo de la GA.

El método requirió el uso de blancos, los cuáles se prepararon incubando a las mitocondrias y a la mezcla de reacción por separado, y mezclándolos después de agregar el ácido perclórico (72).

Cuantificación de ATP.

El ATP se midió espectrofotométricamente con la formación de NADPH ($\epsilon = 6.22\text{mM}^{-1}$), en una reacción catalizada por HK comercial (1500 U, levadura, Roche) y acoplada con G6PDH y extractos ácidos neutralizados (ver figura 5.3).

En cuvetas de cuarzo de 2 mL se agregó 1 mM NADP⁺, 5 mM MgCl₂, 5 mM de glucosa, 150-300 µL de extracto y el volumen necesario de medio (50 mM HEPES, 1 mM EGTA pH 7.4) para alcanzar 2 mL. Se adicionó 1 U de G6PDH y posteriormente se agregó 1U (10 µL de dilución 1:10) de HK (73).

Inmunoensayos.

Los extractos de proteína empleados para los inmuno ensayos se obtuvieron por tres procedimientos.

Proteína total con RIPA para revelar ND I, GA y PDH.

Se cosecharon las células de un frasco de cultivo de 25 cm² con 90% de confluencia (5×10^6 células) y se centrifugaron a 1000 rpm por 3 min. Se resuspendió el botón celular con 250 µL de RIPA (IGEPAL NP40 1%, desoxicolato de Na 0.5%, SDS 0.1% en PBS 1x) y 1 mM de PMSF, rompiendo las células con 20 pases a través de una jeringa para insulina (1 mL) (74). Se agregó 2 mM más de PMSF, se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se congeló a -20°C hasta su uso.

Proteína total por Laemmli para revelar KH II, COX IV y α -KGDH.

Se cosecharon las células de un frasco de cultivo de 25 cm² con 90% de confluencia (5 x10⁶ células) y se centrifugaron a 1000 rpm por 3 min, resuspendiendo el paquete celular en 100 – 250 μ L de buffer de lisis (Tris-HCl 62 mM, pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.001%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10%) y 1 mM de PMSF. Se rompieron las células con 20 pases a través de una jeringa para insulina (1 mL) y se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 min (75). El sobrenadante se recuperó y congeló a -20 °C hasta su empleo.

Proteína de extractos nucleares para revelar HIF-1 α y p53.

Se cosecharon las células de un frasco de cultivo de 25 cm² con 90% de confluencia (5 x10⁶ células) y se centrifugaron a 1000 rpm por 3 min. El botón celular se mezcló con 300 μ L de Hepes 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM y se incubó 15 min en hielo. Se agregaron 7-15 μ L de NP40 al 10% e inmediatamente se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El botón (enriquecido nuclear) se disolvió pipeteando vigorosamente en 100 μ L de Hepes pH 7.5 25 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2 μ M, glicerol 20%. Se incubó 30 minutos en hielo y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos (76). El sobrenadante se congeló a -20°C hasta su empleo.

Western Blot

Las muestras obtenidas se separaron en condiciones desnaturizantes por SDS-PAGE (electroforesis en geles de poliacrilamida) al 10 o 12.5%. Las proteínas fueron transferidas (250 V, 297 mA) a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Una vez hecha la transferencia, la membrana fue

incubada con 5% de leche libre de grasa y 0.1% Tween-20 en TBS 1x (TBS 10x: Tris 0.5 M pH 7.5, NaCl 1.5 M en agua) por una hora y se incubó con el anticuerpo primario (1:1000 en leche).

Los anticuerpos usados fueron α -tubulina (B-7), α -KGDH (E-15), HIF-1 α (HI1 α 67), HKII (C14) y PDH-E1 α (9H9) de SantaCruz Biotech, p53 (Ab-3) de Calbiochem, GA (GLS) de Abnova y COX IV (3EII) de Cell Signaling.

El anticuerpo primario se incubó durante 1 h a temperatura ambiente o bien, durante toda la noche en refrigeración (4-8 °C). Posteriormente, se lavó la membrana con TBS 1x – Tween-20 y se incubó con el anticuerpo secundario por una hora más. Se lavó durante dos horas con TBS 1x- Tween- 20, se añadió la solución de quimioluminiscencia (Amersham ECL Plus) y se reveló usando papel fotográfico (Kodak).

Las bandas obtenidas se analizaron por densitometría usando el programa Scion image para Windows (Beta 4.0.3, Scion Corporation).

Análisis estadístico.

A partir de los resultados obtenidos se calculó la media y la desviación estándar. La significancia ($p < 0.05$) se determinó por un análisis t - Student usando el programa Microcal Origin (Microcal Software, Inc).

8. Resultados.

Condiciones de hipoxia.

La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo donde se expusieron las células durante 24 h en normoxia (20% de O₂) y en hipoxia (0.1 – 0.3% O₂) se midió polarográficamente con un electrodo de O₂ tipo Clark (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Concentraciones de oxígeno medidas en el medio de cultivo.

Normoxia	Hipoxia
(μM)	
119 ± 5 (4)	20 (2)

Resultados muestran promedio ± D.E. En paréntesis el número de repeticiones.

La hipoxia redujo al 80% la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo . Las concentraciones medidas en hipoxia se encuentran dentro del intervalo reportado en diferentes tumores (ver tabla 4.1, introducción) que va de 1 a 40 μM.

Crecimiento celular en normoxia e hipoxia.

Se determinó el efecto de la hipoxia sobre la proliferación celular, para lo cual se construyeron curvas de crecimiento. Los cultivos de ambas líneas celulares iniciaron con una alícuota de 2×10^5 células/mL y se incubaron inicialmente en normoxia para permitir que las células se adhirieran a la superficie de las

placas y comenzaran su proliferación. Al inicio de la fase exponencial (día 3) las células se dividieron en dos grupos, uno de ellos se mantuvo en normoxia y el otro se sometió a hipoxia. De esta manera fue posible comparar la velocidad de proliferación del mismo cultivo en dos concentraciones de oxígeno diferentes (Figura 8.1).

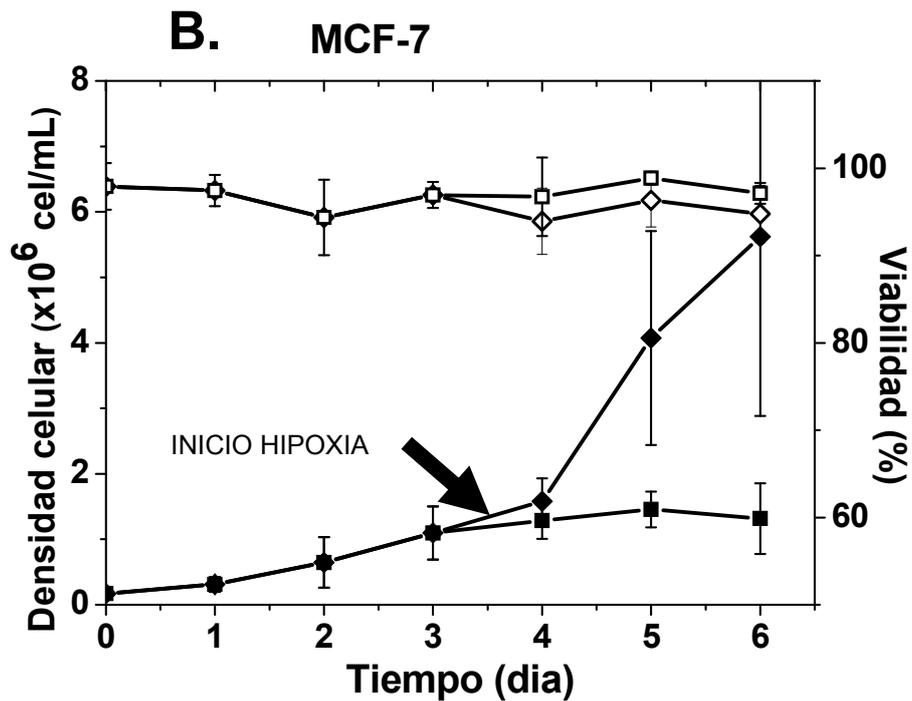
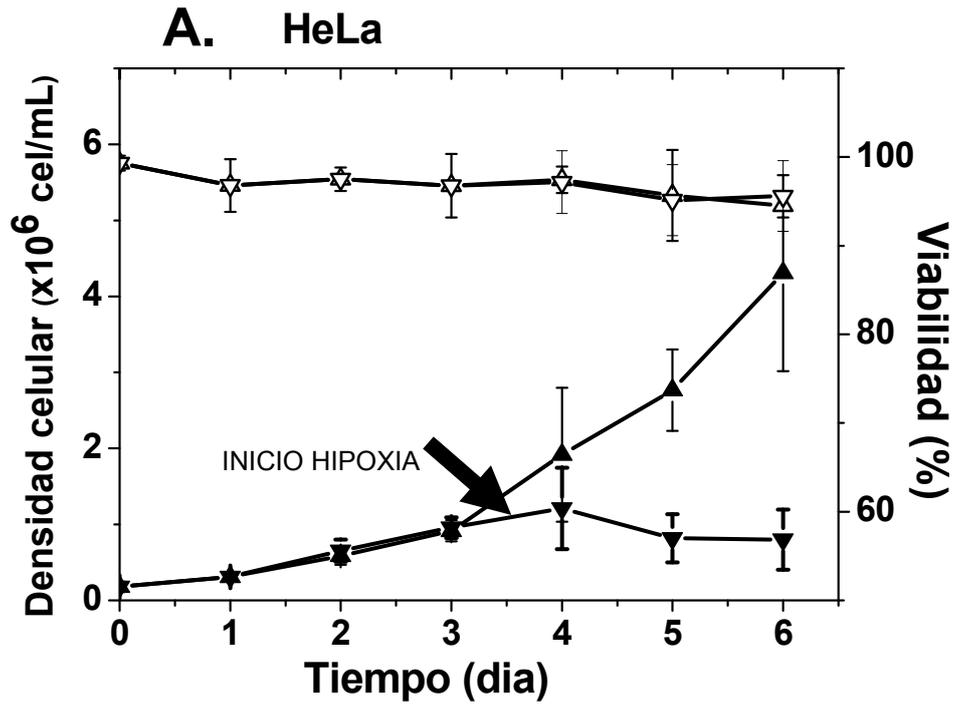


Figura 8. 1. Crecimiento y viabilidad celular en normoxia y en hipoxia.
A. HeLa. Densidad celular (▲) y viabilidad (Δ) en normoxia; densidad (▼) y viabilidad (▽) en hipoxia. **B. MCF-7** Densidad celular (◆) y viabilidad (◇) en normoxia; concentración (■) y viabilidad (□) en hipoxia.
 La flecha en ambas gráficas indica el inicio de la hipoxia.
 (n=3. Los puntos representan el promedio ± desviación estándar).

A partir de los datos obtenidos se calculó la velocidad de proliferación celular en normoxia que fue de 0.55 ± 0.07 generaciones/día para HeLa y de 0.97 ± 0.2 generaciones/día en MCF-7. Después de 24 horas de hipoxia (día 4) la proliferación de HeLa se detuvo y a las 48 horas (día 5) la población se redujo 40%. De igual manera, MCF-7 detuvo su crecimiento en las primeras 24 h de hipoxia (día 4) y la población celular disminuyó a las 72 h (día 6).

Tanto en normoxia como en hipoxia, la viabilidad se mantuvo mayor al 90% en las dos líneas celulares.

Vías energéticas

Glucólisis.

Después de 24 h de hipoxia, las dos líneas celulares incrementaron la velocidad de glucólisis. En HeLa el aumento fue de 5.5 veces, y en MCF-7 fue de 3.7 veces (Tabla 8.2).

Tabla 8.2. Velocidades de glucólisis en normoxia e hipoxia.

	MCF-7*	HeLa*
	(nmol/min•mg proteína)	
Normoxia	3.5 ± 2 (4)	4.4 ± 2 (4)
Hipoxia	13 ± 1 (4)	24 ± 10 (5)

Valores corregidos con 2-DOG.

Los valores indican el promedio de las mediciones \pm desviación estándar.

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

*p > 0.1

Cabe mencionar que el $57 \pm 10\%$ de la glucólisis de MCF-7 en hipoxia no fue sensible a 2-DOG, es decir, más del 50% del lactato que formaron no provino de la glucosa adicionada a la cuveta de reacción, lo que sugiere un aporte

importante de otras rutas. En cambio, del 70 al 100% del lactato generado por MCF-7 en normoxia y por HeLa en ambas condiciones, provino del metabolismo de la glucosa externa.

Fosforilación oxidativa.

La velocidad de fosforilación oxidativa (FO) se midió en células intactas, agregando 5 mM de glucosa para mantener las mismas condiciones fisiológicas en las que se midió la glucólisis.

La respiración de HeLa no se afectó por hipoxia y en cambio, la respiración de MCF-7 disminuyó 4.1 veces (Tabla 8.3).

Tabla 8.3. FO de las líneas celulares en normoxia e hipoxia.

	MCF-7*	HeLa**
	(nAtgO/min•mg proteína)	
Normoxia	14 ± 3 (7)	5.8 ± 1 (4)
Hipoxia	3.4 ± 1 (5)	4 ± 1.7 (4)

Los valores indican el promedio de las mediciones ± desviación estándar.

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

*p < 0.01 **p > 0.1

Es importante resaltar que la FO en normoxia, tanto de HeLa como de MCF-7, fue >85% sensible a oligomicina (10 μM), un inhibidor de la ATP sintasa, por lo que prácticamente todo el oxígeno consumido por las células fue mitocondrial y se utilizó para sintetizar ATP. En hipoxia la sensibilidad al inhibidor disminuyó hasta el 50%, es decir, incrementó el consumo de oxígeno por enzimas o procesos no relacionados con la generación de energía. Por otra parte, se

observó que la adición de 5 mM de glucosa inducía una disminución máxima del 31% a la FO de MCF-7 en hipoxia y del 56% en HeLa en normoxia (tabla 8.4).

Tabla 8.4. Inhibición de la FO por adición de 5mM de glucosa.

	MCF-7		HeLa	
	(-) glucosa	(+) glucosa	(-) glucosa	(+) glucosa
Normoxia	15 ± 6 (7)	14 ± 3 (7)	10 ± 5 (7)	5.8 ± 1 (4)
Hipoxia	5 ± 2 (5)	3.4 ± 1 (5)	5 ± 1.8 (4)	4 ± 1.7 (4)

Las unidades de los valores son nAtgO/min·mg proteína.

Los valores indican el promedio de las mediciones ± desviación estándar.

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

Esta inhibición es el llamado efecto Crabtree, en el cual la glucosa o la fructosa disminuyen a la FO (77).

Concentración de ATP.

Siendo la glucólisis y la FO las rutas proveedoras de energía, se analizó el efecto de la hipoxia sobre los niveles de ATP intracelular.

Para conocer cual de las rutas aportó mayor cantidad de ATP a la célula se calculó el ATP proveniente de cada vía, tomando en cuenta que por cada lactato formado por glucólisis se obtiene una molécula de ATP y por cada átomo gramo de O₂ (nAtgO) consumido en la FO se producen 2.5 moles de ATP. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 8.5. Cálculos del ATP generado por las rutas energéticas en ambas líneas celulares.

	Glucólisis	FO	Total	Aporte FO
	(nmol/ min•mg de proteína)			(%)
	MCF-7			
Normoxia	3.5 ± 2	35 ± 7.5	38.5	91
Hipoxia	13 ± 1	8.5 ± 2.5	21.5	40
	HeLa			
Normoxia	4.4 ± 2	14.5 ± 2.5	18.9	77
Hipoxia	24 ± 10	9.8 ± 4.3	33.8	29

Los valores indican el promedio ± desviación estándar.
El total y el aporte (%) de la FO se calcularon con base en el promedio.

Estos datos indican que ambas líneas tumorales obtuvieron la mayor parte de su energía (91 y 77%) de la FO en condiciones de normoxia. En cambio, en hipoxia el aporte energético de la FO disminuyó considerablemente, mostrando que en esta condición su fuente principal de ATP fue la glucólisis, aportando el 60% para MCF-7 y el 71% para HeLa. Resalta el hecho de que MCF7 en hipoxia produjo el 55% del ATP que produjo en normoxia (21.5 contra 38.5 nmol/min•mg proteína). Por el contrario, en HeLa la síntesis neta calculada de ATP incrementó casi al doble en hipoxia (18.9 a 33.8 nmol/min•mg de proteína).

Con el fin de conocer la cantidad real de ATP, se midió su concentración intracelular en extractos ácidos.

Tabla 8.6. Concentración de ATP intracelular.

	MCF-7	HeLa
	(nmol/mg prot.)	
Normoxia	15 ± 3 (5)	15 ± 5 (5)
Hipoxia	13 ± 7 (5)	12 ± 2 (5)

Los valores indican el promedio de las mediciones ± desviación estándar.
Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.
Ambas líneas p > 0.1

No se observa ningún cambio neto estadísticamente significativo en los niveles de ATP debido a la hipoxia.

Actividad y expresión enzimática en normoxia e hipoxia.

Se realizaron mediciones de las actividades y contenido de proteína de enzimas importantes de la glucólisis y la FO para evaluar si los cambios observados en estas vías energéticas fueron un reflejo de cambios en las enzimas que las integran.

Hexocinasa

La hipoxia duplicó la actividad de la hexocinasa citosólica de HeLa en comparación con la de normoxia. En MCF-7, la hipoxia no modificó significativamente la actividad de la HK, aunque se observa una tendencia del 40% del aumento de la actividad enzimática.

Tabla 8.7. Actividad de HK en extractos citosólicos.

	MCF-7	HeLa
	(mU/mg)	
Normoxia	64 ± 11 (4)*	60 ± 10 (5)**
Hipoxia	89 ± 33 (4)	120 ± 29 (3)

Los valores indican el promedio de las mediciones \pm desviación estándar.

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

*p > 0.1 **p < 0.01

Los niveles de proteína de hexocinasa se analizaron por inmunoensayos. Para ello, se emplearon anticuerpos anti-HK II. Existen cuatro isoformas de la HK en mamíferos HK I – IV (revisado en 43), pero está descrito que la isoenzima II es la que preferentemente se incrementa en las células tumorales (revisado en 69) (Figura 8.2-A).

Para comparar las bandas obtenidas con los western blots, se realizó una doble normalización en la cual los valores de pixeles de cada banda se dividieron entre los pixeles del control de carga (α -tubulina) y finalmente, se calculó un porcentaje, considerando a la banda de normoxia como el 100%.

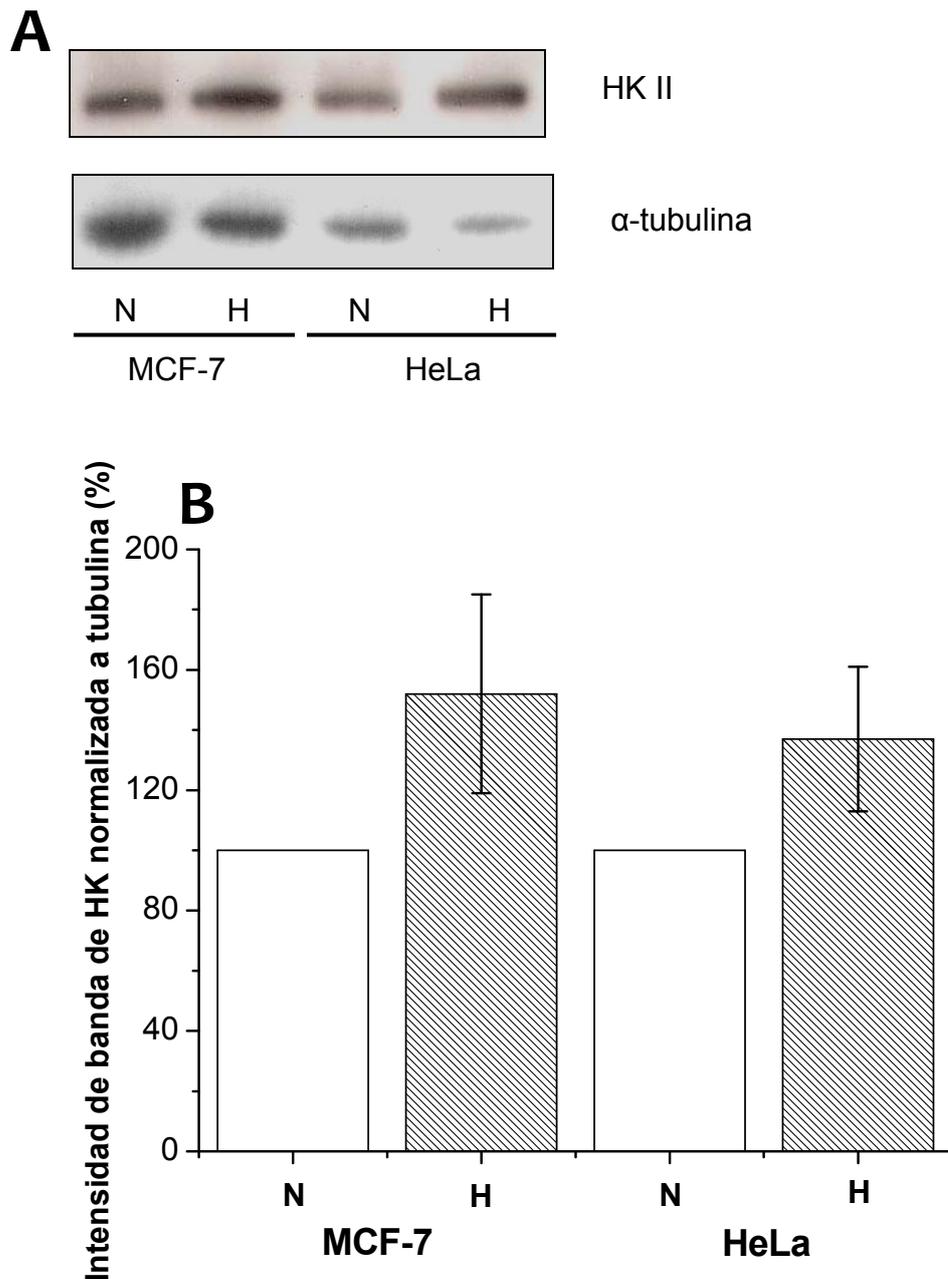


Figura 8. 2. Western blot de HK II en las MCF-7 y HeLa en condiciones de normoxia (N, $102 \pm 20 \mu\text{M}$) e hipoxia (H, $20 \mu\text{M}$). **A.** Imagen representativa del ensayo. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas ($n=3$). Se muestra el promedio de los resultados \pm desviación estándar ($p= 0.05$ en ambas líneas).

El análisis reveló que en MCF-7 la cantidad de proteína de la isoforma II de la HK aumentó en promedio 52%, siendo proporcional al aumento observado en

la actividad enzimática. Por el contrario, en HeLa no se encontró correlación, pues la proteína de HK II se incrementó 37% pero la actividad enzimática se duplicó, por lo que la mayor parte de la actividad de hexocinasa debe recaer en otra isoforma.

Complejo I (NADH deshidrogenasa).

Los ensayos enzimáticos y los inmuno-blots revelaron que la actividad y cantidad de proteína fue constante en ambas condiciones de oxígeno.

Tabla 8.8. Velocidad del complejo de la NADH deshidrogenasa.

	MCF-7	HeLa
	(mU/mg)	
Normoxia	41.5 (1)	61.4 (1)
Hipoxia	42.7 (1)	60 (1)

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

Los datos muestran que no hay cambio en la actividad de la enzima después de 24 h de hipoxia. A pesar de que la actividad de este complejo sólo se midió una vez, los resultados se sustentan con el análisis de la proteína por “western blot”.

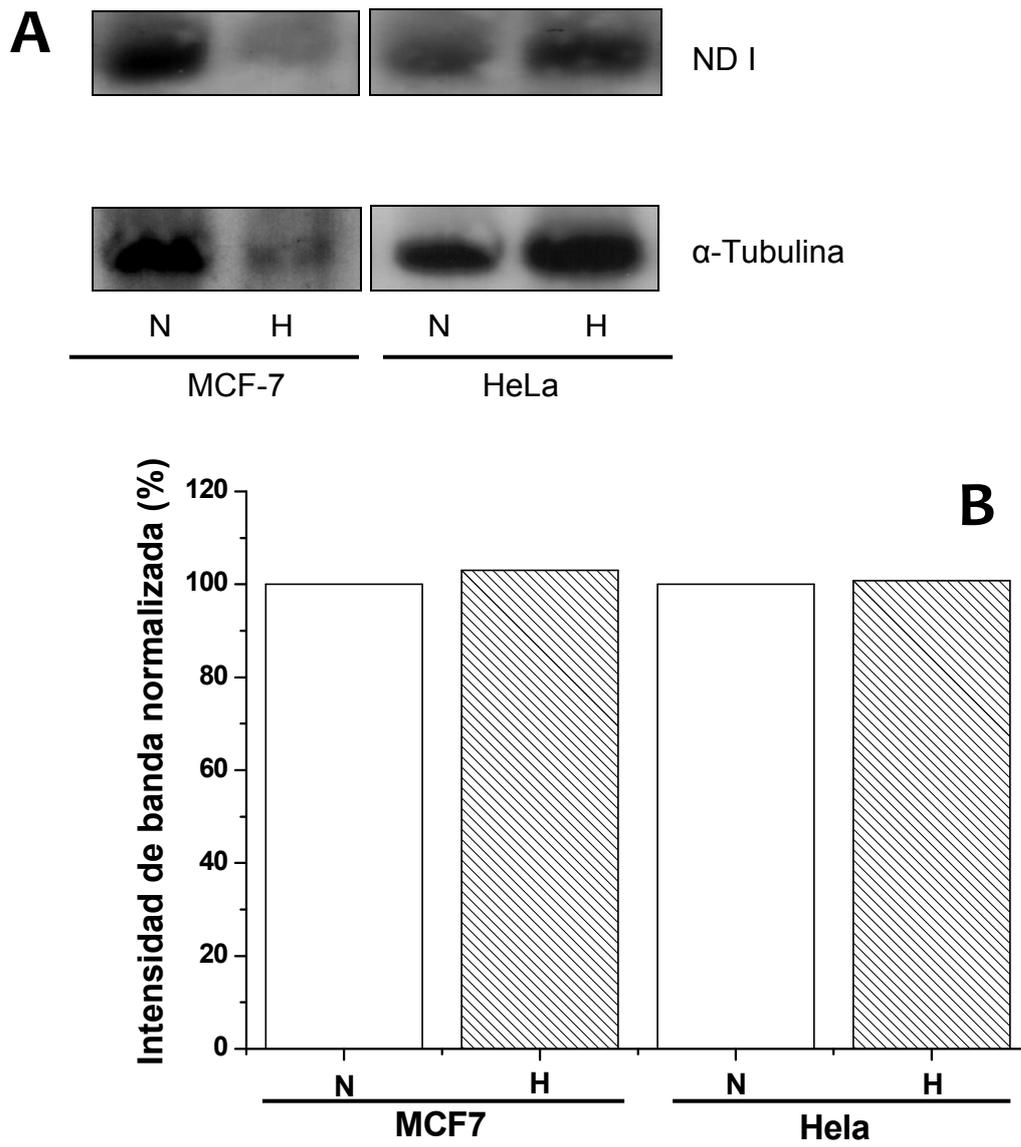


Figura 8. 3. Inmunoensayos tipo Western blot de la subunidad I del complejo I (ND I). **A.** Imagen representativa. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas. n=2

Citocromo Oxidasa (COX).

De la misma manera que con el complejo I, la actividad y el contenido de proteína del complejo IV no se modificó por hipoxia (tabla 8.8 y figura 8.4).

Tabla 8.9. Actividad de la COX en cultivos en normoxia e hipoxia.

	MCF-7	HeLa
	(nAtgO/min*mg)	
Normoxia	20 ± 5 (5)	25.2 ± 3 (5)
Hipoxia	17 ± 1.4 (3)	22 ± 9 (3)

Los valores indican el promedio de las mediciones ± desviación estándar. Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas. Ambas líneas: $p > 0.5$ = no significativo

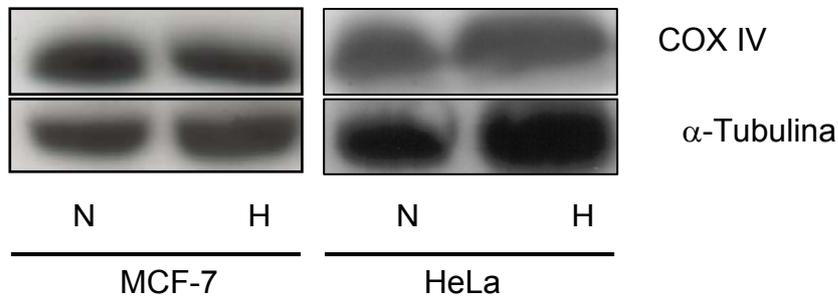
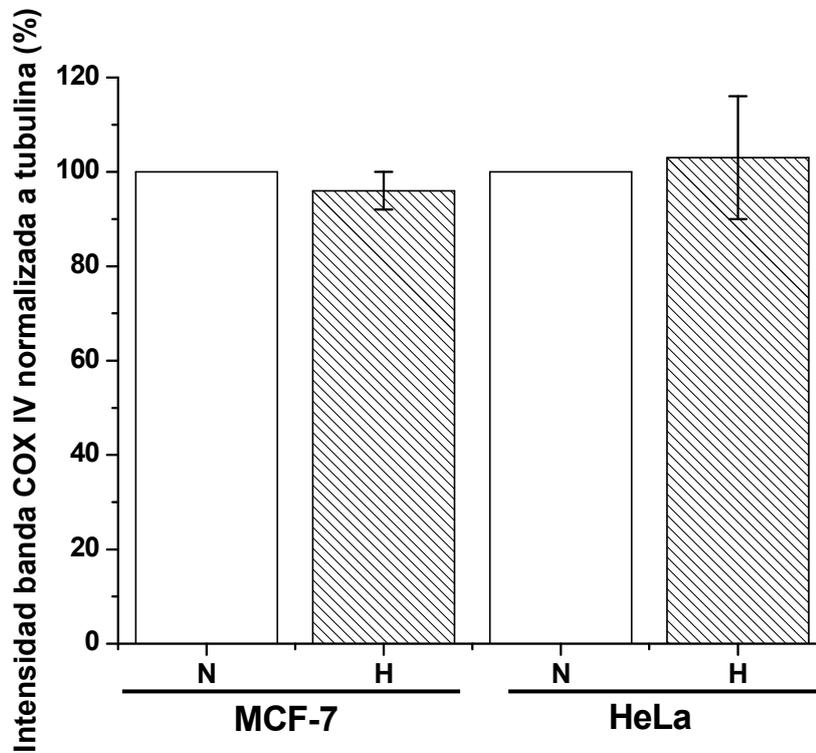
A**B**

Figura 8. 4. Western blot de la subunidad IV de la COX en las células en condiciones de normoxia (N, $102 \pm 20 \mu\text{M}$) e hipoxia (H, $20 \mu\text{M}$). **A**. Imagen representativa de los ensayos **B**. Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas ($n=3$). Se muestra el promedio de los resultados \pm desviación estándar.

A pesar de que la hipoxia no afectó la actividad de la COX ni de la NADH deshidrogenasa, la respiración celular de MCF-7 disminuyó considerablemente,

sugiriendo que el blanco mitocondrial de la hipoxia se encuentra en otras enzimas. Por lo tanto, se analizó la actividad y cantidad de proteína de la PDH, la α -KGDH y la GA.

Piruvato Deshidrogenasa (PDH)

Para medir la velocidad de la PDH se emplearon mitocondrias aisladas de MCF-7 y HeLa, pero no se detectó actividad enzimática. Como control, se ensayó la técnica en mitocondrias de riñón de rata y se observó formación de NADH a una velocidad de 62 mU/mg cercana a la reportada de 44.4mU/mg (78). Por tanto, se concluyó que aunque la técnica permite medir la actividad de la enzima, ésta es indetectable en las mitocondrias de MCF-7 y HeLa, tanto normóxicas como hipóxicas (Figura 8.5).

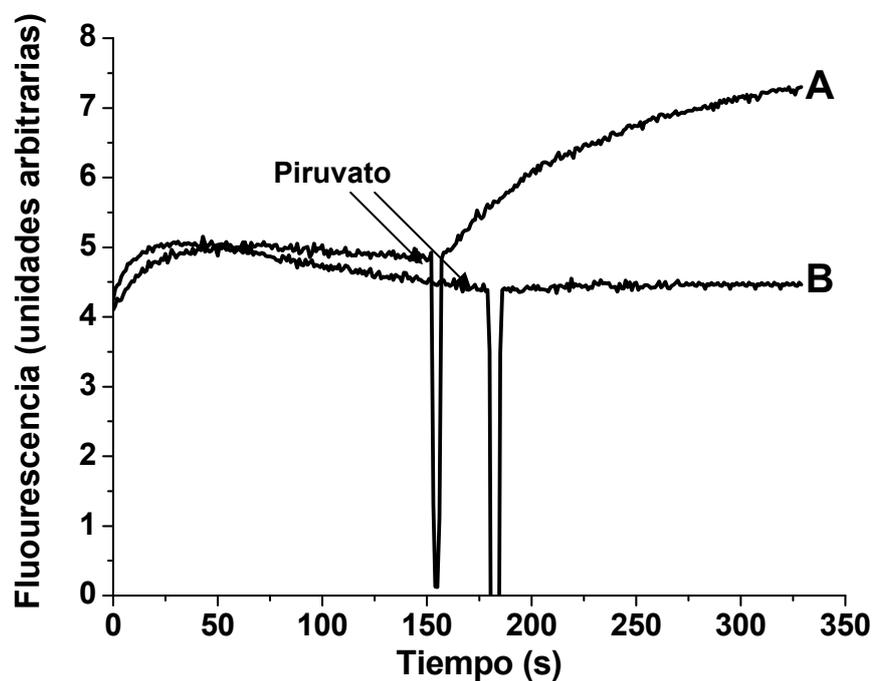


Figura 8. 5. Ensayos de la actividad de la PDH en mitocondrias. **A.** Ensayo en mitocondrias de riñón de rata. **B.** Ensayo en mitocondrias de las líneas celulares. La flecha indica la adición de piruvato para iniciar la reacción.

No obstante que la actividad de la PDH no fue detectable, la proteína se reveló por inmunoblots y se encontró constante aún después de la hipoxia prolongada (Figura 8.6).

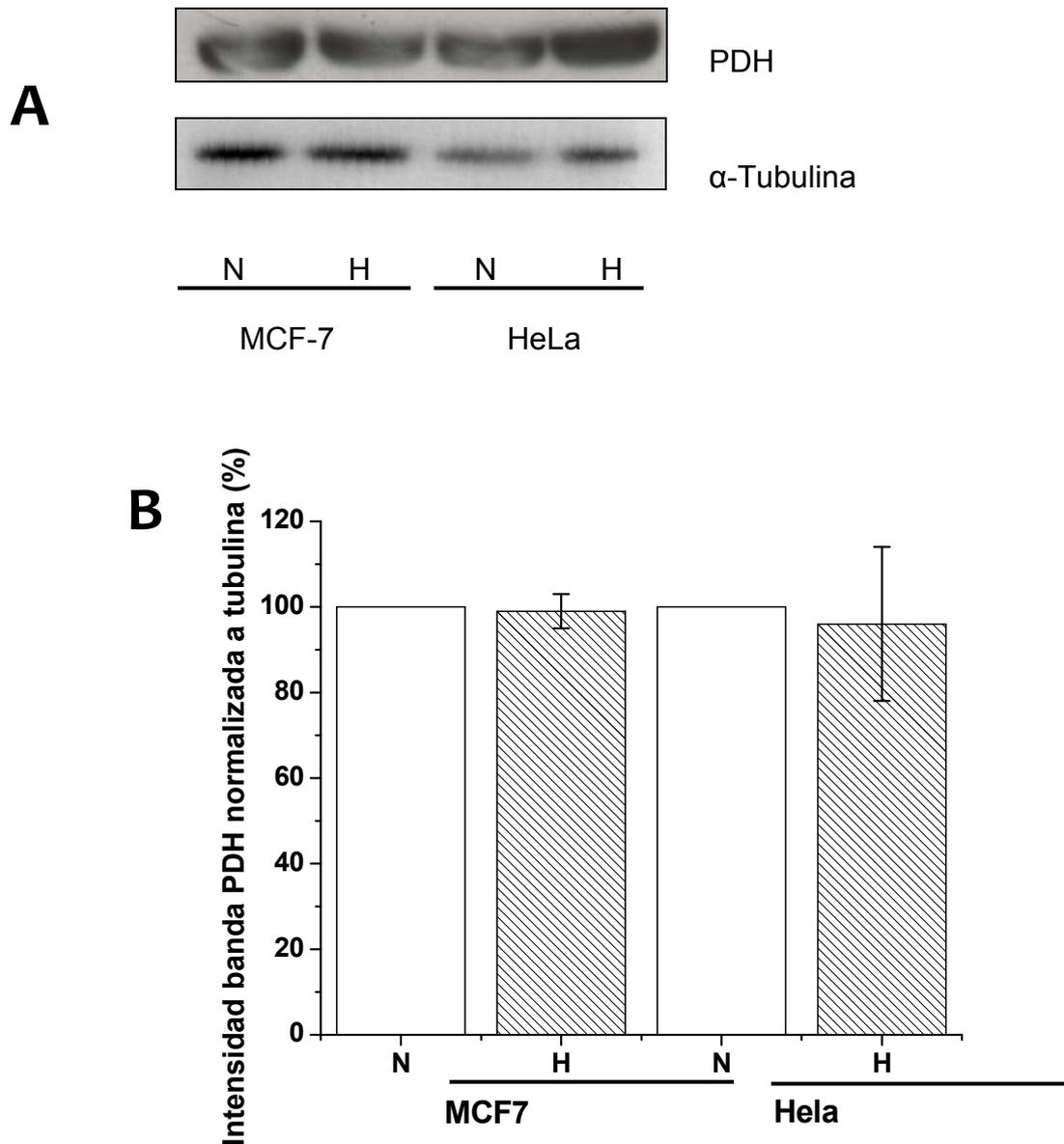


Figura 8. 6. Análisis por western blot de la PDH en MCF-7 y HeLa. **A.** Imagen representativa del ensayo. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=3). N: normoxia; H: hipoxia. Se muestra el promedio de los resultados \pm desviación estándar.

α -cetoglutarato Deshidrogenasa (α -KGDH)

La α -KGDH es un complejo multienzimático y es una de las deshidrogenasas que controlan el flujo del ciclo de Krebs ya que es altamente regulable por diversos factores como la relación NADH/NAD^+ , y la concentración de ADP, ATP, GTP, Mg^{2+} y Ca^{2+} , entre otros (70). Esta enzima cataliza la reacción de conversión del α -cetoglutarato en succinil-CoA, lo cual genera NADH y CO_2 (Figura 8.7).

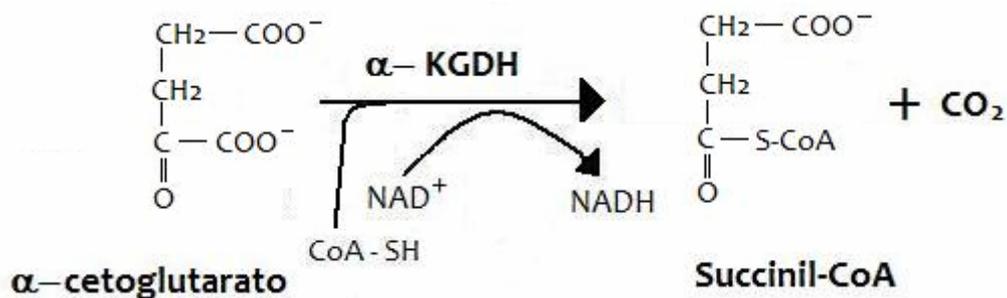


Figura 8. 7. Reacción catalizada por la α -KGDH. El complejo de la α -KGDH requiere de coenzima A como cofactor y además de succinil-CoA genera CO_2 .

En MCF-7 la hipoxia disminuyó en 60% la actividad de la enzima (Tabla 8.8). En comparación con MCF-7, la actividad de la α -KGDH de HeLa en condiciones normóxicas fue 50% menor. Estos valores se encontraron en el límite de detección del equipo, por ello sólo logró medirse en dos ocasiones. En hipoxia fue indetectable (Figura 8.8 B).

Tabla 8.10. Velocidad del complejo de la α -KGDH en MCF-7 y HeLa.

	MCF-7	HeLa
	(mU/mg)	
Normoxia	4.8 ± 0.2 (3)	2.8 (2)
Hipoxia	1.6 ± 1 (3)	N.D.

N.D. = No detectada

Los valores indican el promedio de las mediciones \pm desviación estándar.

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

MCF-7: $p < 0.01$

Los inmunoblots mostraron que no hay una correlación entre la disminución de la actividad y la cantidad de proteína, ya que ésta última se mantuvo constante después de la hipoxia prolongada (Figura 8.8).

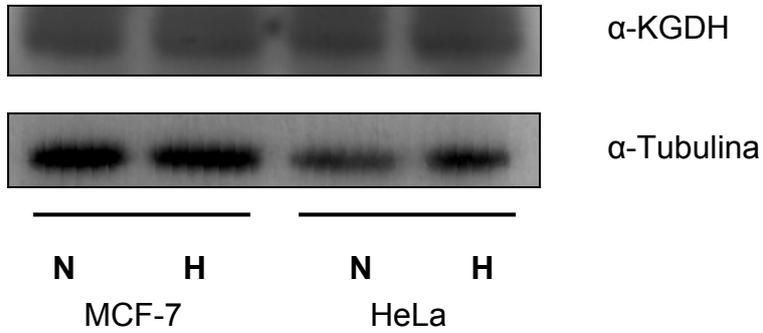
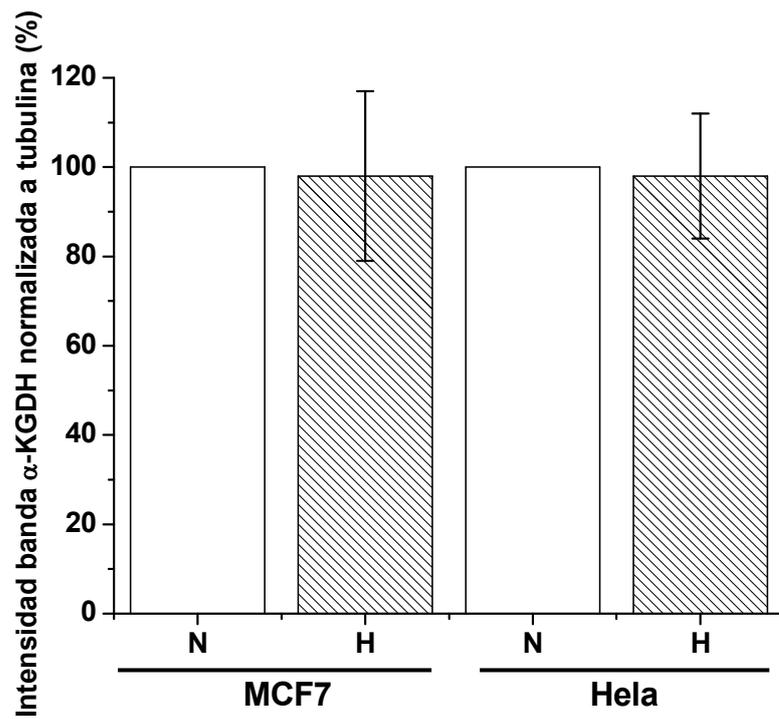
A**B**

Figura 8. 8. “Western blot” de α -KGDH en las células en condiciones de normoxia e hipoxia. **A**. Imagen representativa de los ensayos **B**. Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=3). Se muestra el promedio de los resultados \pm desviación estándar.

Glutaminasa (GA)

La tasa de conversión de glutamina en glutamato y amonio se midió mediante un ensayo colorimétrico, en el cual se forma un compuesto que se mide a una longitud de onda de 410 nm. La reacción debe contener entre 100 y 400 µg de proteína mitocondrial. Los ensayos con células completas no generan suficiente amonio para ser detectado. Los resultados se muestran en la tabla 8.10.

Tabla 8.11. Actividad de glutaminasa en mitocondrias aisladas de MCF-7 y HeLa.

	MCF-7	HeLa
	(mU/mg)	
Normoxia	138 ± 47 (4)	62 ± 17 (3)
Hipoxia	46 ± 12 (3)	153 ± 110 (3)

Los valores indican el promedio de las mediciones ± desviación estándar.

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

MCF-7: $p < 0.01$ HeLa: $p > 0.1$

Las mitocondrias de MCF-7 disminuyeron la actividad de glutaminasa hasta 3 veces después de ser sometidas a hipoxia. Por el contrario, las mitocondrias de HeLa no sufrieron cambios en la actividad de esta enzima. Sin embargo, se observa una tendencia al aumento de la actividad en hipoxia.

Los inmunoensayos para esta proteína se muestran en la siguiente figura. El anticuerpo anti-glutaminasa permitió identificar las dos isoformas conocidas de la GA, la isoforma K (riñón) y la L (hígado). Está reportado que ambas isoformas se expresan en tumores (79).

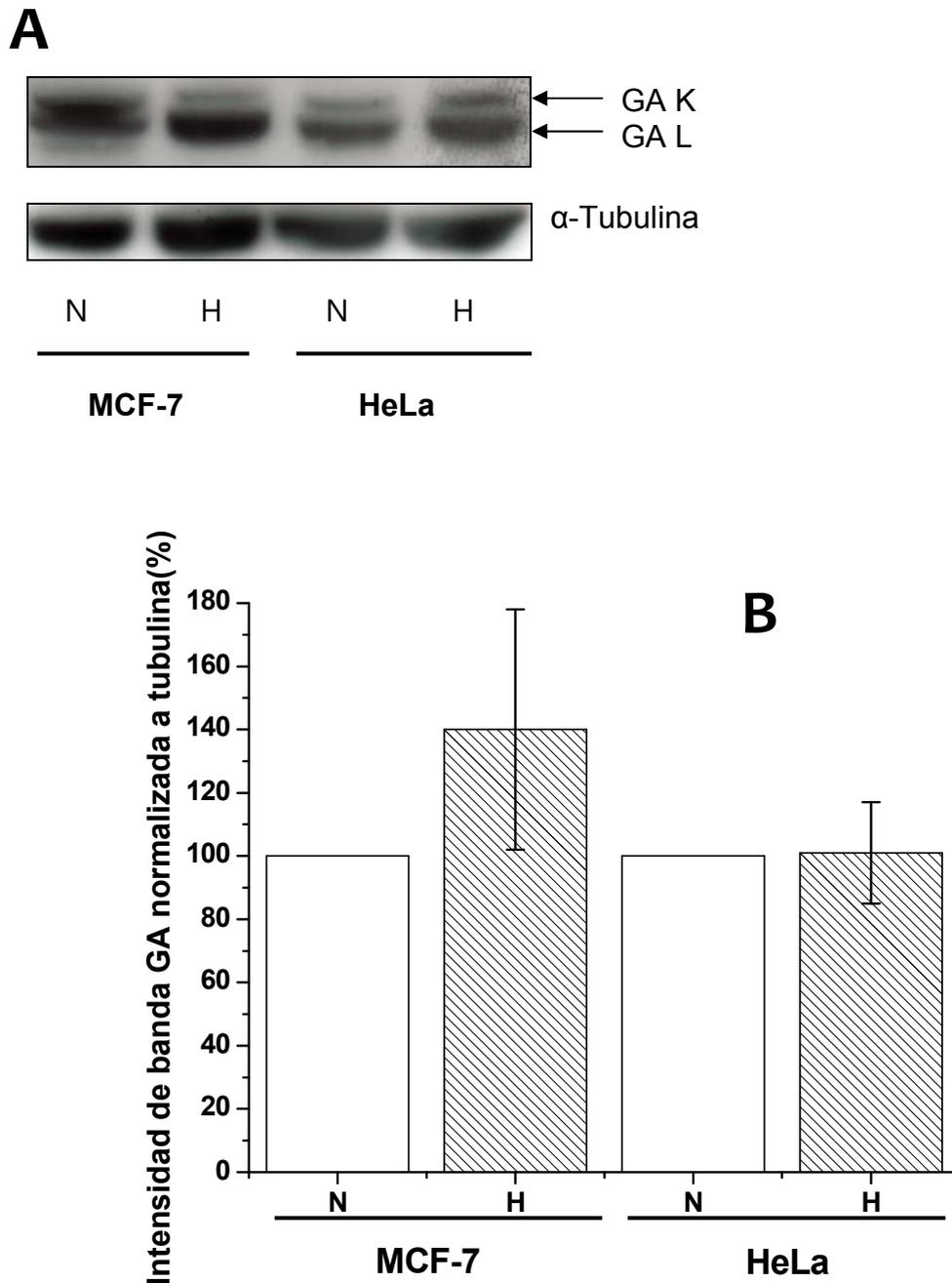


Figura 8. 9. Análisis de proteína total de GA en MCF-7 y HeLa. **A.** Imagen representativa. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=3). Se muestra el promedio de los resultados \pm desviación estándar.

Los resultados muestran que la GA total no se modifica por efecto de la hipoxia en ninguna de las dos líneas celulares, aunque en MCF-7 tiende a incrementar. Cabe resaltar que la isoforma K (GA K) disminuye un 30% su expresión en

MCF7 y en HeLa tiene un ligero incremento del 10%, mientras que la isoforma L (GA L) se incrementa entre el 30 y 80% en MCF-7 y no se modifica en HeLa.

Efecto de la hipoxia sobre la expresión de factores de HIF-1 α y p53.

Con el fin de evaluar alguna posible correlación entre los fenómenos observados en las enzimas mitocondriales y los factores de transcripción HIF-1 y p53, se analizó la cantidad de proteína expresada de estos dos factores en las células cultivadas en las dos condiciones de oxígeno.

En el caso de HIF-1, se evaluó la subunidad HIF-1 α , la cual es estabilizada por hipoxia. Los inmunoblots se realizaron a partir de extractos nucleares, empleando como control de carga a la nucleolina, ya que es una proteína nuclear de la que no existen reportes de que se modifique por hipoxia.

En la figura 8.10 se muestra que HIF-1 α es indetectable en las condiciones de normoxia en ambas líneas y que se incrementa su expresión al someter los cultivos a hipoxia.

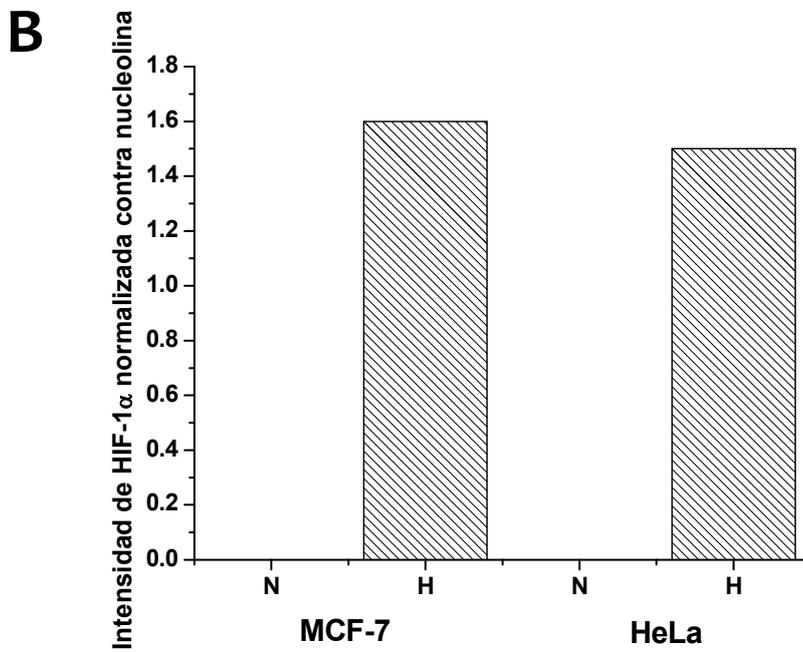
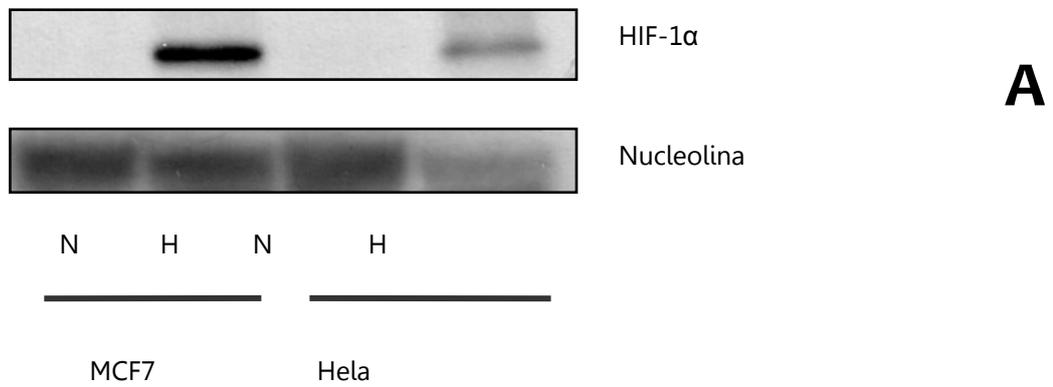


Figura 8. 10. Inmuno análisis tipo “western blot” de la expresión de HIF-1 α . **A.** Imagen del ensayo. **B.** Análisis densitométrico. La intensidad de las bandas se normalizó con nucleolina.

En cuanto a p53, en HeLa no se encontró expresión de la proteína en ninguna condición, y en MCF-7 la hipoxia incrementó su cantidad (figura 8.11).

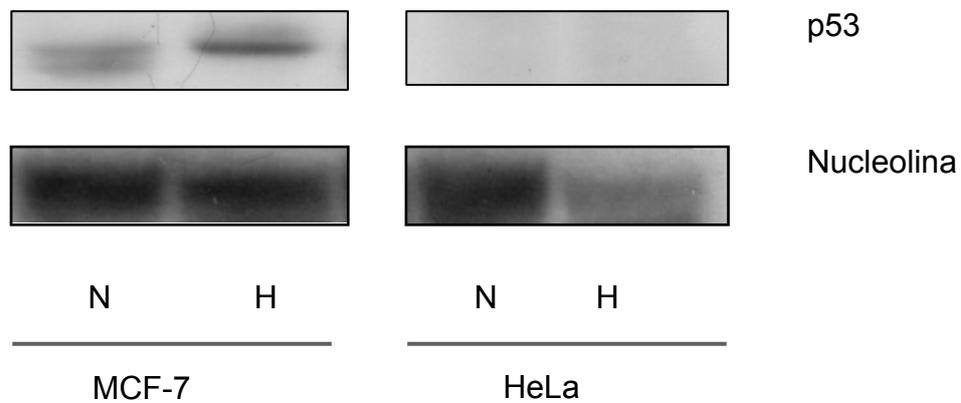


Figura 8. 11. Expresión de p53 en MCF-7 y HeLa en ambas condiciones de oxígeno..

Está bien documentado que HeLa es un cáncer originado por el virus del papiloma humano y mantiene la expresión de la subunidad E6 de este virus, la cual degrada a p53. Por otra parte, un trabajo reciente muestra que HIF-1 α estabiliza a p53 en células MCF-7 (80), por ello se encontró mayor cantidad de esta proteína en las células hipóxicas.

9. Discusión.

En la mayoría de los estudios en los que se evaluó el efecto de la hipoxia sobre algún parámetro celular, se reportaron los valores porcentuales de oxígeno (0.2 – 5%) en la fase gaseosa de las **cámaras** donde se incubaron los cultivos (42, 50,63). Debido a que la difusión de oxígeno es menor en el líquido que en el gas, los datos porcentuales no reflejan la concentración real de oxígeno a la que se encontraban las células. Por ello, en este trabajo se midió la concentración de oxígeno del líquido de los cultivos en normoxia e hipoxia.

La tabla 8.1 muestra que la exposición a hipoxia durante 24 h disminuyó 80% la disponibilidad de oxígeno. En los tejidos normales el promedio de la concentración de oxígeno es de alrededor de $50 \pm 20 \mu\text{M}$ ($70 \mu\text{M}$ en piel, $30 \mu\text{M}$ en hígado, etc) (1,6) y en las zonas internas de los tumores (cabeza, cuello y cervix) varía de 2 a $15 \mu\text{M}$ (9-17), lo que representa una disminución del 70-95% con respecto al tejido original, por tanto, la reducción neta (80%) que genera nuestro sistema de hipoxia asemeja la condición fisio-patológica del tumor, y además produce cambios en el crecimiento y en el metabolismo energético de las líneas cancerosas empleadas.

9.1 La hipoxia detiene el crecimiento de las células tumorales.

De manera global, en las primeras 24 h de exposición a hipoxia ambas líneas tumorales detuvieron su crecimiento, posiblemente por la activación de HIF-1 (figura 8.11), ya que la expresión de este factor en hipoxia evita la entrada a la fase S del ciclo celular de células normales, tales como MEF (fibroblastos embrionarios de ratón) y linfocitos B (81), y en células tumorales de ovario (82). A las 48 h de exposición la población disminuyó (15% menos en MCF-7 y 33% menos en HeLa), posiblemente por proceso apoptótico, ya que está reportado que en las zonas hipóxicas de los tumores aumenta el número de células en apoptosis (63). La muerte celular por apoptosis también justifica que la viabilidad celular se mantuviera alta a pesar del decaimiento poblacional, ya que el azul tripano no puede teñir a las células apoptóticas, ya que éstas no presentan poros en la membrana a través de los cuáles el colorante pueda internalizarse.

9.2 Glucólisis exacerbada y FO constante en HeLa.

HeLa incrementó su actividad glucolítica (5.5 veces) al someterla a hipoxia, pero no disminuyó la FO. En condiciones de hipoxia el aporte energético de la FO disminuyó considerablemente, del 77 al 29% (tabla 9.1), pero el ATP producido por glucólisis se incrementó al grado de que la síntesis neta total calculada de ATP se duplicó, lo que representa una franca ventaja energética para las células, pues significa que tienen suficiente energía para mantener la

duplicación celular y el resto de sus procesos internos. Sin embargo, la concentración de ATP medida en HeLa (tabla 8.4) fue constante en normoxia e hipoxia y además, como ya se mencionó, en hipoxia no hubo crecimiento. Por tanto, existió otro proceso que consumió grandes cantidades de ATP compitiendo (y ganando) con la duplicación celular, como por ejemplo, la homeóstasis de pH o de iones (83-86). Estos procesos los pueden realizar los transportadores de monocarboxilatos acoplados a H^+ (expulsión de lactato) y los antiportadores de $Na^+ - H^+$ o $HCO_3^- - Cl^-$ (83) pues está descrito que en hipoxia el pH intracelular puede disminuir hasta 6.88 (77,84), una condición semejante al pH que se obtiene cuando existe activación glucolítica (77). La homeóstasis de iones también la puede realizar la ATPasa Na^+-K^+ , que en condiciones anóxicas consume hasta el 75% del ATP producido en células hepáticas (revisado en 85), o bien, puede estar involucrada la V-ATPasa que se encuentra exacerbada en la membrana plasmática de células tumorales con alto potencial metastático, como las MB435 (cáncer de mama) (86). Dado que los cultivos hipóxicos mostraron una caída en el pH del medio de cultivo (de 7.2 a 6.7-6.5), es posible que la homeóstasis del pH si jugó un papel importante en el consumo de ATP.

9.3 La hipoxia incrementa la glucólisis y disminuye la respiración de MCF-7

Los cultivos de MCF-7 al ser sometidos a hipoxia incrementaron su actividad glucolítica en 3.7 veces, siendo este aumento menor al de HeLa, lo que

concuenda con la hipótesis de que el incremento en la glucólisis es mayor cuanto más agresivas son las células (24), pues HeLa es una línea de cáncer altamente metastático, mientras que MCF-7 es un cáncer menos agresivo. Con el uso de la 2DOG se identificó que la hipoxia también incrementa la formación de lactato por procesos diferentes a la ruptura de la glucosa añadida, posiblemente la degradación de glucógeno (69).

Por otra parte, MCF-7 mostró ser una línea celular altamente oxidativa, al igual que otras células tumorales como AS-30D, sarcomas, melanomas, carcinomas de pulmón, etc. (77 y revisado en 43), teniendo velocidades de FO mayores que las de HeLa. Después de la hipoxia, MCF-7 disminuyó la velocidad de FO en la misma proporción que aumentó su glucólisis (tabla 8.2 y 8.3), sugiriendo que el aumento en la glucólisis es una medida para mantener los niveles de ATP a la concentración de normoxia. La tabla 9.1 muestra que el ATP total calculado disminuyó en 55%, pero el ATP medido en los extractos ácidos no mostró cambios en su concentración entre las condiciones de oxígeno (tabla 8.4). Al igual que con el oxígeno, la concentración de cualquier metabolito depende de las vías que lo producen (oferta) y de las que lo consumen (demanda) (2), y en este caso disminuyó la vía productora y la poza del metabolito no se modificó, entonces la vía consumidora también debió disminuir su actividad. Entre las rutas que consumen la mayor cantidad de energía se encuentran la síntesis de proteínas y DNA (85), las cuales se detuvieron en hipoxia pues no hubo crecimiento celular (figura 8.1). En este mismo sentido, está descrito que en tumores de fibrosarcoma de ratón y a pO_2

cercanas a 10 mmHg (14 μ M) la concentración de ATP se mantiene constante (21,87).

Es importante destacar que en esta tesis las velocidades de ambas rutas metabólicas se midieron a concentraciones ambientales de oxígeno (20%), y a pesar de ello se detectaron diferencias entre las células normóxicas y las expuestas a hipoxia, indicando que los cambios generados por las diferencias en las concentraciones de oxígeno no eran reversibles, sino que representaban modificaciones permanentes en los fenotipos celulares, posiblemente en la expresión y actividad de las enzimas involucradas en ambos procesos. Así, en este trabajo fue muy importante acompañar los análisis de la cantidad de proteína con las actividades enzimáticas, ya que para obtener un panorama completo es necesario demostrar que la enzima se encuentra activa o inactiva.

9.4 La hexocinasa en HeLa y MCF-7.

Está descrito que la HK, la fosfofructocinasa (PFK-1) y el transportador de glucosa (GLUT) controlan principalmente el flujo de la glucólisis en células normales y células cancerosas (69). También está documentado que la HK es una de las enzimas cuya expresión se acentúa en hipoxia hasta 5 veces en células P493-6 (32). Estos antecedentes sugerían que el aumento observado en la glucólisis de MCF-7 y HeLa serían un reflejo del incremento en la actividad y expresión de esta proteína, sin embargo, esta correlación sólo se observó en HeLa.

En HeLa, después de la hipoxia, la proteína de HK II se incrementó en 30%, pero la actividad en los extractos citosólicos se duplicó, lo que sugiere que en la actividad de hexocinasa está involucrada otra isoforma, posiblemente la I, de la cual existen reportes que también se incrementa por hipoxia (88). Por otra parte, el flujo de la glucólisis en hipoxia se incrementó 5 veces y el incremento en la actividad de HK sólo fue de dos veces, por lo tanto, es probable que en hipoxia el control de la glucólisis se redistribuyó entre el resto de las enzimas y sea (n) otra (s) la (s) que ejerza (n) el mayor control de esta ruta.

En MCF-7 el aumento de la actividad de hexocinasa correlacionó con el incremento en el contenido de HK II, pues ambos presentaron valores cercanos al 40%. Esto indica que en MCF-7 la isoforma II es la responsable de la actividad total de hexocinasa. En cuanto a la relación HK – glucólisis, los datos obtenidos fueron similares a los de HeLa, pues su actividad solo aumenta el doble, mientras el flujo de la vía incrementa 4 veces. No existen datos reportados que indiquen que la HK de MCF-7 interviene o no en el control del flujo de la glucólisis, por lo que cabría investigar si otras enzimas se modifican de manera más severa durante la hipoxia, recayendo en ellas el control de la vía.

Con los datos obtenidos con la HK sugerimos que aunque en AS-30D (hepatoma de rata) esta enzima controla de manera importante a la vía, aparentemente en HeLa y en MCF-7 esto no ocurre, por lo que resulta

importante que los fenómenos observados en una línea celular no se generalicen en todas las líneas cancerosas.

9.5 Cadena respiratoria intacta

De las enzimas que componen la cadena respiratoria se analizaron dos relevantes, la COX o complejo IV y la NADH deshidrogenasa o complejo I.

La COX es un dímero del cual cada monómero está compuesto por 13 subunidades, tres de las cuáles son codificadas por el DNA mitocondrial y diez por el nuclear (89). La actividad catalítica reside en las subunidades I – III, pero la subunidad IV es inhibida por ATP (90) y es la subunidad más grande que se codifica en el núcleo, donde puede ser afectada transcripcionalmente por HIF 1, y es por tal motivo que se eligió para medirla en este trabajo.

Los resultados revelaron que el nivel de proteína y actividad de la COX en ambas líneas celulares fue muy similar y se mantuvo constante aún después de la exposición a 20 μ M de O₂ durante 24 h.

La COX IV tiene dos isoformas, 1 y 2, de las cuáles está reportado que su expresión es regulada por la disponibilidad de oxígeno en las líneas tumorales humanas Hep3B (hígado), HeLa (útero), Hct116 (colon) y A594 (pulmón). En estas células se encontró que la isoforma 1(COX IV-1) es abundante en normoxia, pero la hipoxia induce la expresión de la isoforma 2 (COX IV-2), y además incrementa la expresión de la proteína LON, que es una proteasa esencial para la degradación de la COX IV-1 (90). Este cambio de isoformas

parece ser un mecanismo de adaptación que optimiza la actividad de la COX en condiciones de hipoxia.

Considerando esta información, sabemos que la actividad medida en este trabajo involucra a la de ambas isoformas y por ello no se ven modificaciones ni en la actividad ni en la expresión de COX. Obtener la *K_m* de la COX por O₂ en normoxia e hipoxia es necesario para saber si ésta disminuye y esa es la razón por la que no se afecta la actividad en hipoxia. Por otra parte, la velocidad de la enzima fue medida en condiciones de sustrato saturante (O₂) y dentro de las células esto no ocurre porque el oxígeno debe difundir del medio externo hasta la mitocondria, y posiblemente, la concentración de O₂ en este organelo sea menor que la del medio, por ello, sería conveniente medir esta actividad a bajas concentraciones para verificar si a esas condiciones hay cambios en la actividad.

Por otra parte, el complejo I tampoco se afectó por hipoxia, y no se poseen reportes que puedan explicar este fenómeno, pero está reportado que otro componente de la cadena respiratoria, el citocromo c, se mantiene constante en hipoxia, incluso después de 5 días de exposición (91). Por tanto, nuestros datos indican que la cadena respiratoria tiene la capacidad para mantener su actividad en hipoxia a la misma velocidad que en normoxia, pero de acuerdo con la literatura (revisado en 2), esto sólo es posible si existen suficientes sustratos oxidables para la cadena. Entonces, cabe suponer que la disminución observada en la FO de MCF-7 puede ser causada por una disminución en las enzimas que generan los sustratos (NADH) para la cadena.

9.6 Inhibición de la PDH

En ambas líneas tumorales los inmunoensayos revelaron la presencia de la PDH. Además, la hipoxia no modificó la cantidad de proteína en ninguna de las líneas celulares, sin embargo no se detectó actividad, ni siquiera en normoxia. Entonces, es muy probable que la enzima se encuentre inhibida por la actividad de la PDK1, tal y como lo reportó Papandreou (42), o bien, que en estas líneas tumorales se incremente la formación de acetoína. Está reportado que, en el hepatoma Ehrlich y AS-30D, una parte del piruvato que se encuentra en la mitocondria es descarboxilado a un acetaldehído activo, que al condensarse con un segundo acetaldehído, forma acetoína, la cual es un inhibidor competitivo de la PDH (revisado en 43). Sin embargo, es necesario conocer las concentraciones de acetoína en las mitocondrias de MCF-7 y HeLa (normóxicas e hipóxicas) para corroborar que esta inhibición existe.

9.7 La α -KGDH y la GA limitan la respiración en MCF-7

De las dos líneas celulares analizadas en este trabajo, sólo en MCF-7 se redujo la actividad de la FO al exponerla a hipoxia. En el caso de HeLa, la glucólisis se modificó por hipoxia, pero no la FO, por lo que no se esperaban modificaciones en la actividad de las enzimas mitocondriales. El análisis de las enzimas de la FO (COX, complejo I, PDH, GA y α -KGDH) de esta línea tumoral reveló que ninguna de ellas se alteró por la baja condición de oxígeno. Por ello, a

continuación se discuten los cambios observados en las GA y α -KGDH de MCF-7.

Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de la α -KGDH en MCF-7 se reduce 60% en hipoxia y su proteína sólo disminuye 10%. Por lo tanto, la enzima debe estar inhibida por metabolitos que la regulan alostéricamente. Sin embargo, en el caso de la α -KGDH no hay datos que proporcionen información sobre la merma de su actividad en células cancerosas, pero está documentado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden dañar la actividad de esta enzima y que estas se incrementan (2-3 veces) en condiciones de hipoxia (92-94). Diferentes reportes indican que la cadena respiratoria es la principal fuente de superóxido en tejidos normales (95), y a partir de esta especie, mediante la reacción de Fenton, se generan otros ROS, y que durante la hipoxia en diferentes tipos de tumorales hay un aumento en la producción de estas especies, principalmente las generadas por el complejo III (revisado en 96). Los ROS afectan a las membranas celulares promoviendo lipoperoxidación, cuya degradación forma otras especies reactivas como el HNE (4-hidroxi-2-nonenal) que inhiben a la α -KGDH, pero que no afectan a los complejos de la cadena respiratoria ni a otras deshidrogenadas de matriz (97).

Como ya se mencionó, los tumores sólidos consumen grandes cantidades de glutamina, la cual es degradada a glutamato y amonio en una reacción catalizada por la glutaminasa. El glutamato generado puede alimentar al ciclo de Krebs y contribuir al mantenimiento de la actividad mitocondrial incluso en hipoxia. Sobre la GA existen pocos antecedentes y no está claro cuál sería su

comportamiento en hipoxia. En este trabajo se observó que en hipoxia hay una disminución considerable (3 veces) en la actividad de GA en MCF-7 y además, un cambio en la expresión de sus isoformas, disminuyéndose en 30% la proteína de la GA K. De la GA se conocen dos isoenzimas, la K (riñón) y la L (hígado). Está descrito que la GA K está presente en todos los tejidos con actividad de glutaminasa, y hasta hace poco se pensaba que la forma L solo se encontraba en el hígado adulto, pero se encontró su expresión en diferentes tipos de células tumorales (79).

En HeLa ninguna de las isoformas varía con la hipoxia y no se modifica tampoco la actividad. En cambio MCF-7 en donde la actividad disminuyó, la GA K también disminuye, por tanto la actividad de glutaminasa recae sobre esta isoforma en estas líneas tumorales.

Por otra parte, resalta el hecho de que la proteína total de GA incrementa en 40%, pero su actividad disminuye 3 veces. Como ocurrió con la PDH y la α -KGDH, la actividad de la enzima se ve afectada por algún mecanismo, posiblemente una inhibición, pero hasta el momento no existen reportes que sustenten esta aseveración.

Los datos obtenidos sugieren que la respiración de MCF-7 se afecta por cambios en la α -KGDH y GA, enzimas proveedoras de NADH para la cadena respiratoria, no en la cadena *per se*. Se propone que los eventos involucrados en este fenómeno son los siguientes:

1. La PDK se exagera con lo que se inhibe la PDH y ésta no forma NADH para la cadena respiratoria.
2. No hay formación de acetil CoA a partir de piruvato. Sin embargo, no se debe descartar que el acetil CoA puede formarse a partir de otros compuestos y alimentar al ciclo.
3. La GA disminuye su actividad con lo que hay menos α -cetoglutarato para alimentar al ciclo y compensar la disminución de acetil CoA.
4. La α -KGDH también disminuye su actividad y se restringe la formación de NADH.
5. La cadena respiratoria está limitada por NADH y como resultado se reduce su actividad.

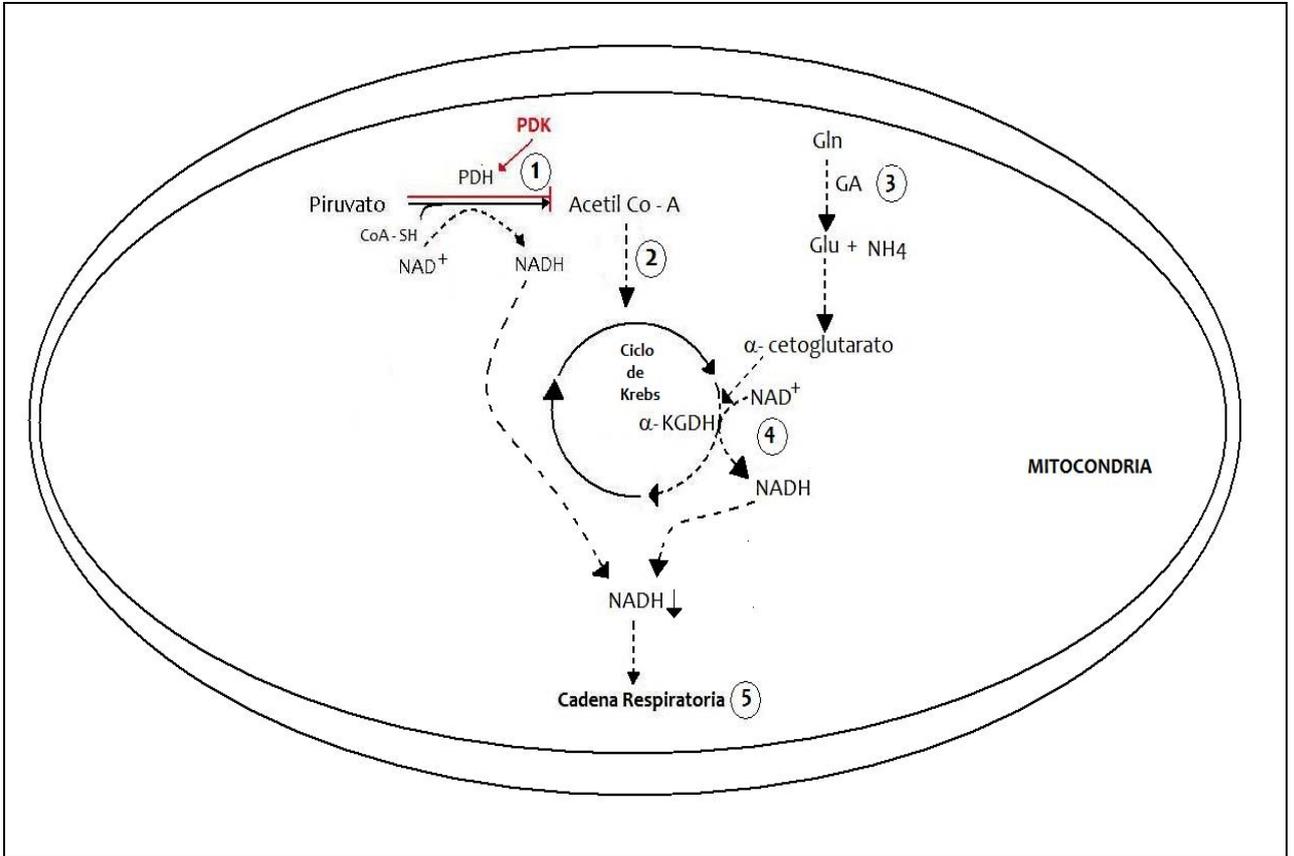


Figura 9. 1. Eventos involucrados en la disminución de la respiración en MCF-7. PDH: piruvato deshidrogenasa; CoA-SH: coenzima A; Gln: glutamina; Glu: glutamato; GA: glutaminasa; α -KGDH: α -cetoglutarato deshidrogenasa. Las líneas punteadas indican disminución en el flujo. La descripción de la numeración se encuentra en el texto.

Sin embargo, es necesario medir la concentración de adenin nucleótidos en la mitocondria para verificar si el suministro de NADH está disminuido en hipoxia y si la cantidad presente en el organelo es limitante para su actividad.

9.8 El factor transcripcional p53 puede estar involucrado en el control de la respiración en MCF-7

A la fecha, las funciones mejor conocidas de p53 son aquellas relacionadas con el control del ciclo y de la muerte celulares en tejidos normales. En las células cancerosas se ha observado que este factor se involucra en procesos como el control de la concentración de las ROS y además, en un rol opuesto a su característica supresión del cáncer, puede contribuir a la supervivencia e incremento de la malignidad tumoral, así como al efecto Warburg (revisado en 98). Los antecedentes mostrados en la introducción de este trabajo indicaban que en hipoxia era requisito la pérdida de p53 para evitar la degradación de HIF-1 y disminuir la respiración celular. Sin embargo, se observó lo opuesto, es decir un aumento en la cantidad de p53 en las células de MCF-7 después de exponerlas a hipoxia. Este evento concuerda con la publicación de An y colaboradores (80) en la que muestran que en MCF-7 en particular, la inducción de HIF-1 α es necesaria para la acumulación de p53 transcripcionalmente activo.

Por otra parte, HeLa tiene la particularidad de no poseer p53 debido a su degradación por la subunidad E6 del HPV. En concordancia, HeLa no mostró cambios en su actividad de la fosforilación oxidativa, mientras que MCF-7, que incrementa el nivel de p53 a bajas concentraciones de oxígeno, mostró una disminución en su tasa respiratoria. Por lo tanto, los datos sugieren que este factor transcripcional podría estar involucrado en este fenómeno, posiblemente actuando de manera directa sobre el cambio de isoformas de la GA. Sin

embargo, no es posible afirmar lo anterior de manera categórica pues un estrés celular como la hipoxia genera respuestas muy complejas, en las cuáles están involucrados, directa o indirectamente, múltiples factores. Se propone que para dilucidar si p53 juega algún papel en la disminución de la FO en hipoxia, se empleen células MCF-7 p53^{-/-} y se sometan a hipoxia. Si p53 está involucrado, su ausencia evitaría la merma en la FO observada en las células con p53.

Los datos obtenidos en este trabajo quedan como antecedente para futuras investigaciones sobre el mecanismo que induce la disminución de la FO durante hipoxia.

10. Conclusiones.

1. La hipoxia prolongada no afecta la respiración celular de HeLa, lo que se debe a que las bajas concentraciones de O_2 no disminuyen la expresión ni la actividad de las enzimas de la FO.
2. La hipoxia prolongada disminuye la respiración celular de MCF-7 por efecto de la reducción en la actividad de las enzimas α -KGDH y GA, y por tanto, reduce la producción de NADH que alimenta a la cadena respiratoria.
3. El factor transcripcional p53 puede estar involucrado en la disminución de la respiración celular, posiblemente disminuyendo la cantidad de proteína de la GA.
4. Los efectos de la hipoxia no deben generalizarse, pues cada línea tumoral o cáncer de estudio responde de manera particular a este estrés.

11. Perspectivas.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se propone:

1. Identificar la naturaleza de la inhibición que afecta la actividad de la PDH y la α -KGDH, lo que permitirá ahondar en el mecanismo responsable de la disminución de la FO en hipoxia. Para ello, se propone que para la PDH se establezca un protocolo de desfosforilación de la enzima y medición de su actividad. En el caso de la α -KGDH se propone evaluar el efecto del HNE sobre ella, ya que está reportado que las ROS se incrementan durante la hipoxia y la α -KGDH es un blanco de esta especie. De manera complementaria, verificar el incremento de las ROS, lo cual se puede llevar a cabo midiendo la actividad de la aconitasa, ya que esta enzima contiene grupos $-SH$ lo que la convierten en un buen marcador de la presencia de radicales libres.
2. Realizar un análisis de elasticidades para determinar el control de la ruta glucolítica de MCF-7 y HeLa en hipoxia para identificar posibles blancos terapéuticos específicos de estos tumores.
3. Ensayar drogas mitocondriales y/o glucolíticas en las células hipóxicas de acuerdo con los cambios observados en el metabolismo energético.
4. Exponer los cultivos en monocapa a ciclos de hipoxia/reoxigenación, acercándose a un modelo más realista del desarrollo tumoral, y analizar en estas células los posibles cambios en las enzimas mitocondriales, en

el flujo glucolítico y la cantidad de mitocondrias, esto último analizado por microscopia confocal.

5. Analizar los cambios en el metabolismo energético a diferentes concentraciones de oxígeno, para identificar la concentración a la que comienzan a presentarse dichas alteraciones. Para obtener las diferentes concentraciones de O₂ podría emplearse la cámara de hipoxia usada en este trabajo, o bien alguna trampa química para oxígeno, como la ditionita (hidrosulfito de sodio) o el sulfuro de sodio.
6. Evaluar la regulación de la transcripción de la GA por p53, mediante el análisis de actividad y cantidad de proteína de GA en cultivos hipóxicos de mutantes knock out o knock down del mencionado factor transcripcional.
7. Desarrollar tumores sólidos en ratones atómicos a partir de las líneas celulares y analizar los cambios en el metabolismo energético a diferentes volúmenes de los tumores (equivalentes a diferentes grados de hipoxia).
8. Evaluar la expresión de los genes de las enzimas mitocondriales y glucolíticas importantes (GLUT, HK, GA), así como de los factores transcripcionales p53 y HIF-1 α después de la exposición a hipoxia prolongada, mediante PCR en tiempo real. Dicho análisis mostrará si el cambio observado en la cantidad de proteína se debe a regulación en la transcripción de los genes, o bien, si es debida a modificaciones post-transcripcionales o a la degradación de las proteínas.

12. Referencias.

1. Vaupel, P., Kallinowski, F. y Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 49, 6449-6465 (1989).
2. Ward, J.P.T Oxygen Sensors in context. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777, 1-14 (2008).
3. Höckel, M y Vaupel, P. Tumor Hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 266-276 (2001).
4. Zander R. y Vaupel P. Proposal for using a standardized terminology on oxygen transport to tissue. *Adv Exp Med Biol.* 191, 965–70 (1985).
5. Krogh, A. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J. Physiol.* 52, 409–415 (1919).
6. Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. y Jain, R. K. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Med.* 3,177–182 (1997).
7. Dewhirst, M. W., Secomb, T. W., Ong, E. T., Hsu, R. y Gross, J. F. Determination of local oxygen consumption rates in tumors. *Cancer Res.* 54, 3333–3336 (1994).
8. Matsumoto, S *et al.* Low-field paramagnetic resonance imaging of tumor oxygenation and glycolytic activity in mice. *J. Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI34928 (2008).

9. Evans, S.; Du, K.L.; Chalian, A.A. *et al.* Patterns and levels of hypoxia in head and neck squamous cellcarcinomas and their relationship to patient outcome. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 69, 1024–1031 (2007).
10. Erickson, K.; Braun, R.D.; Yu, D.; Lanzen, J.; Wilson, D.; Brizel, D.M.; Secomb, T.W.; Biaglow, J.E. y Dewhurst, M.W. Effect of longitudinal oxygen gradients on effectiveness of manipulation of tumor oxygenation. *Cancer Res.* 63, 4705-4712 (2003).
11. Mason, R.P.; Rodbumrung, W y Antich, P.P. Hexafluorobenzene: a sensitive ¹⁹F NMR indicator of tumor oxygenation. *NMR Biomed.* 9, 125-134 (1996).
12. Vaupel, P.; Schlenger, K; Knoop, C. y Höckel, M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 51, 3316 -3322 (1991).
13. Kallinowsky, F.; Schlenger, K.H.; Runkel, S.; Kloes, M.; Stohrer, M.; Okunieff, P y Vaupel, P. Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts. *Cancer Res.* 49, 3759 – 3764 (1989).
14. Kolstad, P. Intercapillary distance, oxygen tension and local recurrence in cervix cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 106, 145-157 (1968).
15. Hunjan, S.; Zhao, D.; Constantinescu, A. *et al.* Regional tumor oximetry: ¹⁹F NMR spectroscopy of hexafluorobenzene. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 41, 161-71 (1998).
16. Zhao, W.; Constantinescu, A.; Hahn, E.W. y Mason, R.P. Tumor oxygen dynamics with respect to growth and respiratory challenge: Investigation

- of the Dunning prostate R3327-HI tumor. *Radiat Res.* 156: 510-520 (2001).
17. Bratasz, A., Kulkarni, A. y Kuppusamy, P. A highly sensitive biocompatible spin probe for imaging of oxygen concentration in tissues. *Biophysical Journal.* 92, 2918-2925 (2007).
18. Bristow, R.G. y Hill, R.P. Hipoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer.* 8, 180-192 (2008).
19. Rofstad, E.; DeMut, P.; Fenton, B.M.; Sutherland, R.M. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy studies of tumor energy metabolism and its relationship to intracapillary oxyhemoglobin saturation status and tumor hipoxia. *Cancer Res.* 48, 5440-5446 (1988).
20. Mueller-Klieser, W.; Schaefer, C.; Walenta, S.; Rofstad, E.K; Fenton, B.M. y Sutherland, R.M. Assessment of tumor energy and oxygenation status by bioluminescence, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and cryospectrophotometry. *Cancer Res.* 50, 1681-1685 (1990).
21. Vaupel, P.; Schaefer, C. y Okunieff, P. Intracellular acidosis in murine fibrosarcomas coincides with ATP depletion, hypoxia, and high levels of lactate and total Pi. *NMR Biomed.* 7, 128-36 (1994).
22. Warbug, O. On the origin of cancer cells. *Science.* 123, 309 – 314 (1956).
23. Zu, X.L. y Guppy, M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun.* 313, 459-465 (2004).
24. Gatenby, R y Gillies, R. Why do cancer cells have high aerobic glycolysis. *Nature Rev.* 4, 891-899 (2004).

25. Gatenby, R.A. The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interactions. *Cancer Res.* 55, 4151-4156 (1995).
26. Zhao, S.; Kuge, Y.; Mochizuki, T.; Takahashi, T.; Nakada, K.; Sato, M.; Takei, T. y Tamaki, N. Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in 18F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase II in experimental tumor. *J. Nucl. Med.* 46, 675-682 (2005).
27. Pedersen, M.W.; Holm, S.; Lund, E.L.; Hojgaard, L. y Kristjansen, P.E. Coregulation of glucose uptake and vascular endothelial growth factor (VEGF) in two small-cell lung cancer (SCLC) sublines *in vivo* and *in vitro*. *Neoplasia.* 3, 80-87 (2001).
28. Macheda, M.L.; Rogers, S.; y Best, D. B. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell Physiol.* 202, 654-662 (2005).
29. Semenza, G.; Roth, P. H.; Fang, H. M. y Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by Hypoxia-inducible Factor I. *J. Biol. Chem.* 269: 23757-23763 (1994).
30. Lu, H.; Zhang, Y.; Roberts, D.D.; Osborne, C.K y Templeton, N.S. Enhanced gene expression in breast cancer cells *in vitro* and tumors *in vivo*. *Molecular Therapy.* 6, 783-792 (2002).
31. Dayan, F.; Roux, D.; Brahimi-Horn, M.C.; Pouyssegur, J. y Mazure, N.M. The Oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1A. *Cancer Res.* 66, 3688-98 (2006).

32. Kim, J.; Gao, P.; Liu, Y.C.; Semenza, G.L. y Dang, C.V. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7381-7393 (2007).
33. Funasaka, T.; Yanagawa, T.; Hogan, V. y Raz, A. Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor expression by hypoxia. *FASEB J.* 19, 1422–1430 (2005).
34. Minchenko, A.; Leshchinsky, I.; Opentanova, I.; Sang, N.; Srinivas, V.; Armstead, V. y Caro, J. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. *J. Biol. Chem.* 277: 6183-6187 (2002).
35. Semenza, G.L.; Jiang, B. H.; Leung, S. W.; Passantino, R.; Concordet, J. P.; Maire, P. y Giallongo, A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271: 32529-32537 (1996).
36. Kress, S.; Stein, A.; Maurer, P.; Weber, B.; Reichert, J.; Buchmann, A.; Huppert, P. y Schwarz, M. Expression of hypoxia-inducible genes in tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 124: 315-320 (1998).
37. Firth, J., Eberts, B. L. y Ratcliffe P.J. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. *J. Biol. Chem.* 270, 21021-21027 (2007).
38. Altenberg, B. y Greulich, K.O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84, 1014-1020 (2004).

39. Moreno-Sánchez, R., Torres-Márquez, M.E. y Gómez-Puyou, A. Control of oxidative phosphorylation. *Trends Biomembr. Bioenerg.* 1: 119-150 (1991).
40. Nichols, D. G. Bioenergética. Introducción a la teoría quimiosmótica. Editorial Reverté, 1987.
41. Froese, G. The respiration of ascites tumor cells at low oxygen concentration. *Biochim. Biophys. Acta.* 57, 509-519 (1962).
42. Papandreou, I.; Cairns, R.A.; Fontana, L.; Lim, A.L. y Denko, N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism.* 3, 187–197 (2006).
43. Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S; Marín-Hernández, A. y Saavedra, E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274, 1393-1418 (2007).
44. Mason, M.G.; Nicholls, P.; Wilson, M.T. y Cooper, C.E. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103, 708–713 (2006).
45. Rumsey, W.L. Schlosser, C.; Nuutinen, E. M.; Robiolio, M. y Wilson, D.F. Cellular energetics and the oxygen dependence of respiration in cardiac myocytes isolated from adult rat. *J. Biol. Chem.* 265, 15392–15399 (1990).
46. Pecina, P.; Gnaiger, E.; Zeman, J.; Pronicka, E. y Houstek, J. Decreased affinity for oxygen of cytochrome c- oxidase in Leigh syndrome caused by SURF-1 mutations. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287, C1384–C1388 (2004).

47. Chandel, N.S.; Budinger, G.R.S.; Choe, S.H. y Schumacker, P.T. Cellular respiration during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 18808 – 18816 (1997).
48. Chandel, N.; Budinger, G.R.S. y Schumacker, P.T. Molecular oxygen modulates cytochrome c oxidase Function. *J. Biol. Chem.* 271, 18672 – 18677 (1996).
49. Webster, K.A. Regulation of glycolytic enzyme RNA transcriptional rates by oxygen availability in skeletal muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 77, 19-28 (1987).
50. Ebert, B.L.; Gleadle, J.M.; O’rourke, J.F.; Bartlett, S.M.; Poulton, J. y Ratcliffe, P.J. Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem. J.* 313, 809-814 (1996).
51. Kobayashi, S. y Millhorn, D.E. Hypoxia regulates glutamate metabolism and membrane transport in rat PC12 cells. *J. Neurochem.* 76, 1935-1948 (2001).
52. Medina, A. M. Glutamine Metabolism: Nutritional and Clinical Significance. *J. Nutr.* 131, 2539S–2542S (2001).
53. Rodríguez-Enríquez, S; Torres-Márquez, M.E. y Moreno-Sánchez, R. Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch. Biochem Biophys.* 375, 21-30 (2000).
54. Kallinowski, F; Runkel, S; Fortmeyer, H.P.; Förster, H. y Vaupel, P. L- Glutamine: a major substrate for tumor cells in vivo? *J Cancer Res Clin Oncol.* 113: 209-15 (1987).

55. Roche, T.E.; Baker J.C.: Yan, X; Hiromasa, Y; Gong, X; Peng, T; Dong, J; Turkan, A y Kasten, S.A. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 70: 33-75 (2001).
56. Moreno-Sánchez, R; Devars, S; López-Gómez, F; Uribe, A. y Corona, N. Distribution of control of oxidative phosphorylation in mitochondria oxidizing NAD-linked substrates. *Biochim Biophys Acta* 1060:284-92 (1991).
57. Moreno-Sánchez, R; Hogue, B.A. y Hansford, R.G. Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *Biochem J.* 268: 421-8 (1990).
58. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 588–594 (1998).
59. Vaupel, P. The role of Hypoxia-Induced factors in tumor progresión. *Oncologist.* 9, 10-17 (2004).
60. Hall, P.A. p53 – integrating the complexity (Editorial). *J. Pathol.* 180: 1-5 (1996).
61. Levine, A.J.; Feng, Z.; Mak, T.W.; You, H. y Jin, S. Coordination and communication between the p53 and IGF-1–AKT–TOR signal transduction pathways. *Genes Dev.* 20, 267-275 (2006).
62. Ravi, R.; Mookerjee, B.; Bhujwala, Z. M.; Sutter, C. H.; Artemov, D.; Zeng, Q.; Dillehay, L. E.; Madan, A.; Semenza, G. L. y Bedi, A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1a. *Genes Develop.* 14, 34–44 (2000).

63. Graeber, T.G.; Osmanian, C.; Jacks, T.; Housman, D.E.; Koch, C.J.; Lowe, S.W. y Giaccia, A.J. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91 (1996).
64. Matoba, S.; Kang, J.G.; Patino, W.D.; Wragg, A.; Boehm, M.; Gavrilova, O.; Hurley, P.J.; Bunz, F. y Hwang, P.M. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650-1653 (2006).
65. Hubert, A.; Paris, S.; Piret, J.P.; Ninane, N.; Raes, M. y Michiels, C. Casein kinase 2 inhibition decreases hypoxia inducible factor-1 activity under hypoxia through elevated p53 protein level. *J Cell Sci.* 119, 3351-3362 (2006).
66. Gornall, A.G.; Bardwill, C.J. y David, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 177, 751-766 (1949).
67. Marín-Hernández, A. Evaluación del efecto de nuevos compuestos antineoplásicos sobre el metabolismo energético en mitocondrias y células. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM, 2003.
68. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
69. Marín-Hernández, A.; Rodríguez-Enríquez, S.; Vital-González, P.A.; Flores-Rodríguez, F.L.; Macías-Silva, M.; Sosa-Garrocho, M. y Moreno-Sánchez, R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS JI.* 273, 1975-1988 (2006).

70. Rodríguez-Zavala, J.S., Pardo, J.P. y Moreno-Sánchez, R. Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by inorganic phosphate, Mg^{2+} , and other effectors. *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 78-84 (2000).
71. Hernández-Esquivel, L.; Marín-Hernández, A.; Pavón, N.; Carvajal, K. y Moreno-Sánchez, R. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 79-88 (2006).
72. Heini, H.G.; Gebhardt, R; Brecht, A. y Mecke, D. Purification and characterization of rat liver glutaminase. *Eur. J. Biochem.* 162, 541-546 (1987).
73. Bergmeyer HU (ed.) Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim (1974).
74. Stacey, S.N.; Bartholomew, J.S.; Ghosh, A.; Stern, P.L; Mackett, M. y Arrand, J.R. Expression of human papillomavirus type 16 E6 protein by recombinant baculovirus and use for detection of anti-E6 antibodies in human sera. *J. Gen. Virol.* 73, 2337-2345 (1992).
75. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).
76. Frantz, B.; Nordby, E.C.; Bren, G.; Steffan, N.; Paya, C.V.; Kincaid, R.L.; Tocci, M.J.; O'Keefe, S.J. y O'Neill, E.A. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *EMBO J.* 13: 861 -870 (1994).
77. Rodríguez-Enríquez, S.; Juárez, O.; Rodríguez-Zavala, J.S. y Moreno-Sánchez, R. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.* 268: 2512-2519 (2001).

78. McCormack, J.G. Characterization of the effects of Ca²⁺ on the intramitochondrial Ca²⁺-sensitive enzymes from rat liver and within intact rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 231, 581-595 (1985).
79. Pérez-Gómez, C.; Campos-Sandoval, J.A.; Alonso, F.J.; Segura, J.A.; Manzanares, E.; Ruiz-Sánchez, P.; González, M.E.; Márquez, J. y Matés, J.M. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J.* 386, 535–542 (2005).
80. An, W.; Kanekal, M.; Simon, M.C.; Maltepe, E.; Blagosklonny, M.V. y Neckers, L.M. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1a. *Nature* 392, 405-408 (1998).
81. Goda, N.; Ryan, H.E.; Khadivi, B.; McNulty, W.; Rickert, R.C. y Johnson, R.S. Hypoxia-Inducible Factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 23, 359-369 (2003).
82. Favaro, E.; Nardo, G; Persano, L.; Masiero, M. *et al.* Hypoxia inducible factor-1 α inactivation unveils a link between tumor cell metabolism and hypoxia-induced cell death. *Am J Pathol.* 173, 1186-201 (2008).
83. Walenta, S.; Schroeder, T. y Mueller-Klieser, W. Lactate in solid malignant tumors: Potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr. Med. Chem.* 11, 2195-2204 (2004).
84. Vaupel, P.; Schaefer, C. y Okunieff, P. Intracellular acidosis in murine fibrosarcomas coincides with ATP depletion, hypoxia, and high levels of lactate and total Pi. *NMR Biomed.* 7, 128-136 (1994).
85. Hochachka, P.W.; Buck, L.T.; Doll, C.J. y Land, S.C. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms

- for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 9493-9498 (1996).
86. Sennoune, S.; Bakunts, K.; Martínez, G.M.; Chua-Tuan, J.L.; Kebir, Y.; Attaya, M.N. y Martínez-Zaguilán, R. Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286, 1443-1452 (2004).
87. Chandel, N. S.; Maltepe, E.; Goldwasser, E.; Mathieu, C.E.; Simon, M.C. y Schumacker, P.T. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 11715–11720 (1998).
88. Rempel, A.; Mathupala, S.P.; Griffin, C.A.; Hawkins, A.L. y Pedersen, P.L. Glucose catabolism in cancer cells: Amplification of the gene encoding type II Hexokinase. *Cancer Res*. 56, 2468-2471 (1996).
89. Hüttemann, M; Kadenbach, B y Grossman, L.I. Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene* 267, 111-123 (2001).
90. Fukuda, R.; Zhang, H.; Kim, J.; Shimoda, L.; Dang, C.V. y Semenza, G.L. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129, 111-122 (2007).
91. Webster, K. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J. Exp. Biol*. 206, 2911-2922 (2003).
92. Hervouet, E.; Císková, A; Demont, J.; Vojtísková, A. *et al.* HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer. *Carcinogenesis* 29, 1528–1537 (2008).

93. Riby, J.E; Firestone, G.L. y Bjeldanes, L.F. 3,30-Diindolylmethane reduces levels of HIF-1a and HIF-1 activity in hypoxic cultured human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1858 – 1867 (2008).
94. Bell, E.L.; Klimova, T.A.; Eisenbart, J.; Schumacker, P.T. y Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5737-5745 (2007).
95. Starkov, A.A.; Fiskum, G.; Chinopoulos, C.; Lorenzo, B.J.; Browne, S.E.; Patel, M.S. y Beal, M.F. Mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci.* 24, 7779-7788 (2004).
96. Guzy, R.D. y Schumacker, P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91, 807-819 (2006).
97. Humphries, K.M. y Szwedda, L.I. Selective inactivation of α -Ketoglutarate dehydrogenase and piruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hidroxy-2-nonenal. *Biochemistry.* 37, 15835-15841 (1998).
98. Bensaad, K. y Vousden, K.H. p53: new roles in metabolism. *Trends cell biol.* 17, 286-291 (2007).