



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO
EN CAPAS CELULARES QUIESCENTES Y
PROLIFERATIVAS DE ESFEROIDES
TUMORALES MCF-7

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

EDNA AYERIM MANDUJANO TINOCO

TUTOR:

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez





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.

1. DATOS DEL ALUMNO

Mandujano
Tinoco
Edna Ayerim
5792-2360
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305117151

2. DATOS DEL TUTOR

Doctor en Ciencias Biomédicas
Juan Carlos
Gallardo
Pérez

3. DATOS DEL SINODAL 1

Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

4. DATOS DEL SINODAL 2

Dra.
Alette
Ortega Gómez

5. DATOS DEL SINODAL 3

Dra.
Sara
Rodríguez
Enríquez

6. DATOS DEL SINODAL 4

Dra.
Vilma Araceli
Maldonado Lagunas

7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO

Análisis del metabolismo energético en capas celulares quiescentes y proliferativas de esferoides tumorales MCF-7.
64 pp
2011

A mis padres

**ANÁLISIS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN CAPAS CELULARES
QUIESCENTES Y PROLIFERATIVAS DE ESFEROIDES TUMORALES MCF-7**

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de licenciatura se realizó en su totalidad en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México. El trabajo experimental y la escritura de la tesis se realizaron bajo la tutoría del Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez y la Dra. Sara Rodríguez Enríquez.

Extiendo especialmente mi más sincero agradecimiento a la Dra. Sara Rodríguez por su invaluable apoyo en la asesoría experimental y de escritura así como en la mediación de recursos materiales, sin la cual esta tesis no hubiera sido posible.

Agradezco también los conocimientos compartidos por el Dr. Alvaro Marín Hernández y su asesoría en la realización de diversos experimentos.

Asesor

Sustentante

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez

Edna Ayerim Mandujano Tinoco

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mis ángeles guardianes, mis más sabios consejeros y amigos: mamá (Angélica) y papá (Joaquín), por amarme con suavidad pero también con la fortaleza necesaria para emprender aventuras a mi lado y así enseñarme a volar, a soñar, a luchar y a vivir. Porque sin ustedes mis ayeres siempre serían imposibles futuros, en esta y todas las vidas, en este y todos los vuelos, tendrán mi más profunda admiración y eterno amor.

A mi novio, por todos los momentos compartidos, por el amor, las ilusiones y la fortaleza. A mis amigos, por los caminos que hemos recorrido juntos, soñando siempre. A la familia que hemos construido en el laboratorio, por las sonrisas y las locuras, por los consejos y la amistad.

A mi asesor Juan Carlos, porque tus enseñanzas, regaños y consejos me han ayudado a crecer como alumna y como persona, por la confianza y la paciencia, gracias. A mi también asesora, Sara, por creer en mí y abrirme las puertas al mundo de la ciencia y el conocimiento. A mis sinodales y profesores, que con su experiencia me guiaron para alcanzar esta meta tan anhelada.

Y a todos aquellos que se han cruzado en mi camino y con tan solo una sonrisa me han hecho comprender el verdadero significado que tiene la vida.

GRACIAS

*Al dormir sueño, y cuando despierto me doy cuenta que vivo
Vivo para existir, para crear, para gozar y para sufrir
Y si vivir es soñar, en cada sueño he vivido.
Me gusta dormir porque me gusta soñar,
Y me gusta soñar porque me gusta vivir.*

EAMT

RESUMEN

El modelo de los esferoides multicelulares tumorales (EMCT) mimetiza las condiciones fisiológicas *in vivo* de los tumores sólidos. Se ha descrito que los EMCT con diámetros mayores a 0.5 mm presentan tres tipos de capas: a) las capas internas, constituidas por células hipóxicas y necróticas; b) las intermedias de células en hipoxia y metabólicamente inactivas o quiescentes y c) las capas externas, constituidas por células en alto grado de proliferación. Debido a esta organización espacial de las capas, se generan gradientes de oxígeno y nutrientes, lo que influye en el metabolismo del tumor.

En esferoides jóvenes (0.5 mm diámetro) del carcinoma de HeLa (cérvix, estadio IV) y en otros, la mitocondria provee el 63% del ATP utilizado durante el crecimiento. Sin embargo, en EMCT adultos la glucólisis predomina con 80% en el suministro de energía al estabilizarse HIF-1 α , el cual es un modulador clave del GLUT y la HK.

Con la intención de demostrar la contribución energética de cada capa del tumor, se aislaron las capas proliferativa y quiescente del esferoide maduro del carcinoma de MCF-7 (mamario, estadio III) y se realizó un análisis global: proteómico, cinetómico y fluxómico de la fosforilación oxidativa (FO) y de la glucólisis.

Ambas capas celulares mostraron un flujo glucolítico similar (4.5 y 3 nmol/min/10⁶ células) debido a que el nivel de expresión de HIF-1 α (68-88%) y de sus blancos glucolíticos GLUT1, HKII y LDH, así como la actividad de HK y LDH fue semejante en las células quiescentes y proliferativas. En contraste, la FO aumentó 2.1 veces (de 25 a 53 ngAO/min/10⁶ células) en las capas proliferativas comparado con las capas quiescentes, correlacionando con el incremento en los contenidos de proteína de 2-OGDH (8 veces), glutaminasa isoforma K (18 veces), NADH deshidrogenasa (2.5 veces), COX IV (2.6 veces), ATPasa (2.9 veces) y PDH (2 veces), así como en la actividad de SDH (1.3 veces) y COX, que tiende a incrementar.

En un intento por determinar los mecanismos involucrados en la transición del metabolismo en ambas capas del esferoide, medimos la expresión de algunos factores transcripcionales que modulan positivamente la FO (P32, H-ras) y la biogénesis

mitocondrial (c-myc), así como de algunas proteínas autofágicas, como Atg7, Beclin, LC3B, Bnip3 y LAMP. Los resultados indican que la sobre-expresión de p32, h-Ras y c-Myc en la capa proliferativa aumenta el contenido de proteínas mitocondriales, actividades enzimáticas y por lo tanto el flujo de la FO, mientras que la activación mitofágica en la capa quiescente puede estar involucrada en la disminución del flujo de la FO.

Estos resultados muestran que las subpoblaciones celulares que conforman a los EMCT desarrollan adaptaciones diferentes de su metabolismo energético, dependiendo de las condiciones microambientales en las que se encuentran. Esta información puede ser utilizada para el futuro desarrollo de fármacos antineoplásicos que sean dirigidos a blancos metabólicos y que puedan ser utilizados en combinación con los fármacos convencionales (terapia multisitio).

ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico
ALD – Aldolasa
ANT – Translocador de nucleótidos de adenina
ARN – Ácido ribonucleico
ATP – Adenosín trifosfato
ATPasa – ATP sintetasa
COX – Citocromo oxidasa
DTT – Ditioneitol
EDTA – Ácido etilendiaminotetra-acético
EGTA – Ácido tetra-acético etilenglicol
EMCT – Esferoides multicelulares tumorales
ENO – Enolasa
FO – Fosforilación oxidativa
GA – Glutaminasa
GAPDH – Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDH – Glutamato deshidrogenasa
Gln – Glutamina
Glut 1 – Isoforma 1 del transportador de glucosa
Glut 3 – Isoforma 3 del transportador de glucosa
G6PDH – Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
HIF-1 – Factor inducible por hipoxia 1
HK – Hexocinasa
HPI – Hexosa fosfato isomerasa
LDH – Lactato deshidrogenasa
ND1 – Subunidad 1 del complejo 1 de la cadena respiratoria
PDH – Piruvato deshidrogenasa
PFK – Fosfofructo cinasa
PGAM – Fosfoglicerato mutasa
PGK – Fosfoglicerato cinasa
PMSF – Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POX – Prolín oxidasa
PRL - Proliferativas
QS – Quiescentes
RE – Retículo endoplásmico
SCAAT – Succinil-CoA acetoacetyl transferasa
SDH – Succinato deshidrogenasa
TIGAR – Regulador de la apoptosis y glucólisis inducida por TP53
2OG – 2-oxoglutarato
2OGDH – 2-oxoglutarato deshidrogenasa

CONTENIDO

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer.....	1
1.2 Metabolismo energético atípico en células tumorales de rápido crecimiento...	3
1.3 Esferoides Multicelulares Tumorales (EMCT).....	8
1.4 Metabolismo energético de EMCT.....	13
1.5 Técnicas de disociación selectiva de capas celulares de EMCT.....	17
1.6 Metabolismo energético en capas quiescentes de EMCT.....	18

CAPITULO II.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 General.....	20
2.1.2 Particulares.....	20
2.2 JUSTIFICACIÓN.....	21
2.3 HIPÓTESIS.....	21

CAPITULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Propagación de los cultivos en monocapa.....	22
3.2 Generación de EMCT - MCF-7.....	22
3.3 Extracción de capas celulares de EMCT - MCF-7.....	23
3.4 Determinación de flujos energéticos.....	23
3.4.1 Fosforilación Oxidativa.....	23
3.4.2 Glucólisis.....	24
3.5 Determinación de actividades enzimáticas.....	24
3.5.1 Hexocinasa.....	25
3.5.2 Hexosa Fosfato Isomerasa.....	25
3.5.3 Lactato Deshidrogenasa.....	25

3.5.4 Citocromo Oxidasa.....	25
3.5.5 Succinato Deshidrogenasa.....	25
3.6 Extracción de proteínas y Western blot.....	26
3.7 Análisis estadístico.....	27

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 Crecimiento de EMCT - MCF-7.....	28
4.2 Marcadores de proliferación y quiescencia en ambas capas de EMCT - MCF-7..	30
4.3 Análisis proteómico y cinetómico de las vías energéticas en ambas capas de EMCT MCF-7.....	32
4.3.1 Glucólisis.....	32
4.3.2 Fosforilación Oxidativa.....	37
4.3.3 Aporte a la síntesis de ATP de cada vía energética.....	42
4.4 Expresión de proteínas autofágicas y factores transcripcionales asociados al metabolismo mitocondrial en ambas capas de EMCT - MCF 7.....	45
4.5 Factores transcripcionales.....	45
4.6 Proteínas autofágicas.....	47

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN..... 49

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES..... 59

REFERENCIAS..... 60

APÉNDICE I

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen genético en el que modificaciones metabólicas promueven la conversión de células normales a células malignas. Las células tumorales se caracterizan por su acelerado crecimiento y descontrolada división celular, así como por su alto potencial de invasión y metástasis lo que compromete las funciones de los tejidos normales del hospedero ^[1].

Cáncer en México

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad anual (13% del total) con 7.6 millones de muertes en el 2008, siendo el cáncer de mama la neoplasia maligna más frecuente en mujeres (23%), con un número estimado de 1,160,000 de casos nuevos diagnosticados y contribuyendo a más de 400,000 muertes por año ^[2, 3].

En México, de acuerdo a estudios del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) de 2009, el cáncer ocupa el tercer lugar en la lista de las principales causas de muerte (después de la diabetes y las cardiopatías) ^[4]. Desde el 2006, los tumores de mama son los que provocan mayor número de decesos femeninos (15% del total), apenas superando al cáncer cérvico-uterino (14%), posicionando a este tipo de neoplasia como la de mayor importancia en nuestro país ^[5-7].

Tumorigénesis

La tumorigénesis es un proceso multifactorial promovido por una serie de alteraciones genéticas (inserciones, amplificaciones y deleciones) progresivas en al menos tres tipos de clases de genes, cuyo resultado es la desregulación de los mecanismos biológicos que controlan el crecimiento y la diferenciación celular (**Tabla 1**). ^[8]

Como parte de este proceso, todos los tumores estudiados hasta la fecha se adaptan a su entorno hostil promoviendo alteraciones en su metabolismo, particularmente en el metabolismo energético, para mantener altos los niveles de ATP y alimentar procesos de alta dependencia energética como son la duplicación celular, fenómenos de transporte, movimiento de iones, etc.

Tabla 1. Alteraciones genéticas implicadas en la tumorigénesis.

Clase	Mutación	Función	Ejemplos	Referencias
Oncogenes	Un alelo: <i>Activación</i>	- Estimulación del crecimiento, la división y la diferenciación celular.	<i>H-Ras</i> – transducción de señales mitogénicas. <i>C-Myc</i> - factor de transcripción.	[8, 9]
Supresores de tumor	Ambos alelos: <i>Inactivación</i>	-Estimulación del ciclo celular. -Inhibición de muerte celular.	<i>p53, pRb</i> – Factores de transcripción. <i>VHL</i> - Vía de HIF	[8, 10]
Genes estabilizadores	Ambos alelos: <i>Inactivación</i>	-Disminución de los mecanismos de reparación del ADN.	<i>ATM, BRCA1/2</i> - Genes reparadores.	[8, 10, 11]

1.2 Metabolismo energético atípico en células tumorales de rápido crecimiento.

Hanahan y Weinberg (2000), propusieron que existen seis alteraciones o signos esenciales (hallmarks) en la fisiología tumoral que dictan un comportamiento maligno: 1) autosuficiencia para generar señales de crecimiento, 2) insensibilidad a inhibidores de crecimiento, 3) evasión a la muerte celular programada (apoptosis), 4) potencial de replicación ilimitado, 5) angiogénesis sustentada, 6) invasión y metástasis. Recientemente y debido a amplias evidencias en la literatura se han incluido otros signos, de los cuales destaca la acelerada glucólisis como una adaptación del tumor a un microambiente hostil ^[12, 13].

Glucólisis alterada y mitocondrias tumorales

En 1956, el científico alemán Otto Warburg propuso que los tumores de rápido crecimiento presentan un aumento del flujo glucolítico aeróbico debido a un daño irreversible en la función mitocondrial. Esta aseveración, conocida como hipótesis de Warburg, ha derivado en un dogma en el campo del metabolismo tumoral: siendo la glucólisis muy activa en tumores, ésta debe de sostener la alta demanda energética del tumor en crecimiento ^[14]. Debido a esto, la inhibición de la glucólisis tumoral podría ser una estrategia adecuada para combatir el cáncer ^[15-17].

Efectivamente, se ha demostrado que distintas líneas celulares tumorales de rápido crecimiento humanas (HeLa, MCF7 y U87MG) y de roedor (AS-30D, Morris 7800, Hepatomas Novikoff) muestran un incremento substancial en el flujo glucolítico (2-17 veces) en comparación con las células normales o su tejido de origen ^[18-20]. Aunque muchos de los estudios no hacen un análisis global de la cantidad y actividad de enzimas glucolíticas, se ha demostrado que en HeLa, el alto flujo glucolítico se acompaña de una sobre-expresión (2-7 veces) de todas las enzimas de la vía, a excepción de la PGAM y la LDH, que disminuyen su actividad de 2 a 7 veces en comparación con hepatocitos de rata ^[18, 19, 21]. Asimismo, se ha reportado que para cáncer humano de mama la actividad de HK, ALD y LDH es 3.7 a 7 veces incrementada en comparación con tejido normal ^[21, 22].

Bajo el supuesto de que la glucólisis es la única vía energética que mantiene el crecimiento de los tumores, durante muchos años se soslayó el papel de la mitocondria

tumoral, ya que se consideró que podría no ser funcional ^[23]. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que no todos los tumores (glándula mamaria, hueso, hígado, pulmón, cérvix entre otros) dependen exclusivamente de esta vía energética, ya que algunos utilizan equitativa o preferencialmente a la FO para la obtención de ATP [18, 20, 21, 24, 25].

En la **Tabla 2** se muestran evidencias experimentales que han demostrado que las mitocondrias de ciertos tumores de rápido crecimiento son funcionales. Adicionalmente algunos factores transcripcionales relacionados con la expresión de componentes respiratorios y mitocondriales también se ha visto que son modulados en células de cáncer (**Tabla 3**).

Desafortunadamente, los estudios que se han realizado acerca del mecanismo de regulación de estos factores transcripcionales sobre las enzimas mitocondriales blanco han sido únicamente con una aproximación experimental, es decir, evaluando solamente el RNA mensajero o cantidad de proteína pero no la actividad de las enzimas.

Tabla 2. Cambios en el metabolismo mitocondrial de células tumorales de rápido crecimiento en comparación con células normales.

Enzima	No-Tumoral		Tumoral	
	Tipo celular	Actividad	Tipo celular	Actividad
Metabolismo del piruvato				
PDH	Glándula mamaria de rata Hígado de rata	1-1.4 U/g peso de tejido fresco	Ascitis de rata Ehrlich Carcinoma epidérmico de rata	0.026-0.1 U/g peso de tejido fresco
Metabolismo de glutamina				
Transporte plasmático de Gln	Hepatocitos de rata Células endoteliales de hígado de rata	0.09-2.4 mU/mg de proteína celular	Hepatoma H4 Neuroblastoma humano	0.42-14 mU/mg de proteína celular
Transporte mitocondrial de Gln	Mitocondrias de cerebro de rata Mitocondrias de riñón de rata	3-7.5 mU/mg de proteína	Carcinoma hepatocelular de rata Ascitis de Ehrlich	33-52 mU/mg de proteína celular
GA	Hígado de rata Músculo de rata	0.02-0.45 μ kat/g de proteína celular	Carcinoma pulmonar de rata	1.26 μ kat/g de proteína celular
	Hígado humano	25 mU/mg de proteína celular	Carcinoma humano de pulmón	116-133 mU/mg de proteína celular
GDH	Leucocitos humanos	44 mU/ mg de proteína celular	Mitocondria de ascitis Ehrlich de rata	750 mU/mg de proteína
	Mitocondria de hígado de bovino	186 mU/mg de proteína		
Aspartato transaminasa	Hígado de rata	6.73 μ kat/g de proteína celular	Carcinoma pulmonar de Lewis	1.02 μ kat/g de proteína celular
Mitochondrial NADP⁺ ME	Hepatocitos de rata	\leq 1 mU/ mg de proteína celular	Hepatoma AS-30D Timoma de ratón Leucemia humana Hepatoma de rata	25-80 mU/ mg de proteína celular

Metabolismo de cuerpos cetónicos				
SCAAT	Hepatocitos de rata	4.6 mU/ mg de proteína celular	Hepatocarcinomas de rata JM2, RLT, H411E, MCA, RIT 7777	45-960 mU/ mg de proteína celular
Metabolismo de prolina				
POX	Homogenados de hígado de rata	4.7 mU/ mg homogenado de proteína	Cáncer colorectal humano RKO, HT29, HCT15	15 mU/ mg de proteína celular

Modificado de Rodríguez-Enríquez *et al.* 2011 ^[26]

Tabla 3. Factores transcripcionales que modulan positivamente la actividad mitocondrial en células tumorales.

Factor transcripcional	Función	Enzimas mitocondriales	Referencia
p32	Promueve la FO	↑ Complejo I ↑ Complejo IV ↑ PDH	[27]
p53	Activación: TIGAR - Inhibe glucólisis DRAM - Autofagia ATG - Autofagia SCO2	↑ COX IV * ↑ GA	[28]
H-Ras	Promueve la FO	↑ COX IV * ↑ Complejo I * ↑ Complejo V *	[29]
C-Myc	Induce biogénesis mitocondrial en áreas oxigenadas.	↑ GA *	[30, 31]
PGC-1α	Induce biogénesis mitocondrial Promueve la FO	↑ COX IV * ↑ Complejo V	[32]

↑ Sobreexpresión de la proteína

*No se mide actividad

Como es claro de la literatura, no existe un análisis sistemático donde se estudie la transcripción, traducción y función de las proteínas mitocondriales de células tumorales. De igual manera, la mayoría de los análisis de metabolismo energético se realizan en cultivos bidimensionales, que son homogéneos en cuanto al estado nutricional, tensión de oxígeno, estado proliferativo, pH y eliminación de productos de desecho, pero no en modelos más parecidos a la fisiología propia del tumor sólido, por lo que resulta necesario reevaluar cada propuesta para confirmar las adaptaciones del metabolismo energético de las células tumorales.

1.3 Esferoides Multicelulares Tumorales (EMCT)

En 1970 Sutherland y colaboradores desarrollaron el modelo *in vitro* del esferoide multicelular tumoral (EMCT) a partir de células tumorales humanas para evaluar la eficacia de fármacos terapéuticos. Este modelo ha sido considerado como el sistema más fisiológico en el estudio del cáncer, ya que conserva las características histomorfológicas, bioquímicas, funcionales y microambientales que presenta un tumor sólido *in vivo* mimetizando los estados iniciales de formación de un tumor sólido no vascular y adquiriendo la resistencia a fármacos antineoplásicos que se observa en los tumores sólidos *in vivo* ^[33].

Morfología.

Los esferoides tumorales son agregados celulares que forman una estructura tridimensional. Existen dos tipos:

(a) Los EMCT clonogénicos que provienen de una célula tumoral cultivada en una superficie antiadherente y estática, en donde se genera un agregado celular inicial el cual crecerá después de someterse a una fase de agitación orbital (40-50 rpm). La integridad del esferoide se mantiene por el incremento de uniones estrechas, comunicantes y desmosomas entre las células, E-cadherina y un aumento de matriz extracelular ^[34].

(b) Los EMCT agregados, en donde la fase de agitación inicial evita la formación del núcleo primario y favorece la agregación de cada célula tumoral, generalmente no se

forma un centro necrótico y la mayor parte de las capas constan de células proliferativas que pueden ser disociadas fácilmente por simple acción mecánica ^[34].

Ventajas del uso de EMCT

A continuación se enlistan dos de las características de interés recreadas en el modelo tridimensional del EMCT para el estudio de las adaptaciones del metabolismo energético, que pueden encontrarse en las diferentes subpoblaciones celulares que conforman al esferoide.

1. Compartimentación (microzonas) y viabilidad celular. A nivel estructural, en esferoides clonogénicos de HeLa, Hek293, U343MG, EMTG/Ro etc. con un diámetro \geq a 500 μm se pueden distinguir tres capas de poblaciones celulares que semejan a las microzonas descritas para los microtumores sólidos, es decir las más cercanas a los vasos sanguíneos (normóxicas) y las más alejadas de ellos (hipóxicas) **(Fig 1 y Tabla 4)** ^[34, 35].

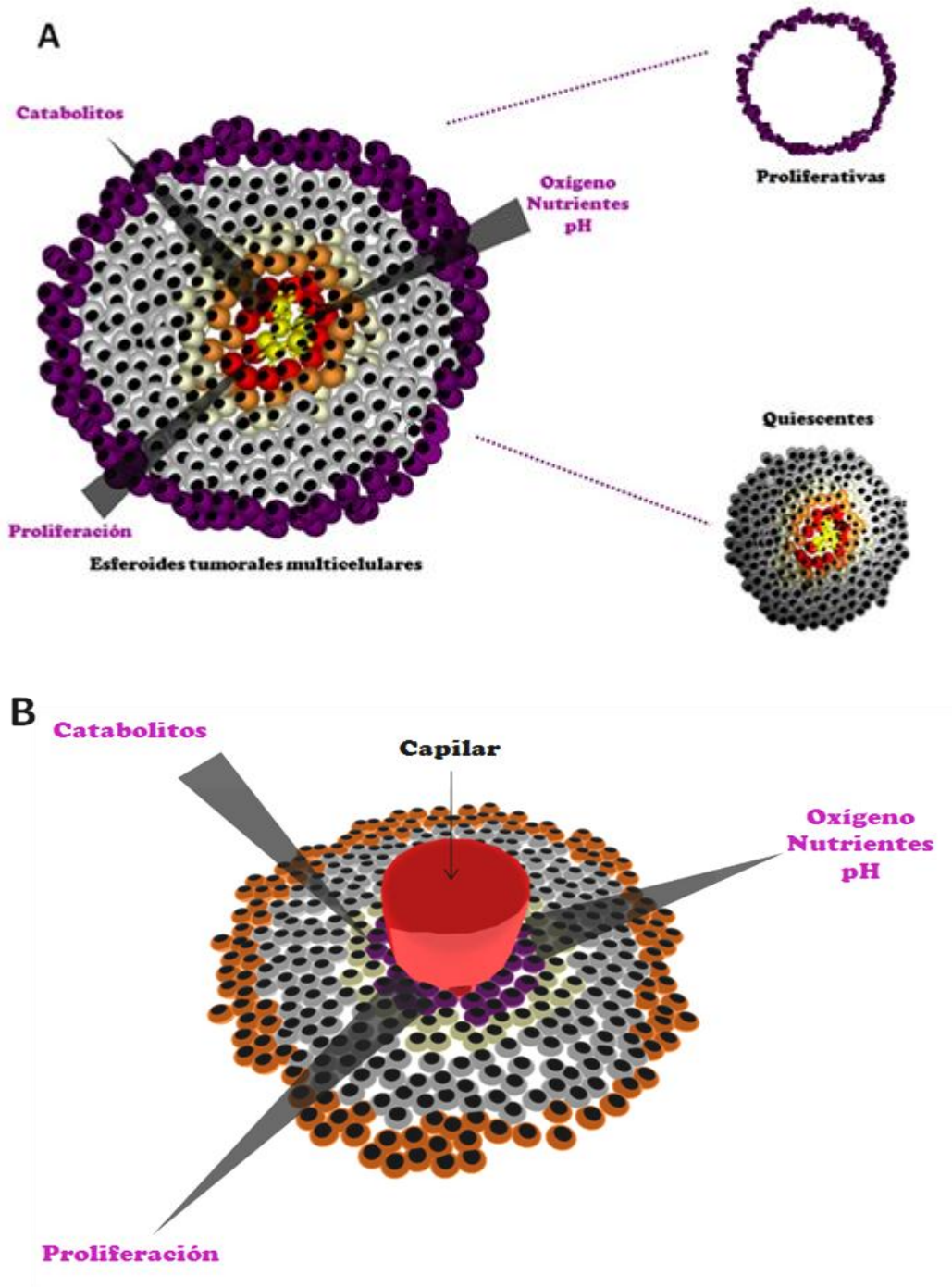


Figura 1. A) Estructura de un esferoide tumoral multicelular clonogénico con diámetro > 500 μm, se representan las tres capas celulares principales: proliferativas, quiescentes y el centro necrótico así como la generación de gradientes metabólicos (Modificado de [34]). **B)** Estructura de un microtumor poco vascularizado simulando las tres capas celulares mimetizadas en un esferoide tumoral multicelular.

Tabla 4. Poblaciones celulares (microzonas) que conforman al EMCT.

Capa celular (microzonas)	Distancia de la periferia (μm)	Volumen que ocupa (%)	Características	Referencias
Externa/ Proliferativa	0-100	5-10	-Alta tasa de proliferación -En contacto con altos índices de oxígeno y nutrientes -Alta capacidad metastásica	[33, 35, 36]
Intermedia/ Quiescente	100-500	25-45	-Células quiescentes con tendencia a diferenciarse -Capacidad metabólica baja -Expuestas a presiones selectivas de hipoxia y nutrientes	
Necrótica/ Hipóxica	>500	50-70	-Células en proceso de apoptosis -Baja provisión de oxígeno y nutrientes	

2. Gradientes metabólicos. Se ha documentado que la deficiencia de nutrientes, la generación de hipoxia (estado en el que la disponibilidad de oxígeno está reducida) ^[37], el incremento de la acidosis y la acumulación de productos tóxicos de desecho en las zonas necróticas, tienen una influencia importante en el crecimiento y las adaptaciones metabólicas que desarrollan los esferoides **(Fig. 1 y Tabla 5)**.

Tabla 5. Mediciones de pO₂, glucosa, pH, lactato y ATP reportadas para esferoides tumorales.

Condiciones	Capa proliferativa	Capa quiescente	Centro necrótico	Técnica	Referencia
pO ₂ (mm Hg)	120 (180 μM)	50-75 (75-110 μM)	1-5 (1-7.5 μM)	Microelectrodo	[38]
Glucosa	>21 μmol/g	12-21 μmol/g	≤12 μmol/g	Bioluminiscencia	[39]
pH	7.3	7.1	6.9 - 7.0	Microelectrodo	[40]
Lactato	1.5-3 μmol/g	6-10.5	>10.5 μmol/g	Bioluminiscencia	[39]
ATP	0.3-0.6 μmol/g	1.2-1.8	0-0.3	Bioluminiscencia	[39]

Es importante mencionar que las concentraciones de oxígeno y pH reportadas para las diferentes microzonas de un esferoide son heterogéneas, debido a que la mayoría de los métodos utilizados son invasivos y pueden destruir parte del tejido, sobreestimando la medición al facilitar la difusión de O₂ desde el medio externo ^[41]. Para el caso de la glucosa, el lactato y el ATP las mediciones no se han realizado con técnicas enzimáticas.

De acuerdo a las observaciones mencionadas con anterioridad, se puede concluir que los esferoides tumorales representan un modelo previo a la neovascularización apropiado para analizar los efectos metabólicos en sus distintas capas.

1.4 Metabolismo energético de EMCT

Pocos estudios sobre metabolismo energético de esferoides tumorales completos se han realizado en el campo, algunos de estos muestran que la función mitocondrial disminuye durante el crecimiento del esferoide cuando se desarrollan las capas de células quiescentes y el centro necrótico (**Tabla 6**).

Tabla 6. Metabolismo energético de EMCT maduros completos

Flujos				
Línea celular	Actividad mitocondrial (Respiración total)		Glucólisis (Lactato generado)	Referencia
BEX-c	44		N.D	[42]
WIX-c	78		N.D	
Rat1-TI	36 Rh123/célula 7		1.08 Consumo glucosa 3.6	[43, 44]
MR1	48 Rh123/célula 7		10.2 Consumo glucosa 6	
V-79	15		N.D	[45]
EMT6/Ro	48		Consumo glucosa 5.6	[38, 46]
HeLa	FO 1.5		18.3	[47]
	enzima	actividad	proteína	
Glioma humano	LDH	√	X	[48]
HeLa	COX	√	√	[47]
	HK	√	√	
	GAPDH	√	√	
	GLUT1	X	√	
	ANT	X	√	

*Respiración Total en (ngAO/min/10⁶ células); Consumo glucosa en (mol/min/10⁶ células); Lactato generado (nmol/min/10⁶ células); FO en (ngAo/min/10⁶ células); N.D. no determinado; √ evaluado.

Como puede observarse, los estudios del metabolismo energético que se han realizado en esferoides completos generalmente se enfocan en el estudio de una sola vía energética. Desafortunadamente los estudios sobre función mitocondrial analizan la respiración celular total, sin tomar en cuenta la actividad de enzimas no mitocondriales dependientes de oxígeno, que se ha reportado se encuentra de 2.5 a 5 veces incrementada en esferoides tumorales ^[49]. Asimismo, la velocidad glucolítica puede sobreestimarse al evaluar el consumo de glucosa o la generación de láctico sin considerar la presencia de otras vías consumidoras o generadoras de dichos metabolitos. En cuanto a las enzimas de ambas vías, es evidente la ausencia de estudios paralelos de actividad y expresión de proteína para determinar si la disminución o el aumento en el contenido de proteína presentan un efecto a nivel de la actividad de la enzima.

En 2008, nuestro grupo de trabajo realizó un análisis riguroso del metabolismo energético en esferoides completos de HeLa, un cérvix en estadio IV y Hek 293, una línea transformada de riñón fetal. Este estudio reveló que la FO es la vía que provee la mayor cantidad de energía (ATP) para el crecimiento del microtumor. Sin embargo, cuando los EMCT alcanzan su máximo crecimiento (1 mm de diámetro), observamos que ocurre una reprogramación metabólica en donde la glucólisis incrementa hasta 4 veces y la FO se ve abatida. Este efecto se atribuyó a la formación del centro necrótico y la estabilización de HIF-1 α en el esferoide maduro. En la siguiente tabla se muestran los cambios metabólicos identificados en las dos condiciones experimentales, esferoides jóvenes y maduros ^[47].

Tabla 7. ATP(%) proveniente de ambas vías energéticas en EMCT completos.

Tipo celular	% ATP	% ATP
	FO	Glucólisis
HeLa		
jóvenes	60	40
maduros	20	80
HeK293		
jóvenes	60	40
maduros	20	80

De manera interesante, cuando se utilizaron inhibidores glucolíticos para disminuir la proliferación del tumor, como la 2-desoxiglucosa y el gosispol, el crecimiento tumoral se vio disminuido únicamente un 50-60%, lo que sugiere que existe una fracción del esferoide maduro cuya proliferación depende de la FO^[47].

Debido a los gradientes de oxígeno y nutrientes promovidos por la estructura tridimensional que adquieren los esferoides tumorales, el comportamiento metabólico determinado en esferoides maduros completos solo refleja parcialmente la dependencia energética de cada una de las capas que conforman al esferoide, que semejan a las zonas celulares cercanas a los vasos sanguíneos y a las zonas hipóxicas de los microtumores sólidos^[50, 51]. Por lo anterior fue conveniente aislar a las subpoblaciones de células de las diferentes microrregiones mediante técnicas que las separen uniformemente y que no fraccionen la estructura del esferoide.

1.5 Técnicas de disociación selectiva de capas celulares de EMCT.

Entre los métodos utilizados para una disociación selectiva de las subpoblaciones celulares proliferativas y quiescentes provenientes de los esferoides tumorales multicelulares se encuentran:

1. Elutriación por fuerza centrífuga. Consiste en la separación de la células en base a su tamaño, utilizando dos fuerzas opuestas: la centrífuga y la de arrastre, la ventaja de esta técnica es que la viabilidad de las células se mantiene, sin embargo la pureza de las subpoblaciones no es claramente distinguible^[52].

2. Clasificación de células activadas por fluorescencia. Esta técnica separa las células en base a su tamaño, complejidad y marcadores celulares específicos reconocidos por un anticuerpo marcado con un fluoróforo (i.e. Hoechst 33342). Este método permite una separación física rápida sin dañar la estructura y la viabilidad de las células, sin embargo es una técnica costosa^[53].

3. Disociación con enzimas proteolíticas. Es una técnica de separación que implica exponer a los esferoides en una solución de tripsina a 18-20°C en agitación durante tres minutos, condiciones bajo las cuales se obtiene una fracción enriquecida de

células de la capa externa del esferoide. Es una técnica rápida, fácil y poco costosa que no fragmenta ni daña la estructura del esferoide y mantiene la viabilidad celular ^[36].

1.6 Metabolismo energético en capas quiescentes de EMCT.

Los estudios sobre la dependencia bioenergética de las capas de un EMCT son escasos y poco rigurosos. En ellos se ha intentado demostrar que la función mitocondrial (determinada como acumulación de rodamina y consumo de oxígeno) se encuentra disminuida en las células quiescentes. Desafortunadamente, se documentó que la concentración de rodamina 123 utilizada promueve un daño mitocondrial severo ^[54], además de que el consumo de oxígeno reportado no fue corregido por la respiración sensible a oligomicina, un inhibidor específico de la ATP sintasa necesario para descartar el consumo de oxígeno no mitocondrial, lo que puede interferir en la interpretación de los datos experimentales sobre la función mitocondrial y no correlacionar con las masas mitocondriales, determinadas solamente como retención de 10-nonil naranja de acridina, la cual se reportó es dependiente del potencial de membrana y por lo tanto no puede ser utilizado como un marcador de la masa mitocondrial en células vivas ^[55]; no se evaluó tampoco la función de enzimas mitocondriales ni de complejos respiratorios. Aunado a lo anterior, no se realizó un estudio paralelo del estado de la vía glucolítica, que se encuentra exacerbada en los tumores y que es por lo tanto una fuente importante de aporte de ATP (**Tabla 8**).

Tabla 8. Aparente disminución de la FO en células quiescentes de EMCT.

	Línea celular	Proliferativas	Quiescentes	Referencia
Respiración total (ngAo/min/10⁶ células)	9L	62	23	[56]
	EMT6/Ro	80	35	
Disminución en la acumulación de rodamina 123 (%)	9L	82	39	[57]
	EMT6/Ro	90	42	

Tomando en conjunto los datos presentados con anterioridad, podemos sugerir que las adaptaciones energéticas no son idénticas en cada subpoblación que integra cada capa del esferoide, por lo que la determinación específica del metabolismo energético predominante en cada subpoblación celular del EMCT, permitirá orientarnos en la selección de la mejor alternativa terapéutica.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1.1 General

Determinar el metabolismo energético predominante en las capas de células proliferativas y quiescentes de los esferoides tumorales maduros de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

2.1.2 Particulares

- Obtención de esferoides multicelulares de MCF-7 a partir de cultivos de monocapa
- Extracción de las capas celulares proliferativas y quiescentes de los esferoides tumorales por medio de tripsinización secuencial.
- En cada capa del esferoide hacer un análisis a nivel:
 - Proteómico: Determinar marcadores de quiescencia y proliferación, contenido de proteínas glucolíticas, mitocondriales, factores transcripcionales y proteínas mitofágicas.
 - Fluxómico: Flujo glucolítico y fosforilación oxidativa.
 - Cinetómico: Determinar las actividades de las enzimas glucolíticas (Hexocinasa, Hexosa fosfato isomerasa y Lactato deshidrogenasa) y mitocondriales (Citocromo oxidadaasa, Succinato deshidrogenasa)

JUSTIFICACIÓN

Análisis previos del metabolismo energético de líneas tumorales se han elaborado en cultivos en monocapa, donde se demuestra que la actividad de la fosforilación oxidativa es esencial para sostener la proliferación celular. Por el contrario, en esferoides completos la vía que predomina en el suministro de ATP es la glucólisis. Sin embargo, es necesario determinar el metabolismo energético intrínseco de cada capa aislada que forma el esferoide para demostrar que el crecimiento tridimensional (incluyendo los gradientes de oxígeno y nutrientes generados) modifica su dependencia bioenergética, y de esta manera proponer estrategias basadas en la utilización de inhibidores energéticos específicos para cada capa celular (terapia multisitio).

HIPÓTESIS

El crecimiento tridimensional (*i.e.* la presencia de gradientes de oxígeno y nutrientes) limitará la actividad mitocondrial en las capas quiescentes del esferoide induciendo un cambio en la expresión de proteínas mitocondriales y en consecuencia el flujo de la fosforilación oxidativa.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Propagación de los cultivos en monocapa.

La línea tumoral MCF-7 proveniente de un carcinoma mamario, fue cultivada con una alícuota inicial de 2×10^6 células/mL en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10,000 unidades de penicilina/estreptomicina. Las condiciones de incubación fueron 37° C, 5% CO₂ y 95% aire. Las células se cosecharon una vez que alcanzaron 80-90% de confluencia, aproximadamente al día 5 de cultivo.

3.2 Generación de EMCT - MCF-7

El presente trabajo de tesis se enfocó en el estudio de esferoides tumorales de tipo clonogénico, en donde la formación del centro necrótico/hipóxico es fundamental para el análisis metabólico que se realizó. Los esferoides multicelulares se formaron utilizando una técnica modificada de "líquido sobrelapante" [58]. Después del tercer pase de cultivo en monocapa, las células MCF-7 fueron lavadas con un medio PBS pH 7.2 (1.5 mM KH₂PO₄, 155 mM NaCl, 2.7 mM NaH₂PO₄·7H₂O), expuestas a 5ml – 0.25% tripsina/EDTA durante 3 minutos y centrifugadas a 2200 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. 1×10^5 células fueron sembradas en cajas petri con una superficie antiadherente de agarosa al 2% (w/v) e incubadas a 37° C, 5% CO₂ y 95% aire durante cinco días para permitir la formación del primer núcleo de células. Posteriormente los cultivos se sometieron a agitación orbital suave (20-50 rpm) durante 15 días más bajo las mismas condiciones de incubación. Se realizaron cambios de medio y limpieza de cultivos diariamente para remover los esferoides disgregados (**Fig 2**). El tamaño de los esferoides se determinó a los días 5, 10, 15 y 20 con una retícula graduada (1/10 mm) en un microscopio invertido.

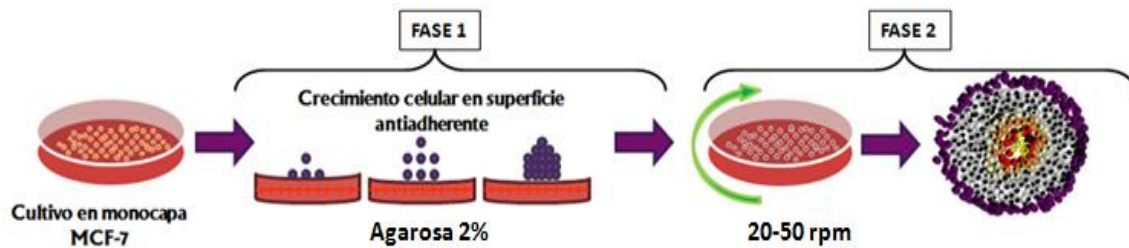


Figura 2. Modelo de la formación de esferoides tumorales multicelulares. Fase 1. Las líneas celulares se siembran en cajas cubiertas con agarosa, en una incubadora sin movimiento. Fase 2. Después de una semana se ponen en agitación constante durante 20 días.

3.3 Extracción de capas celulares de EMCT - MCF-7

Los esferoides maduros, con un diámetro de $863 \pm 64 \mu\text{m}$, fueron tripsinizados secuencialmente según el método de disociación de Freyer y Sutherland, 1980. Aproximadamente 40 – 50 esferoides/ cultivo/experimento fueron expuestos a 5mL – 0.25% tripsina/EDTA en agitación orbital suave (20-50 rpm) durante 3 minutos a temperatura ambiente. La reacción de la tripsina se detuvo con 1mL de DMEM e inmediatamente se recolectó el sobrenadante, que contiene a las células proliferativas del esferoide. Tanto el sobrenadante como el pellet celular, formado por las células quiescentes, fueron lavados con Ringer-Krebs fresco pH 7.4 y centrifugados a 2200 rpm durante 3 minutos a 37°C. Ambos botones celulares fueron resuspendidos en medio Ringer-Krebs para su uso inmediato. La viabilidad celular de cada capa se determinó en un hemocitómetro, usando el método de exclusión por azul tripano ^[59]. El contenido de proteína total de cada capa se midió por el método de biuret descrito en ^[60].

3.4 Determinación de flujos energéticos

Para la medición del flujo de la fosforilación oxidativa y la glucólisis se utilizaron suspensiones celulares frescas de ambas capas de los esferoides tumorales.

3.4.1 Fosforilación oxidativa

El flujo de la fosforilación oxidativa se determinó polarográficamente con un electrodo tipo Clark registrando el consumo de oxígeno sensible a oligomicina, un inhibidor de la ATP sintetasa. Para el ensayo se agregaron, de manera independiente, $3.5 - 4 \times 10^6$

células quiescentes y $1 - 1.5 \times 10^6$ células proliferativas a la cámara de reacción, que contenía 1.9 mL de medio Ringer Krebs pH 7.4 (125mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1.4 mM CaCl₂, 1 mM H₂PO₄, 25 mM HEPES) saturado con aire a 37° C. Una vez obtenido el trazo inicial de consumo de oxígeno se adicionó 5μM de oligomicina. Así también para revelar la actividad de la cadena respiratoria, se determinó la respiración sensible a cianuro de potasio (KCN) (1mM). El cero químico se obtuvo reduciendo todo el oxígeno presente en la cámara con ditionita.

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 (nAgO) por mL de Ringer Krebs.

3.4.2 Glucólisis

$1-30 \times 10^6$ células de ambas capas, proliferativa y quiescente, fueron preincubadas durante 10 minutos en 3 mL de Ringer-Krebs a 37° C en agitación orbital constante (150 rpm). Posteriormente se adicionó 5 mM de glucosa y pasados 3 minutos se detuvo la reacción con 3% (v/v) de ácido perclórico frío. Las muestra ácidas obtenidas se neutralizaron con 3M KOH/0.1M Tris y fueron utilizadas para la determinación de lactato formado.

El lactato generado por la glucólisis se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm mediante la aparición de NADH en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH).

3.5 Determinación de actividades enzimáticas

Para el caso de las actividades glucolíticas, 2 mg de ambos tipos de células fueron resuspendidos en buffer de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7.6, 1mM EDTA, 5mM DTT y 1mM PMSF) y sometidas a tres ciclos de congelamiento (nitrógeno líquido) – descongelamiento (baño a 37° C). La velocidad de las enzimas se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm mediante el consumo o la generación de NAD(P)H. En cada ensayo enzimático se comprobó que no hubiera reacción al omitir los sustratos específicos de cada enzima.

3.5.1 Hexocinasa

En una cuvetta con 1 mL de MOPS 50 mM pH 7.0 a 37°C, 2 U (10 µL de dilución 1:10) de G6PDH (1000 U), 1mM NADP⁺, 15 mM MgCl₂ y 10 mM ATP se agregó 0.2-0.6 mg de suspensión celular de cada capa. Después de que se trazó una basal durante 3 minutos, la reacción se inició con 3mM glucosa, concentración suficiente para alcanzar la máxima velocidad de reacción.

3.5.2 Hexosa Fosfato Isomerasa.

En una cuvetta con 1 mL de MOPS 50 mM pH 7.0 a 37°C, 2 U (10 µL de dilución 1:10) de G6PDH (1000 U) y 1mM NADP⁺ se agregó 0.4-0.9 µg de suspensión celular de cada capa. Después de que se trazó una basal estable durante 3 minutos, la reacción se inició con 2mM de fructosa-6-fosfato (F6P).

3.5.3 Lactato Deshidrogenasa

En una cuvetta con 1 mL de MOPS 50 mM pH 7.0 a 37°C y 0.15 mM NADH se agregó 0.4-0.9 µg de suspensión celular de cada capa. Se incubó durante tres minutos esperando una basal estable y la reacción se inició con 1mM de piruvato.

3.5.4 Citocromo Oxidasa

La actividad de la COX de ambos extractos celulares, proliferativos y quiescentes, se determinó por espectrofotometría diferencial a 540-550 nm, monitoreando la oxidación de citocromo c reducido.

En una cuvetta con 1 mL de buffer KME pH 7.2 (KCl 125 mM, MOPS 20 mM y EGTA 1mM) saturado con aire a 37° C, se agregó 0.02% Triton X-100 y 50 µM citocromo c (de músculo de caballo) previamente reducido con 5mM ácido ascórbico. La reacción se inició con la adición de 0.4-1 mg de proteína celular de cada capa. Al final de cada experimento se agrega, independientemente, 20 mM azida de sodio y 1mM KCN para revelar la actividad de COX.

3.5.5 Succinato deshidrogenasa

En una cuvetta con 1 mL de SHE (Sacarosa 220mM, HEPES 10 mM y EGTA 1mM, pH 7.0) a 37°C, 0.2mM 2,6-dicloroindofenol (DCPIP), 0.4 mM metosulfato de fenazina (PMS), 0.02% tritón X-100, 50 µM MgCl₂ y 1 mM cianuro, se agregó 0.5 mg/ml mg de suspensión celular de cada capa. Después de que se trazó una basal durante 3

minutos, la reacción se inició con 10mM de succinato de sodio, la velocidad de la enzima se cuantificó espectrofotométricamente a 600 nm de longitud de onda.

3.6 Extracción de proteínas y Western blot

Para la extracción de proteína, el contenido celular de ambas capas de los esferoides se resuspendió en 200 μ L de buffer de lisis RIPA (PBS 1x pH 7.2, 1% IGEPAL NP40, SDS 25% y deoxicolato de sodio 0.05%) y 5 μ L de inhibidores de proteasas (PMSF) 100mM. Las células fueron dissociadas por fuerza mecánica con ayuda de una jeringa de insulina hasta obtener un homogenizado. Los lisados fueron centrifugados a 10,000 rpm, a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se separó y guardó a -20°C hasta su uso.

Para la realización del Western Blot, 80 μ g de la proteína celular de cada una de las muestras se mezclaron con buffer de carga con 5% de β -mercaptoetanol, se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron (297 mA, 15 volts, 15-30 minutos) a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), que posteriormente fue bloqueada con 5% de leche libre de grasa y 0.1% de tween-20 en TBS 1x (TBS 10x: Tris 0.5 M pH 7.5 y NaCl 1.5 M en agua) durante una hora. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche en refrigeración (4°C) con anticuerpos policlonales de humano a las siguientes diluciones: GLUT-1, 1:1000; GLUT-3, 1:1000; HKII, 1:1000; PFK-1, 1:500; GAPDH, 1:500; LDH-A, 1:1000; alpha-KGD, 1:1000; GA, 1:1000; ANT, 1:1000; ND1, 1:1000; COX-IV, 1:1000; ATPasa, 1:500; PDH-E1alpha, 1:1000; SDH-C, 1:1000; Atg7, 1:1000; Beclin, 1:1000; LC3B, 1:1000; Bnip3, 1:500; LAMP-1, 1:1000; HIF-1alpha, 1:200; p32, 1:1000; TIGAR, 1:1000; h-Ras, 1:1000; c-Myc, 1:1000 y α -tubulina, 1:1000 (Santa Cruz, CA, USA).

Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario las membranas se lavaron seis veces (15 minutos) con TBS 1x/Tween-20 y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes por una hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Se lavó durante dos horas en cambios de 10-15 minutos con TBS 1x/Tween-20, se añadió la solución de quimioluminiscencia (Amersham ECL Plus) y se reveló en un cuarto oscuro utilizando papel fotográfico (KODAK).

Las bandas obtenidas se analizaron densitométricamente utilizando el programa Scion Image para Windows y fueron analizadas con respecto a la intensidad de banda del control de carga (α -Tubulina).

3.7 Análisis estadístico.

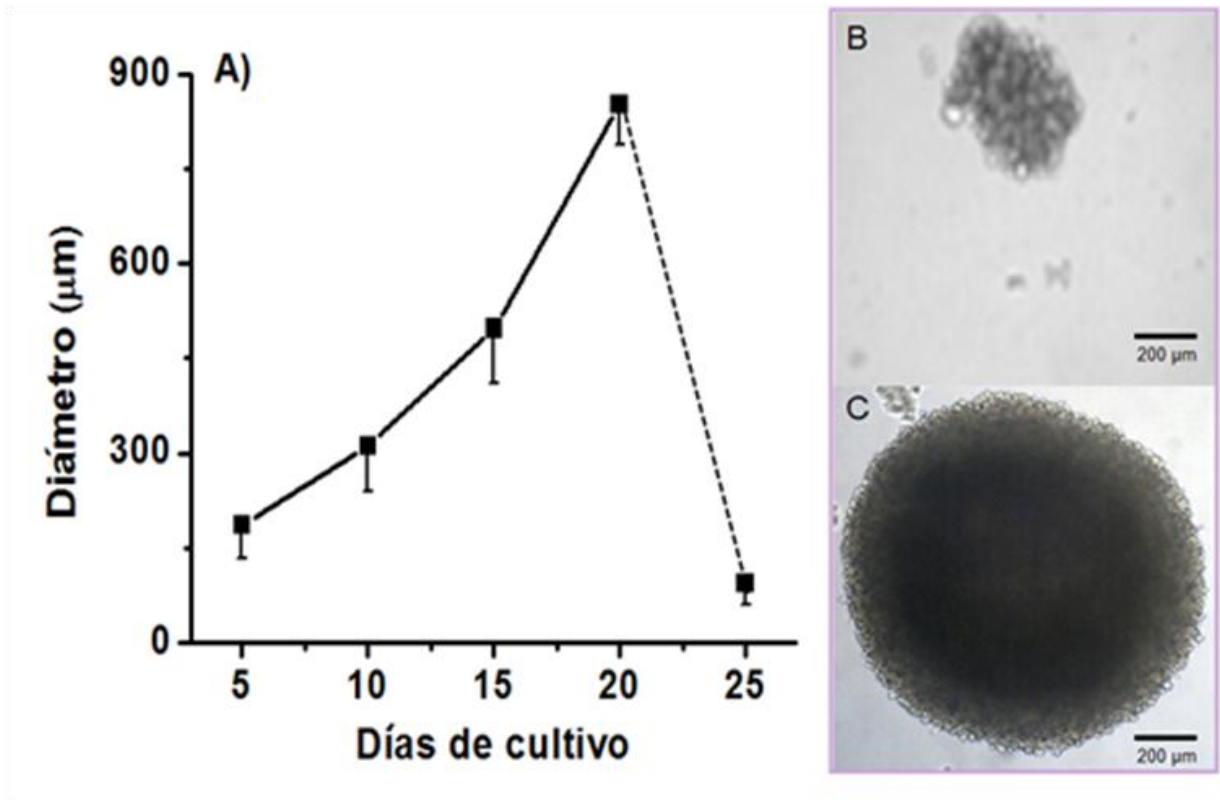
A partir de los resultados obtenidos en por lo menos tres experimentos independientes, se calculó la media y la desviación estándar. Se utilizó la t-Student de dos colas desapareadas para el análisis estadístico, en donde los valores menores a 0.05 fueron considerados significantes. Para otros análisis estadísticos se utilizó ANOVA.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Crecimiento de EMCT - MCF-7

Durante los primeros 5 días, las células tumorales forman un agregado inicial que alcanza un diámetro de $187 \pm 54 \mu\text{m}$. Este agregado se pone en agitación constante y después de 10 días de cultivo los esferoides alcanzan un diámetro de $312 \pm 72 \mu\text{m}$ los cuales se consideran jóvenes. Su máximo crecimiento lo alcanzan al día 20 con un diámetro de $853 \pm 64 \mu\text{m}$, que se consideran esferoides maduros, es en este momento cuando los esferoides son seleccionados para procesar la separación de las capas proliferativa y quiescente. Tres a cinco días posteriores al día 20, los esferoides comienzan a disgregarse y morir, abatiendo su crecimiento (**Fig 3**).



Días de cultivo	5	10	15	20	25
Diámetro (μm)	187 ± 54	312 ± 72	489 ± 97	853 ± 64	94 ± 32
		<u>Jóvenes</u>		<u>Maduros</u>	

Figura 3. A) Tiempo de cultivo (en días) incluido el tamaño de los EMCT de MCF-7. n = 140 **B)** Microfotografía de un esferoide tumoral maduro, al día 10 de cultivo. **C)** Microfotografía de un esferoide tumoral maduro, al día 10 de cultivo. Barra = 200 μm. Se muestra el promedio de los resultados ± desviación estándar. (p ≤ 0.05)

4.2 Marcadores de proliferación y quiescencia en capas de EMCT - MCF-7.

Con el objetivo de confirmar el estado de proliferación de las capas celulares extraídas del esferoide tumoral, se evaluó la expresión de la proteína p27 (asociada con la inhibición del complejo de ciclinas E/A-cdk, necesario para el inicio de la fase de síntesis y por tanto un marcador selectivo de quiescencia) ^[61] y de PCNA (antígeno nuclear de proliferación, cuya expresión ocurre exclusivamente en el núcleo durante la síntesis de DNA por lo que es un marcador selectivo de proliferación) ^[62]. PCNA se expresó 5 veces más en la capa proliferativa, mientras que p27 se expresó 3 veces menos, en comparación con las células quiescentes. Como un modelo comparativo, se analizó la expresión de las mismas proteínas en las células de origen de los esferoides (MCF-7 provenientes de un cultivo normóxico en monocapa), el patrón de expresión de p27 y PCNA fue similar al observado en las células de la capa proliferativa del esferoide **(Fig 4)**.

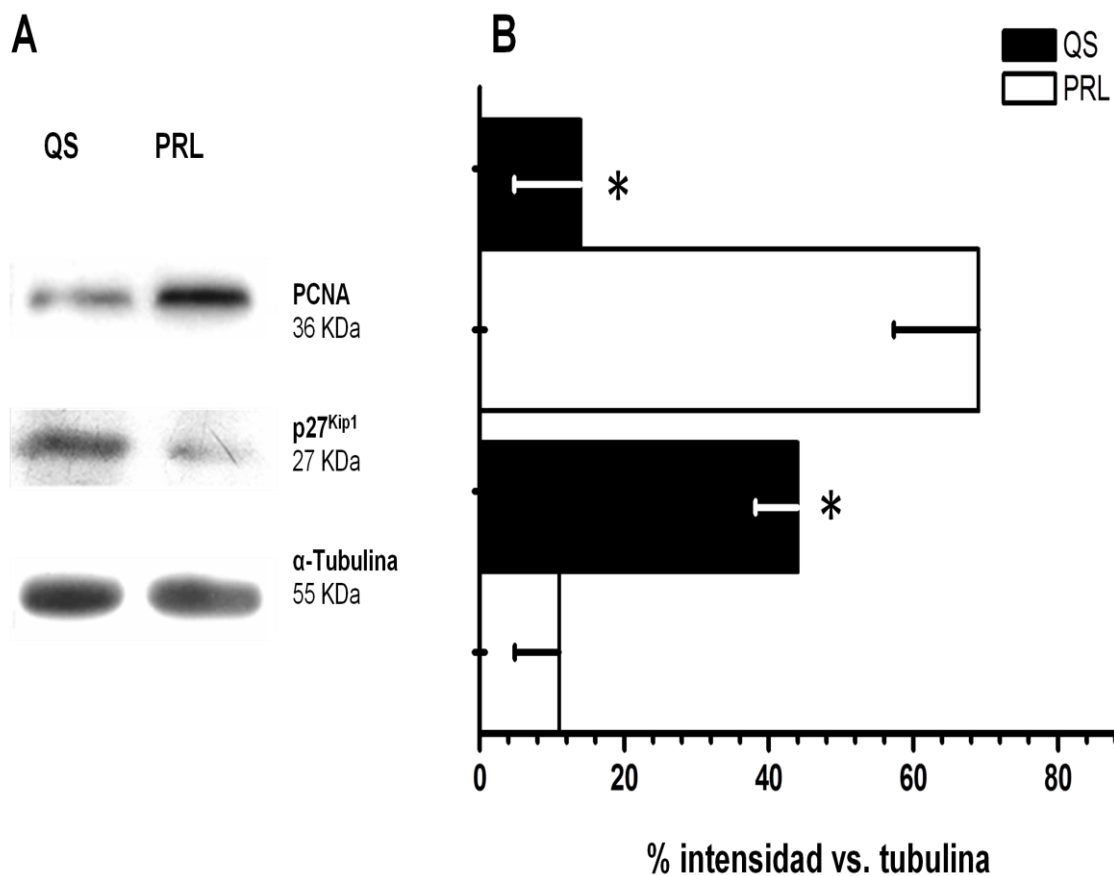


Fig. 4. Western blot de PCNA y p27 en células MCF-7 monocapa (n=1), proliferativas (PRL, n=3) y quiescentes (QS, n=3) de EMCT-MCF-7. **A.** Imagen representativa del ensayo. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (M=1; QS y PRL=3). Se muestra el promedio de los resultados ± desviación estándar. * p ≤ 0.05. α-tubulina se utilizó como control interno y para normalizar.

4.3 Análisis proteómico y cinetómico de las vías energéticas en ambas capas de EMCT - MCF-7.

4.3.1 Glucólisis

Como ya se mencionó, una característica metabólica importante en los tumores sólidos es su alta capacidad glucolítica, regulada en gran medida por la estabilización del factor inducido por hipoxia HIF-1 α , cuya expresión fue evaluada en las capas proliferativas y quiescentes provenientes de los esferoides. Ambos tipos de células mostraron una expresión alta, 70-90%, comparada con la expresión de tubulina **(Fig 5)**.

Como resultado de la sobreexpresión de HIF-1 α , las células de ambas capas proliferativa y quiescente de los esferoides tumorales mostraron una velocidad de glucólisis alta, similar a los valores reportados en cultivos bidimensionales de MCF-7 expuestos a hipoxia 24 horas ^[63]. Sin embargo, el flujo glucolítico no fue significativamente diferente entre las capas del esferoide, correlacionando con una expresión similar del factor HIF-1 α en ambos tipos de células. Los valores del flujo glucolítico encontrados para las capas de nuestro modelo tridimensional se presentan a continuación:

Tabla 9. Velocidades de glucólisis en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7.

	Quiescentes	Proliferativas
	(nmol/min/10 ⁶ células)	
GLUCÓLISIS	4.5 \pm 2 (3)	3 \pm 1.6 (3)

Los valores indican el promedio de las determinaciones \pm desviación estándar. Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas. La $p \leq 0.05$ no muestra diferencia significativa.

De manera interesante, la elevada actividad glucolítica en ambas capas celulares correlacionó con un incremento en el patrón de expresión de enzimas controladoras de la vía como la HK y el GLUT-1 ^[19], que aumentan 3 y 5 veces respectivamente al ser comparados con las células origen del esferoide (experimentos realizados en paralelo, no se muestran los resultados), así como de LDH, que aunque no es una enzima controladora, aumenta hasta 2 veces su patrón de expresión. Entre las capas del esferoide el patrón de expresión de las enzimas evaluadas fue similar, a excepción de la LDH que tiende a aumentar en las células quiescentes **(Fig 5)**.

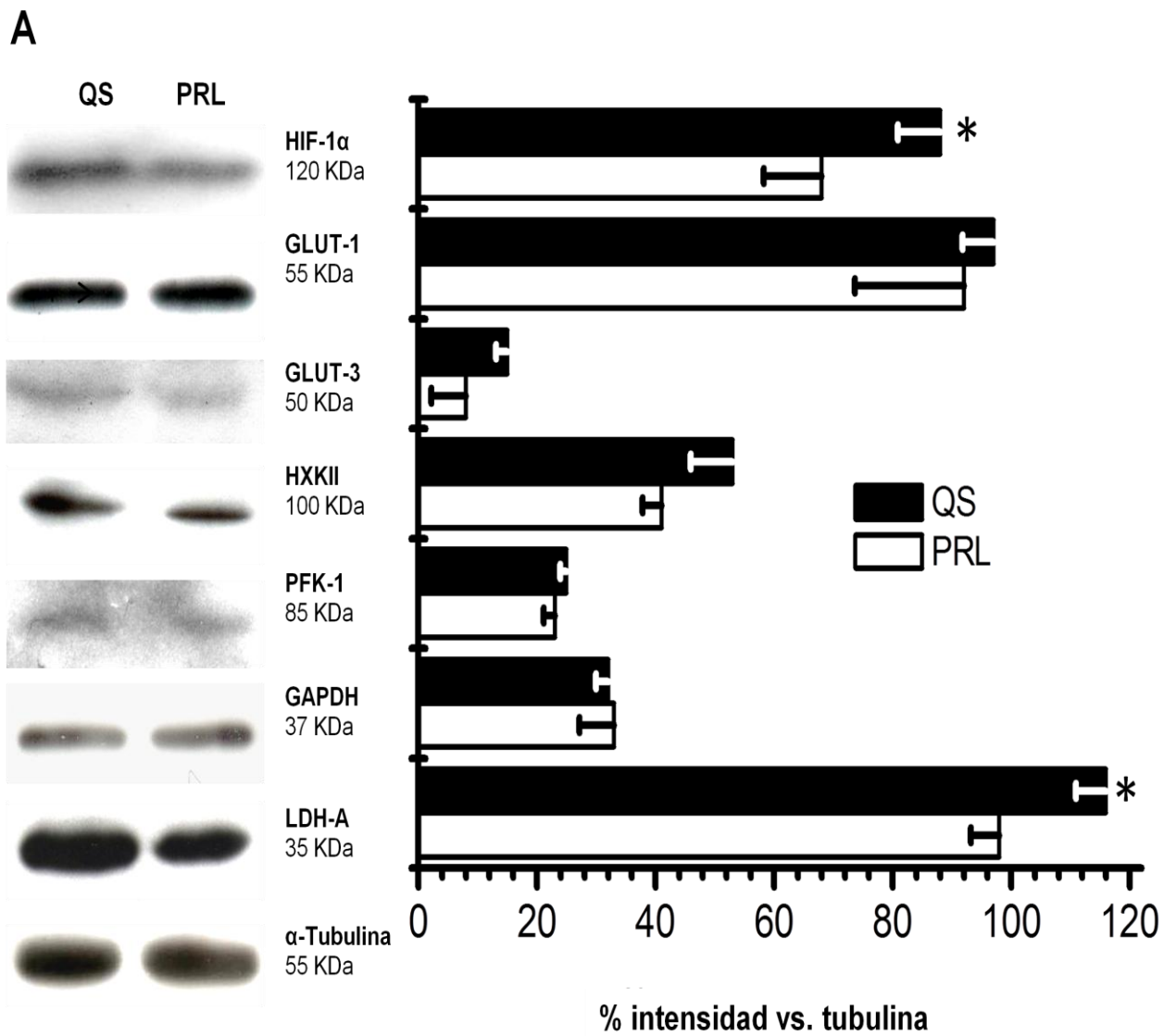


Fig. 5. Western blot de GLUT-1, GLUT-3, HKII, PFK-1, GAPDH y LDH-A en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7; GAPDH y GLUT-3 no determinadas. **A.** Imagen representativa del ensayo. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=3). Se muestra el promedio de los resultados \pm desviación estándar. * $p \leq 0.05$.

Para evaluar el funcionamiento de las enzimas que presentan un aumento proteómico claro y poder correlacionarlo con un incremento del flujo glucolítico, se evaluó la actividad de la HK, la LDH y HPI (**Tabla 10.**) Las actividades enzimáticas resultaron estar incrementadas respecto a los valores reportados para glándula mamaria sana, cuyas actividades oscilan en 14, 530 y 570 nmol/min/mg respectivamente ^[64]. Sin embargo no existe diferencia significativa entre las actividades de dichas enzimas en cada capa del esferoide.

Tabla 10. Actividad de HK, LDH y HPI en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7.

	Quiescentes	Proliferativas
	(mU/mg)	
HX	20 ± 15 (5)	13 ± 5 (4)
HPI	1042 ± 509 (5)	803 ± 399 (4)
LDH	706 ± 238 (5)	679 ± 396 (5)

Los valores indican el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas. La $p \leq 0.05$ no muestra diferencia significativa.

4.3.2 Fosforilación Oxidativa

La velocidad de la FO se determinó en células intactas provenientes de las capas quiescentes y proliferativas de los esferoides. La respiración sensible a oligomicina de las células proliferativas aumenta 2 veces en comparación a la respiración detectada en las células quiescentes (**Tabla 11**). Es importante señalar que la sensibilidad a oligomicina (10 μM), un inhibidor de la ATP sintasa, fue de 50% para las células proliferativas y de 40% para las quiescentes, lo que sugiere que en los esferoides tumorales no sólo existe una alta actividad de enzimas no mitocondriales dependientes de oxígeno como ya ha sido mencionado, sino que dicha actividad se incrementa en las microrregiones tumorales más cercanas al centro necrótico. La FO se incrementa de 5 a 11 veces en las células quiescentes y proliferativas respectivamente al ser comparada con la FO de células MCF-7 en monocapa ^[65, 66]

Tabla 11. FO células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7.

	Quiescentes Proliferativas	
	(ngAO/ min/ 10⁶ células)	
Respiración Total	62± 20 (7)	113 ± 27 (6) *
Sensibilidad a oligomicina (%)	40%	50%
FO	25±10 (7)	53 ± 18 (6) *

Los valores indican el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas. * $p \leq 0.05$

El incremento en la fosforilación oxidativa de las células proliferativas correlaciona de manera interesante con una exacerbación significativa en la expresión de proteínas del ciclo de Krebs y enzimas que lo alimentan, como la 2-OGDH (8 veces), la PDH-E1 α (2.1 veces) y la glutaminasa isoforma K (riñón) (18 veces) que se conoce es la que se sobreexpresa en tumores ^[67]. Así también se encontró una expresión incrementada de enzimas pertenecientes a la cadena respiratoria, como la NADH deshidrogenasa – complejo I- (2.5 veces), citocromo c oxidasa – complejo IV - (2.6 veces) y la ATP sintasa subunidad 5 (2.9 veces) **(Fig 6)**.

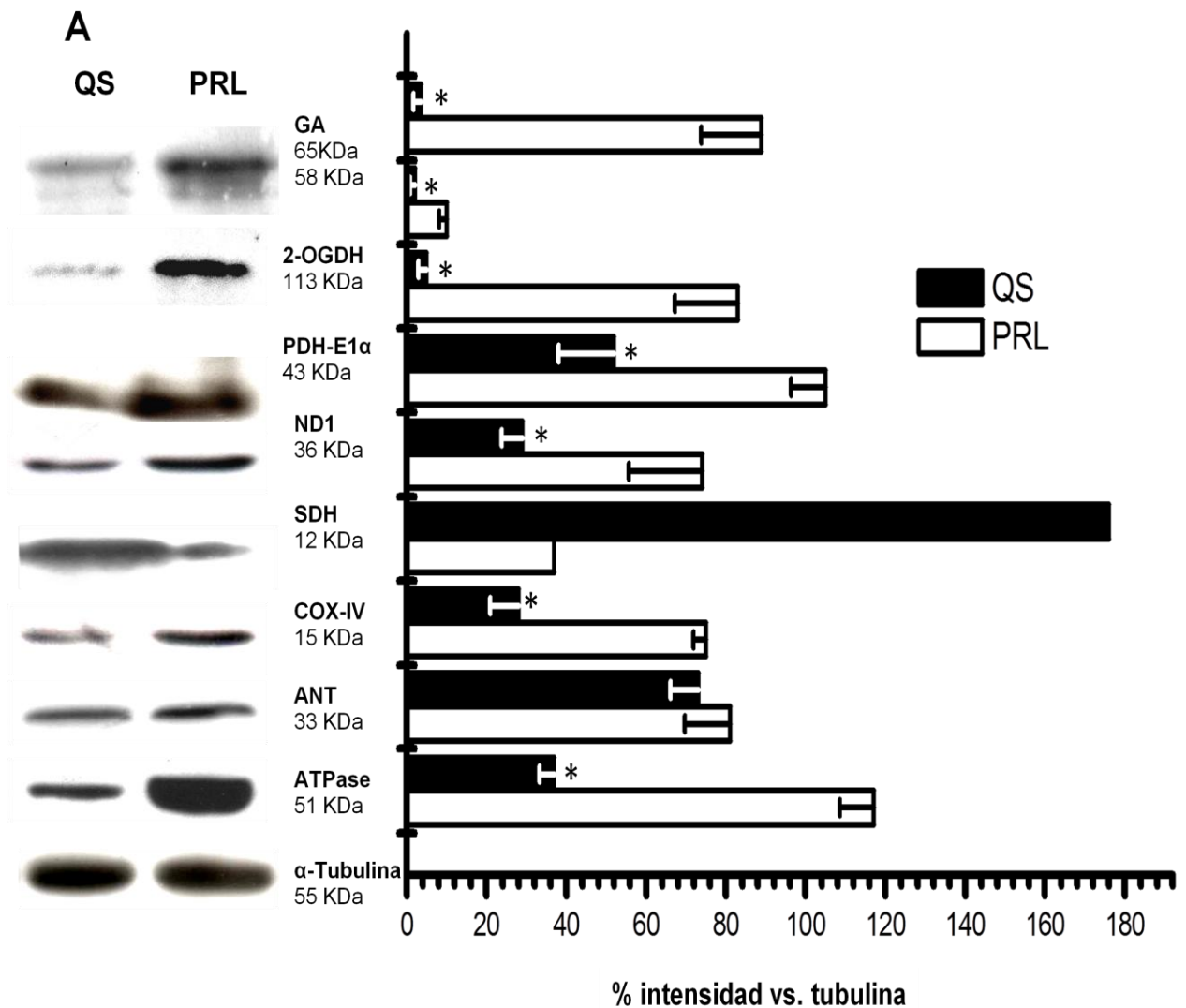


Fig. 6. Western blot de GA (isoformas K y L), 2-OGDH, PDH-E1α, ND1, COXIV y ANT en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7. **A.** Imagen representativa del ensayo. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=3). Se muestra el promedio de los resultados ± desviación estándar. * $p \leq 0.05$

Con el fin de conocer si el alto contenido de proteínas mitocondriales encontrado en las células proliferativas correlaciona con una función incrementada, se determinaron las actividades de la COX y la SDH en las dos capas celulares. La actividad de ambas enzimas tiende a incrementar en la capa proliferativa pero no muestra una diferencia significativa en comparación con las células quiescentes (**Tabla 12**).

Tabla 12. Actividad de COX en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7.

	Quiescentes	Proliferativas
	(mU/mg)	
COX	1.6 ± 1 (4)	3.6 ± 2 (4)
SDH	4.1 ± 2.3 (4)	6.2 ± 2.3 (4)

Los valores indican el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas. La $p \leq 0.05$ no muestra diferencia significativa.

4.3.3 Aporte a la síntesis de ATP de cada vía energética

Dado que la glucólisis y la FO son las rutas proveedoras de energía, se analizó cuál de ellas aporta mayor cantidad de ATP a la célula. Para ello se calculó el ATP proveniente de cada vía, tomando en cuenta que por cada lactato formado por la glucólisis se obtiene una molécula de ATP y por cada átomo gramo de O_2 consumido en la FO se producen 2.5 moles de ATP. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 13. Cálculos del ATP generado por las rutas energéticas en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7.

	Glucólisis	FO	TOTAL	Aporte glucólisis (%)	Aporte FO (%)
Proliferativas	3 ± 1.6	132.5 ± 45 *	135.5	2	98
Quiescentes	4.5 ± 2	62.5 ± 25 *	67	7	93

Los valores indican el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. El total y el aporte (%) de la FO y la glucólisis se calcularon en base al promedio. * $p \leq 0.05$

Estos datos indican que a pesar de que se observa una exacerbación de la fosforilación oxidativa en las células externas y proliferativas de los esferoides, ésta es la vía energética que provee la mayor parte de ATP (95 y 97%) en ambas capas celulares, quiescentes y proliferativas; siendo la glucólisis la vía energética que aporta apenas 3 - 5% del ATP total aún cuando su velocidad se encuentre incrementada.

Para resumir, los cambios energéticos más significativos encontrados en las capas quiescentes y proliferativas provenientes de esferoides tumorales MCF-7 se muestra en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Cambios en el metabolismo mitocondrial y glucolítico en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7.

	Quiescentes	Producción de ATP (%)	Proliferativas	Producción de ATP (%)
FO	25 ± 10 (7)	93	53 ± 18 (6) *	98
COX	1.6 ± 1 (4)		3.6 ± 2 (4)	
SDH	5.6 (2)		7.3 (2)	
GLUCÓLISIS	4.5 ± 2 (3)	7	3 ± 1.6 (3)	2
HX	20 ± 15 (5)		13 ± 5 (4)	
HPI	1042 ± 509 (5)		803 ± 399 (4)	
LDH	706 ± 238 (5)		679 ± 396 (5)	

Los valores indican el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas. * p < 0.05

4.4 Expresión de proteínas autofágicas y factores transcripcionales asociados al metabolismo mitocondrial en capas proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7.

En un intento por determinar los mecanismos involucrados en la transición del metabolismo en ambas capas del esferoide, se midió la expresión de algunos factores transcripcionales que modulan positivamente la fosforilación oxidativa (p32, h-Ras) y la biogénesis mitocondrial (c-Myc), así como de algunas proteínas autofágicas como Atg7, Beclin, LC3B, Bnip3 y LAMP que participan en el proceso de degradación mitocondrial.

4.4.1 Factores transcripcionales

La participación en la regulación del metabolismo mitocondrial de los factores transcripcionales evaluados en ambas capas celulares se muestra en la tabla 3.

De manera interesante se encontró que la expresión de los factores transcripcionales p32 y h-Ras que participan en la síntesis de *ново* de componentes de la cadena respiratoria, así como de c-Myc que participa en la biogénesis mitocondrial, se encuentran disminuidos en las células quiescentes de 6 a 8 veces en comparación con la alta expresión encontrada en las células proliferativas (**Fig 7**). En cambio, al hacer un análisis de factores moduladores de la glucólisis como TIGAR, se encontró que su expresión es similar en ambas capas celulares (**Fig 7**).

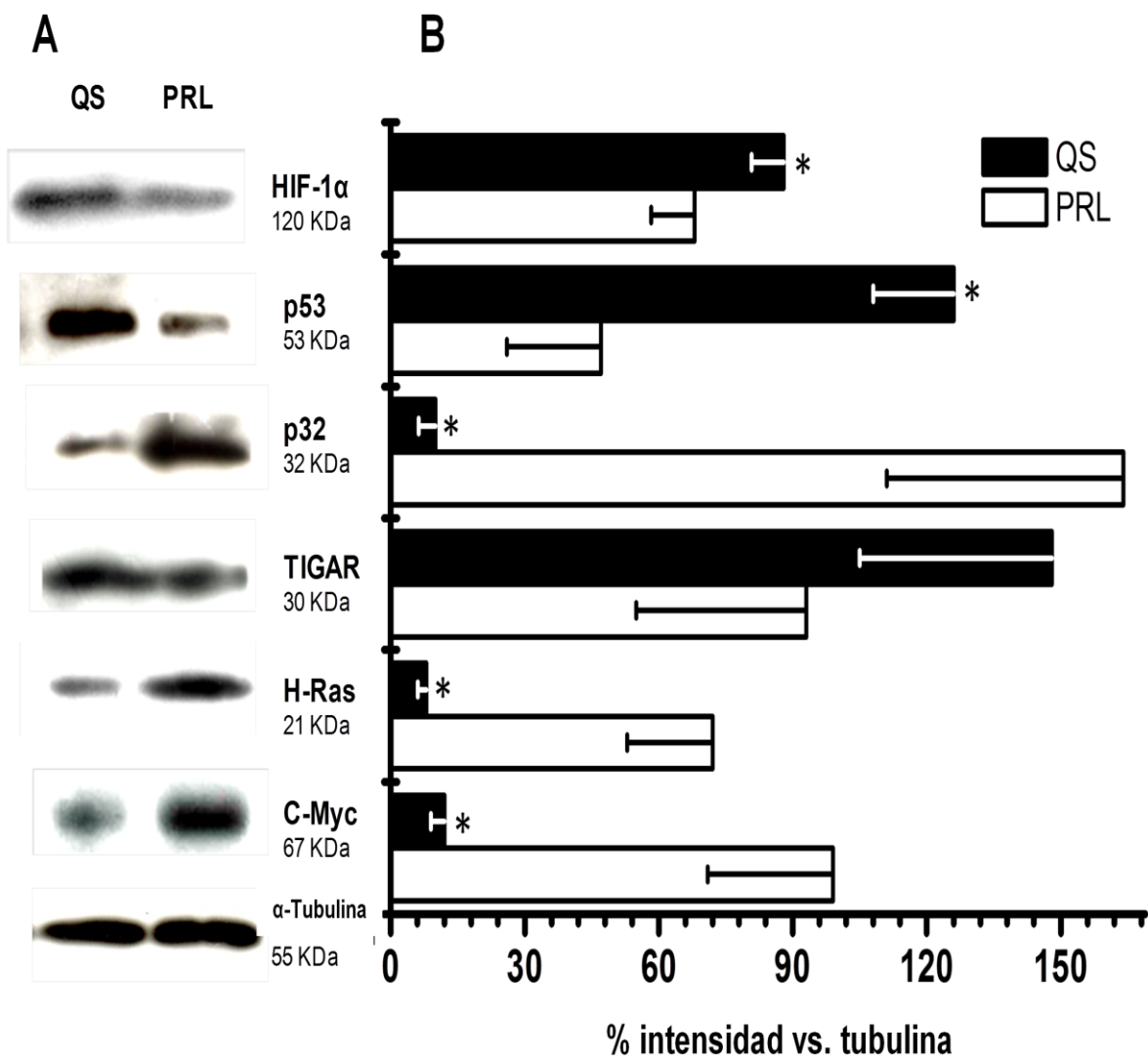


Fig. 7. Western blot de HIF-1α, p53, p32, TIGAR, H-Ras y C-Myc en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7. **A.** Imagen representativa del ensayo. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=3). Se muestra el promedio de los resultados ± desviación estándar. * p < 0.05

4.4.2 Proteínas autofágicas

Correlacionando con la notable disminución en la fosforilación oxidativa y el aparente decremento en la disminución de la actividad de COX y SDH observado en las células de la capa quiescente de los esferoides, se encontró un alto contenido de las proteínas autofágicas evaluadas. Las proteínas autofágicas ATG-7 y Beclin mostraron un incremento de 5 a 10 veces, la proteína asociada a autofagosomas LC3B de 2.5 veces, la proteína de localización mitocondrial Bnip3 de 4 veces y la proteína asociada a membrana lisosomal de 2 veces, en comparación con el patrón de expresión observado en las células proliferativas **(Fig 8)**.

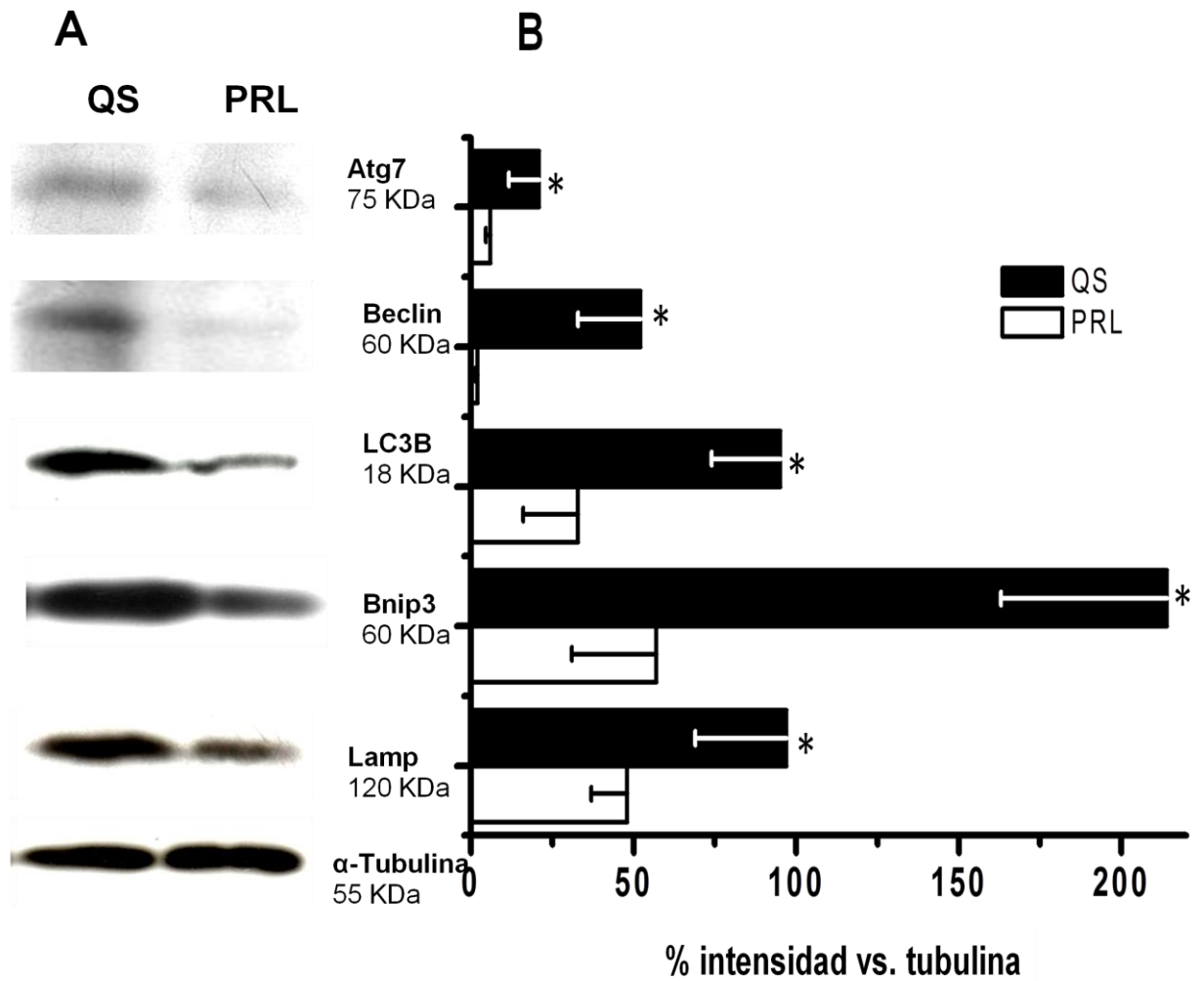


Fig. 8. Western blot de Atg7, Beclin, LC3B, Bnip3 y LAMP en células proliferativas y quiescentes de EMCT-MCF-7. **A.** Imagen representativa del ensayo. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=3). Se muestra el promedio de los resultados \pm desviación estándar. * $p < 0.05$

CAPITULO V. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios de metabolismo energético en cáncer se han realizado en modelos experimentales bidimensionales que no reflejan las características fisiológicas de un tumor sólido o biopsia. Por ejemplo, las complejas interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, los gradientes metabólicos y las microzonas hipóxicas que se generan en un tumor tridimensional, se pierden en los cultivos en monocapa ^[65, 68]. Por ello, los estudios metabólicos en esferoides tumorales, que mimetizan los estadios iniciales en la formación de un tumor sólido poco vascularizado, reflejan realmente las alteraciones metabólicas que ocurren en un tumor *in vivo*.

La mayoría de los reportes que abordan la problemática del metabolismo energético en el modelo esferoidal utilizan esferoides intactos. En ellos, se observa un consumo de oxígeno bajo en comparación con cultivos normóxicos en monocapa y una función mitocondrial que disminuye durante el crecimiento del esferoide (**Tabla 6**). Sin embargo, los esferoides tumorales generan microambientes hipóxicos y subpoblaciones celulares como las encontradas *in vivo*. Debido a que dichas subpoblaciones pueden ser disectadas, es posible evaluar su metabolismo energético en cada capa, desafortunadamente existe escasa información sobre los cambios metabólicos que ocurren en las capas celulares que conforman al esferoide por separado.

Los tumores de rápido crecimiento requieren de una fuerte activación glucolítica y de una mitocondria funcional para su crecimiento, invasión y metástasis. Por tanto, la determinación de la vía energética predominante en las diferentes microrregiones del tumor permite la identificación de estrategias terapéuticas multisitio ^[18, 69, 70]. Con este argumento, se realizó un análisis del metabolismo energético en las capas separadas ó disectadas del esferoide tumoral maduro, con la intención de determinar qué vía energética prevalece en cada subpoblación celular que compone al esferoide en respuesta a los diferentes microambientes y gradientes de oxígeno y nutrientes a los que se encuentran sometidas ^[65, 66].

Para este fin, se cultivaron esferoides multicelulares maduros de la línea tumoral MCF-7 que alcanzaron su máximo crecimiento a los 20 días con un diámetro de $853 \pm 64 \mu\text{m}$. En tiempos posteriores a 20 días los esferoides tumorales comienzan a disgregarse, debido posiblemente a que la expansión del centro necrótico promueve un microambiente hostil, generando sustancias tóxicas que aumentan el número de células muertas y por tanto inhiben el crecimiento celular ^[71, 72] **(Fig.3)**. El mismo perfil de crecimiento se reportó en otros modelos de EMCT de diferentes orígenes como melanoma (BEX-c, COX-c, WIX-c), el carcinoma mamario EMT6, glioma de rata 9L entre otros que alcanzan diámetros de 1400, 1240 y 1210 μm respectivamente ^[42, 57]. Las capas celulares proliferativa y quiescente fueron disectadas únicamente de los esferoides tumorales maduros, que se demostró sobre-expresan HIF-1 α en comparación con las células MCF-7 cultivadas en monocapa ^[47]. La técnica de separación por tripsinización secuencial fue efectiva, ya que permitió obtener fracciones enriquecidas de células externas proliferativas y de células internas quiescentes **(Fig. 4)**, como previamente reportaron Freyer y Sutherland en esferoides multicelulares de carcinoma mamario de rata EMT6/Ro ^[36]. Como control positivo se evaluó la expresión de los marcadores de proliferación y quiescencia en células MCF-7 en monocapa, el comportamiento de expresión observado fue el mismo que para el de las células externas, lo que confirma que estas células se encuentran preferentemente en estado proliferativo, permitiéndonos así realizar los análisis bioquímicos correspondientes en dos capas celulares diferentes.

Glucólisis exacerbada en ambas capas celulares provenientes de EMCT de MCF-7.

Las células de ambas capas, proliferativa y quiescente, mostraron una actividad glucolítica que tiende a incrementar respecto a sus cultivos bidimensionales de origen **(Tabla 9**, flujo glucolítico en monocapa normóxico= 1.4 nmoles/min/ 10^6 células), tal como se ha observado en otras líneas celulares cultivadas en modelos tridimensionales, *i.e.*, BMG-1 (glioma humano) y Rat1-T1 (fibroblastos transformados de embrión de rata) en los que la glucólisis se incrementa 2.5 y 1.4 veces respectivamente en comparación con sus cultivos en monocapa ^[72, 73]. Estos

resultados muestran que el análisis del metabolismo energético realizado en cultivos en monocapa no puede extrapolarse a cultivos tridimensionales como los esferoides tumorales, un mejor modelo experimental para el análisis del metabolismo energético tumoral, por tanto tampoco a tumores sólidos *in vivo*.

La alta capacidad glucolítica observada en ambas capas del esferoide sugiere una clara ventaja energética para el crecimiento, transporte de iones, activación del ciclo celular, etc. (en el caso de la capa proliferativa) y la sobrevivencia y homeostasis celular (en el caso de la capa quiescente) ^[74-76].

Al parecer, la acelerada glucólisis en ambas capas está asociada al aumento en la expresión de HIF-1 α (7-9 veces), el factor transcripcional que promueve la sobreexpresión de las enzimas y transportadores glucolíticos GLUT1, GLUT3, hexocinasa tipo I y II (HKI y HKII), PFK1, fosfofructocinasa tipo 2 (PFK2), aldolasa (ALD A y C), GAPDH, PGK1, ENO1 y lactato deshidrogenasa (LDH) ^[77] y que es fuertemente regulable en condiciones hipóxicas (**Fig 5**). Aunque en la capa proliferativa se asume que la tensión de oxígeno es mayor que la encontrada en las capas quiescentes, es claro que la estabilización de HIF-1 α en esta región del esferoide no está determinada por la hipoxia, sino por otros probables mecanismos como son el aumento en los niveles de piruvato y lactato (dos subproductos de la glucólisis anaerobia) y/o la sobreexpresión de h-Ras ^[77]. En efecto, se observó una alta producción de lactato (**Tabla 9**) y una alta expresión del factor h-Ras (70%) (**Fig 7**) en las células proliferativas de los esferoides MCF-7 comparado con sus cultivos de origen. El lactato en altas concentraciones también se ha relacionado con la sobrevivencia tumoral: el lactato expulsado puede ser oxidado a piruvato por una subpoblación de células tumorales oxidativas. El piruvato se transporta activamente al interior de la mitocondria ^[26] y es oxidado hasta generar NADH, por las enzimas del ciclo de Krebs, el NADH generado servirá para alimentar la cadena respiratoria para la generación de potencial transmembranal mitocondrial y finalmente síntesis de ATP. Además, el lactato acidifica los alrededores del tumor, lo que induce la muerte de las poblaciones de células vecinas normales incapaces de adaptarse a la acidosis, permitiendo la invasión y metástasis de las células tumorales ^[78, 79], que generan mecanismos de resistencia al láctico, como son la sobreexpresión de algunas isoformas de la anhidrasa carbónica

(CAIX y CAXII, reguladas por HIF-1 α , contribuye a la alcalinización celular al generar iones bicarbonato) ^[80] y del transportador de monocarboxilatos (MCT4, regulado por HIF-1 α , expulsa al lactato y los H⁺ generados por la reacción de la LDH) ^[81]. Asimismo, el láctico afecta el funcionamiento del sistema inmune al reducir la proliferación, la producción de citocinas y la citotoxicidad de los linfocitos T, protegiendo de esta manera a las células tumorales ^[82, 83].

Debido a que HIF-1 α regula la transcripción de prácticamente todas las enzimas de la vía glucolítica ^[77], evaluamos la expresión y actividad de algunos transportadores y enzimas, encontrando que la diferencia en la expresión de HIF-1 α en ambas capas celulares no es suficiente para inducir un cambio sustancial en el contenido de enzimas glucolíticas (**Fig 5**) ni en su actividad. Sin embargo, su sobreexpresión en los esferoides sí promueve un incremento (2-3 veces) en la expresión de todas las enzimas evaluadas al ser comparada con los cultivos en monocapa ^[82, 83]. En este sentido es importante mencionar que el incremento observado en la expresión de la HK, una enzima controladora de la vía en células tumorales ^[84], puede ser un mecanismo importante para el mantenimiento del alto flujo glucolítico observado.

Otros factores transcripcionales también están involucrados en la activación de la glucólisis y la sobreexpresión de enzimas y transportadores glucolíticos. Por ejemplo, en fibroblastos de rata RAT1a y linfomas de Burkitt ^[85], la sobreexpresión del factor transcripcional c-Myc participa en la regulación positiva de la glucólisis, al promover la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT1), la hexofosfato isomerasa (HPI), la fosfofructocinasa tipo 1 (PFK1), la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la fosfoglicerato cinasa (PGK) y la enolasa (ENO) ^[30, 86]. Al evaluar la expresión de c-Myc en ambas capas del esferoide encontramos que su expresión incrementa 9 veces en la capa proliferativa al ser comparada con la quiescente (**Fig 7**), resultados que pueden sugerir que c-Myc junto con HIF-1 α soportan la expresión de las enzimas glucolíticas en la capa proliferativa.

Finalmente, se evaluó la expresión de un factor transcripcional presente en las células tumorales en alta concentración, que inhibe a la glucólisis y que es activado por p53, el TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) ^[28]. La actividad de bifosfatasa de este regulador asemeja a la reportada en PFKII, ya que degrada a la

fructosa 2-6 bisfosfato (activador de la PFK) y promueve la acumulación de glucosa, G6P y F6P. En consecuencia la G6P puede ser utilizada por la vía de las pentosas activando la generación de NADPH. El aumento en la relación NADPH/NADP estabiliza 1) la poza de glutatión reducido como mecanismo antioxidante ^[87]; 2) sostiene la síntesis de macromoléculas como lípidos, proteínas y carbohidratos utilizadas en el mantenimiento de la proliferación y sobrevivencia tumoral ^[88]. La expresión de TIGAR no cambia significativamente entre las capas celulares provenientes del esferoide (**Fig 7**) resultado que correlaciona con el patrón de similitud encontrado para la expresión de las enzimas glucolíticas evaluadas, así como su actividad y flujo glucolítico, lo que indica que la glucólisis no es significativamente diferente en las capas proliferativa y quiescente del esferoide (**Tabla 14**).

Fosforilación Oxidativa exacerbada en capas celulares proliferativas provenientes de MCT-S-MCF-7.

La glucólisis exacerbada que presentan las células cancerosas en condiciones aeróbicas no es evidencia substancial para postular que la FO está dañada, hasta que se demuestre experimentalmente.

Diferentes grupos de investigación han demostrado que a pesar del incremento significativo en la glucólisis, el principal aporte de ATP requerido para mantener procesos de alta demanda energética (síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, lipogénesis, transporte, homeostasis celular) necesarios para la replicación de las células tumorales ^[23] proviene de la mitocondria. Por tanto recientemente se ha propuesto a la mitocondria como un blanco terapéutico adicional ^[69]. Para la determinación de la vía de la fosforilación oxidativa en las capas celulares proliferativas y quiescentes de los esferoides maduros, en el presente trabajo se realizaron análisis proteómicos, cinéticos y fluxómicos.

La expresión de las proteínas mitocondriales evaluadas disminuyó de 2 a 18 veces en las células provenientes de la capa hipóxica quiescente (**Fig 6**), lo cual correlacionó con la disminución (53%) en la FO de las células quiescentes. De las enzimas evaluadas, se observó una disminución en el nivel de proteína de la PDH y de la 2OGDH (2.2 y 8.5 veces vs proliferativas) afectando la producción de equivalentes reductores utilizados

por la cadena respiratoria y en consecuencia la síntesis de ATP. La disminución en la expresión de la isoforma K puede alterar el metabolismo de la glutamina en el tumor, evitando su desaminación a glutamato, un importante sustrato anaplerótico para la síntesis de 2OG. Además, otras enzimas de la cadena respiratoria (ND1, COX) y la ATPasa también están disminuidas (2.6, 4 y 3.4 veces) sugiriendo una fuerte represión del metabolismo mitocondrial. Sin embargo, la disminución en los niveles proteicos de las enzimas mitocondriales no fue generalizado. La expresión de otras enzimas, como la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT) no se modificó significativamente, sugiriendo un papel adicional al conocido en la mitocondria como translocador de nucleótidos. Al respecto se ha documentado que el ANT juega un papel regulador en la formación del poro de la transición de la permeabilidad, contribuyendo así en el control de la vía intrínseca de la apoptosis, razón por la cual su contenido aumenta substancialmente en algunos tejidos diferenciados (corazón, músculo esquelético y cerebro) ^[89].

El patrón de expresión para las mismas proteínas fue 2-3 veces menor en las células en monocapa MCF-7, por lo que probablemente el microambiente y la estructura tridimensional determinadas por las interacciones célula-célula y célula- matriz extracelular, cuyos componentes como la colágena, la fibronectina y la acetilglucosamina se han encontrado sobreexpresados en esferoides, permiten una modificación en el fenotipo celular y en la expresión de las proteínas glucolíticas y las mitocondriales ^[90]. Los cambios observados en la expresión de los diferentes componentes mitocondriales evaluados puede explicarse probablemente como cambios transcripcionales adaptativos inducido por una exposición crónica (más de 20 días) a la hipoxia.

En ambas capas del esferoide se encontró un incremento de 5 a 11 veces en la FO respecto a sus células en monocapa de origen, sin embargo la sensibilidad de la respiración celular a oligomicina disminuyó hasta un 40% en las células provenientes del esferoide (**Tabla 11**) lo que sugiere que:

- 1) Existe un activo consumo de oxígeno de proteínas no mitocondriales como algunas hemo oxigenasas ^[91] y los citocromos p450, que se incrementan de 2.5 a 5 veces en los esferoides al ser comparadas con células en monocapa ^[49].

2) La disminución en la sensibilidad a la oligomicina se debe a que el inhibidor no puede acceder a su blanco (ATP sintasa) por la configuración tridimensional de las células del esferoide.

De manera interesante, en las células externas donde las proteínas mitocondriales se encontraron sobreexpresadas, el flujo de la fosforilación oxidativa fue de 53 ± 18 ($n=6$), mientras que en las células quiescentes fue de 25 ± 10 , ($n=7$) ngAO/ min/ 10^6 células (**Tabla 11**). Una disminución similar en la respiración total se reportó en esferoides de tumor de carcinoma mamario de ratón (EMT6) y de células de glioma de rata (9L), la cual no fue evaluada en presencia de oligomicina ^[56, 57].

Es importante resaltar que en este trabajo experimental, las velocidades de flujo, actividades enzimáticas y proteómica de las vías energéticas se realizaron bajo tensiones de oxígeno ambientales (hasta del 20% O₂), es decir en condiciones fisiológicas para la capa proliferativa, pero no para la quiescente (expuesta a tensiones de oxígeno menores a 20%). Sin embargo, bajo las mismas condiciones experimentales, se observaron cambios significativos entre las células normóxicas proliferativas y las hipóxicas quiescentes del esferoide, sugiriendo que cualquier cambio metabólico generado por los diferentes microambientes a los que se someten las células en cada región no son reversibles en tiempos cortos y representan adaptaciones de los fenotipos celulares en la expresión y actividad de enzimas que participan en ambas vías energéticas, indicando la importancia de realizar un análisis global que incluya el análisis proteómico, fluxómico y cinetómico.

Con respecto a la citocromo oxidasa, no se observó una correlación entre los niveles de proteína (COX IV) y la actividad, es decir, mientras la concentración de enzima IV disminuyó 2.6 veces, la actividad no se modificó significativamente (**Tabla 12**). Este hecho puede explicarse si consideramos que la COX IV tiene dos isoformas (COX IV-1 y COX IV-2) cuya funcionalidad depende del oxígeno. La isoforma 1 es abundante en normoxia y se degrada en condiciones hipóxicas, en donde se expresa la isoforma 2 ^[92]. Este cambio de isoformas parece ser un mecanismo que optimiza la adaptación de la COX en microambientes hipóxicos. Desafortunadamente, desconocemos si el anticuerpo (antiCOX-IV) puede reconocer con mayor eficiencia a un subtipo que a otro. Interesantemente, la disminución en COX-IV observada en este trabajo, correlacionó

con lo determinado por Fukuda (2007) en células tumorales de HeLa (útero), Hep3B (hígado), Hct116 (colon) y A594 (pulmón) expuestas a un reto de hipoxia de 1% O₂. En este estudio, se observó que la expresión de la subunidad IV-1 de la enzima disminuyó considerablemente 2.4 veces lo que hizo sugerir a los autores que la enzima era disfuncional ^[92] sin que la función fuera estrictamente determinada.

Estos resultados pueden indicar que (1) el flujo de la FO no depende de la actividad de COX, *i.e.* no es una enzima limitante en el flujo y (2) la función de COX no está limitada por la disminución de oxígeno. En este sentido, se ha documentado que la Km de la COX por oxígeno tanto en células normales como en tumorales es de 0.1-0.8 μM, por lo que las concentraciones de O₂ presentes en las células hipóxicas del esferoide (3-13 μM) son saturantes y no significan una limitación para que la enzima esté activa (revisado en ^[63]).

Factores transcripcionales y proteínas autofágicas pueden estar involucradas en la regulación de la respiración en en capas celulares proliferativas provenientes de MCT-S-MCF-7.

En tumores primarios, la activación de procesos de degradación orgánica en regiones hipóxicas es un mecanismo para mantener el crecimiento e incluso para modificar el fenotipo tumoral a metastásico ^[93]. En este proceso, algunos de los componentes, como son agregados proteicos, peroxisomas, mitocondrias, RE y ribosomas de las células que han muerto por autofagia ^[94] y que se liberan al medio, son endocitados por las células cercanas a los vasos sanguíneos, con lo que obtienen sustratos para sobrevivir y proliferar. De manera relevante, se ha reportado que la mitocondria es uno de los organelos que se vuelve blanco del proceso de autodegradación lisosomal cuando se generan ambientes deprivados de nutrientes (mitofagia) ^[59, 95]; al evaluar la expresión de algunas proteínas implicadas en la autofagia en las capas celulares de los esferoides tumorales MCF-7, se encontró que particularmente la proteína Bnip3 involucrada en el marcaje mitocondrial para su degradación, se encuentra sobreexpresada 4.2 veces en la capa celular quiescente, lo que indica que efectivamente un proceso de “mitofagia” activo en este tipo celular es el que está

promoviendo un decremento en el contenido mitocondrial, y no mitocondrias “disfuncionales” (**Fig 8**).

Por otro lado, la sobreexpresión de algunos factores transcripcionales que regulan positivamente la fosforilación oxidativa y la biogénesis mitocondrial podrían estar involucrados en el incremento de la FO observado en las capas celulares proliferativas. Tal es el caso de p32, una proteína localizada predominantemente en la matriz mitocondrial y sobreexpresada en tumores, que se propone favorece la actividad de los complejos I, IV y PDH mitocondriales ^[27], cuya expresión se encontró 10.6 veces aumentada en las células proliferativas; el factor h-Ras que se propone regula la expresión de proteínas mitocondriales como COXIV, ATPasa y NADH- ubiquinona oxidoreductasa ^[29], se encontró sobreexpresado 7 veces en las células proliferativas y el factor c-Myc, que promueve la biogénesis mitocondrial así como la activación de la glutaminasa en regiones del tumor cercanas a los vasos sanguíneos ^[30], se encontró sobreexpresado 9 veces en las células proliferativas (**Fig. 7**). Resultados que muestran que de manera relevante las células proliferativas de los EMCT-MCF-7 presentan una mitocondria funcional, cuya actividad además se encuentra sobremodulada, probablemente para el suministro del ATP necesario para la sobrevivencia y crecimiento del tumor así como para un probable proceso metastásico que puede ser llevado a cabo por las células externas cercanas a los vasos sanguíneos.

Finalmente, la **Figura 9** es un esquema representativo de los principales hallazgos de este trabajo experimental, que muestra las adaptaciones del metabolismo energético que las células proliferativas y quiescentes de los EMCT-MCF-7 desarrollan al estar sometidas al crecimiento tridimensional y a los gradientes de oxígeno y nutrientes generados. Los datos obtenidos en este trabajo sientan las bases para futuras investigaciones en donde se desarrollen compuestos anti-mitocondriales y/o anti-glucolíticos (terapia multisitio) que se empleen como métodos alternativos y complementarios a la terapia antineoplásica convencional.

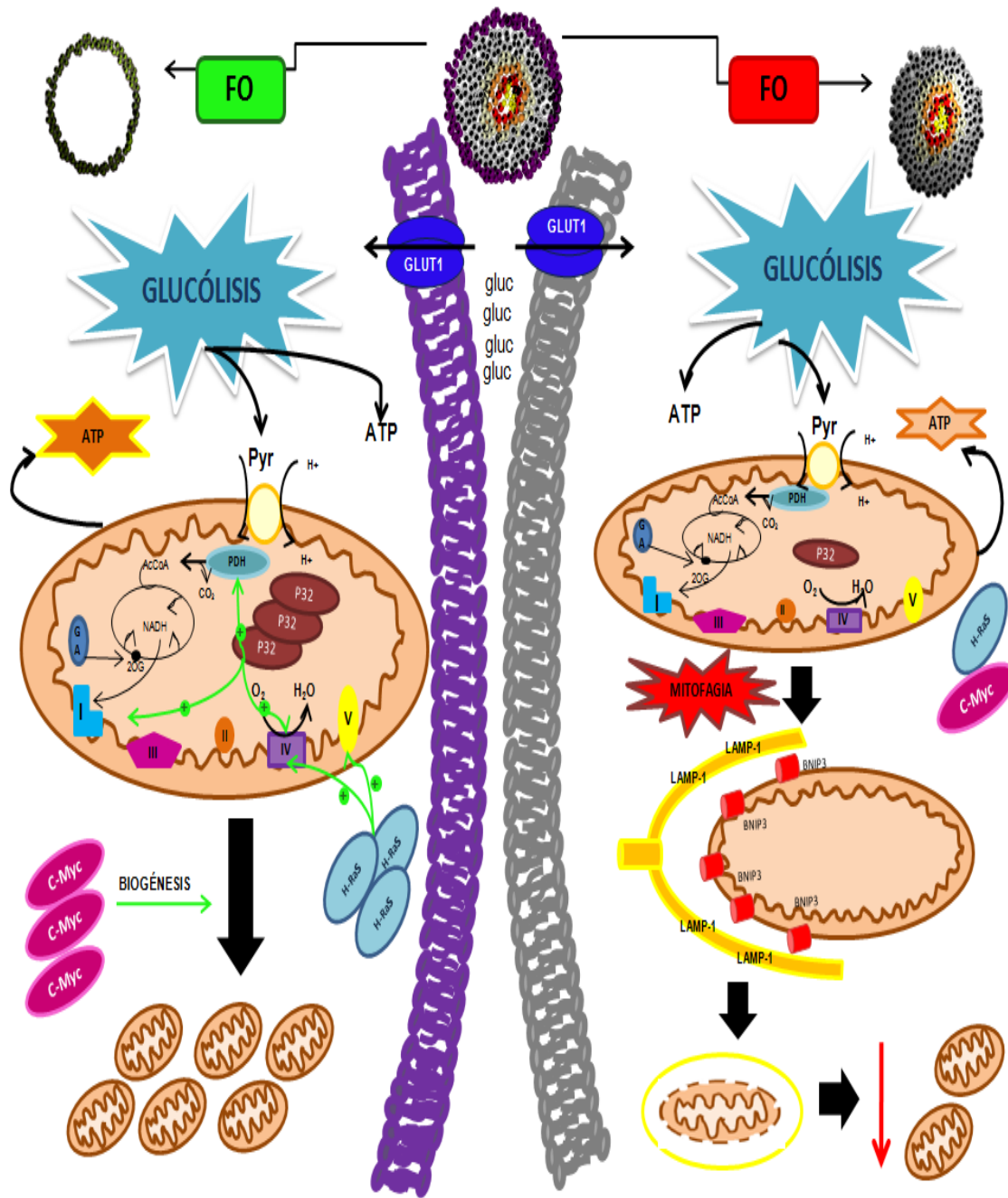


Figura 9. Metabolismo energético predominante en capas proliferativas y quiescentes provenientes de EMTC de carcinoma mamario. El flujo glucolítico es similar en ambas capas celulares. La fosforilación oxidativa disminuye en las capas quiescentes (derecha) donde posiblemente la activación mitofágica es un mecanismo que promueve una reducción en el contenido mitocondrial de las células. En las capas proliferativas (izquierda) se sobreexpresan factores transcripcionales que promueven un incremento en la expresión de algunas enzimas mitocondriales así como la biogénesis mitocondrial.

CAPITULO VI CONCLUSIONES

1. Las dos capas (proliferativa y quiescente) de los esferoides maduros de MCF-7 presentaron una actividad glucolítica similar.
2. La disminución en el flujo de la fosforilación oxidativa de las células quiescentes del EMCT MCF-7 correlacionó con una disminución en la expresión de las enzimas mitocondriales GA-K, GA-L, ND1, COXIV, ATPasa, PDH. A pesar de ello, la fosforilación oxidativa sigue siendo la principal vía de aporte de ATP en estas células.
3. La sobreexpresión de los factores transcripcionales p32, h-Ras y c-Myc en la capa proliferativa de los esferoides maduros es un posible mecanismo que promovió un aumento en el contenido de proteínas mitocondriales y por lo tanto en el flujo de la FO.
4. La activación mitofágica en la capa quiescente puede estar involucrada en la disminución del flujo de la FO.

REFERENCIAS

1. 2011, W.H.O., <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
2. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
3. Parkin, D.M., *Global cancer statistics in the year 2000*. Lancet Oncol, 2001. **2**(9): p. 533-43.
4. INEGI, I.N.d.E.y.G., <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2676&ep=8>, 2009.
5. Malvezzi, M., et al., *Trends in cancer mortality in Mexico, 1970-1999*. Ann Oncol, 2004. **15**(11): p. 1712-8.
6. Knaul, F.M., et al., *[Breast cancer in Mexico: an urgent priority]*. Salud Publica Mex, 2009. **51 Suppl 2**: p. s335-44.
7. INEGI, I.N.d.E.y.G., *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. www.inegi.com.mx, 2010.
8. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
9. Pappou, E.P. and N. Ahuja, *The role of oncogenes in gastrointestinal cancer*. Gastrointest Cancer Res, 2010(Suppl 1): p. S2-S15.
10. Tysnes, B.B. and R. Bjerkvig, *Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1775**(2): p. 283-97.
11. Stanley, L.A., *Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes*. Toxicology, 1995. **96**(3): p. 173-94.
12. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
13. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
14. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
15. Tennant, D.A., R.V. Duran, and E. Gottlieb, *Targeting metabolic transformation for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): p. 267-77.
16. Pedersen, P.L., et al., *Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1555**(1-3): p. 14-20.
17. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4633-46.
18. Rodriguez-Enriquez, S., et al., *Targeting of cancer energy metabolism*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53**(1): p. 29-48.
19. Marin-Hernandez, A., et al., *Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase*. FEBS J, 2006. **273**(9): p. 1975-88.
20. Zu, X.L. and M. Guppy, *Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(3): p. 459-65.

21. Moreno-Sanchez, R., et al., *Energy metabolism in tumor cells*. FEBS J, 2007. **274**(6): p. 1393-418.
22. Balinsky, D., C.E. Platz, and J.W. Lewis, *Enzyme activities in normal, dysplastic, and cancerous human breast tissues*. J Natl Cancer Inst, 1984. **72**(2): p. 217-24.
23. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 325-37.
24. Nakashima, R.A., M.G. Paggi, and P.L. Pedersen, *Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells*. Cancer Res, 1984. **44**(12 Pt 1): p. 5702-6.
25. Moreno-Sanchez, R., et al., *The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells?* Biofactors, 2009. **35**(2): p. 209-25.
26. Rodriguez-Enriquez, S., et al., *Oxidative phosphorylation as a target to arrest malignant neoplasias*. Curr Med Chem, 2011. **18**(21): p. 3156-67.
27. Fogal, V., et al., *Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(6): p. 1303-18.
28. Green, D.R. and J.E. Chipuk, *p53 and metabolism: Inside the TIGAR*. Cell, 2006. **126**(1): p. 30-2.
29. Telang, S., et al., *The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 77.
30. Dang, C.V., A. Le, and P. Gao, *MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(21): p. 6479-83.
31. Sloan, E.J. and D.E. Ayer, *Myc, mondo, and metabolism*. Genes Cancer, 2010. **1**(6): p. 587-96.
32. Liang, H. and W.F. Ward, *PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism*. Adv Physiol Educ, 2006. **30**(4): p. 145-51.
33. Kunz-Schughart, L.A., M. Kreutz, and R. Knuechel, *Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology*. Int J Exp Pathol, 1998. **79**(1): p. 1-23.
34. Gallardo-Pérez, J., Espinosa-Castilla, M., Meléndez-Zajgla, J. Maldonado-Lagunas, *Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas*. Revista de Educación Bioquímica, 2006. **25**: p. 101-107.
35. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science, 1988. **240**(4849): p. 177-84.
36. Freyer, J.P. and R.M. Sutherland, *Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids*. Cancer Res, 1980. **40**(11): p. 3956-65.
37. Zander, R. and P. Vaupel, *Proposal for using a standardized terminology on oxygen transport to tissue*. Adv Exp Med Biol, 1985. **191**: p. 965-70.
38. Bredel-Geissler, A., et al., *Proliferation-associated oxygen consumption and morphology of tumor cells in monolayer and spheroid culture*. J Cell Physiol, 1992. **153**(1): p. 44-52.
39. Hirschhaeuser, F., et al., *Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again*. J Biotechnol, 2010. **148**(1): p. 3-15.

40. Gorlach, A. and H. Acker, *pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1227**(3): p. 105-12.
41. Vaupel, P., et al., *Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements*. *Cancer Res*, 1991. **51**(12): p. 3316-22.
42. Hystad, M.E. and E.K. Rofstad, *Oxygen consumption rate and mitochondrial density in human melanoma monolayer cultures and multicellular spheroids*. *Int J Cancer*, 1994. **57**(4): p. 532-7.
43. Kunz-Schughart, L.A., et al., *Proliferative activity and tumorigenic conversion: impact on cellular metabolism in 3-D culture*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. **278**(4): p. C765-80.
44. Kunz-Schughart, L.A., R.C. Habbersett, and J.P. Freyer, *Impact of proliferative activity and tumorigenic conversion on mitochondrial function of fibroblasts in 2D and 3D culture*. *Cell Biol Int*, 2001. **25**(9): p. 919-30.
45. Freyer, J.P., et al., *In situ oxygen consumption rates of cells in V-79 multicellular spheroids during growth*. *J Cell Physiol*, 1984. **118**(1): p. 53-61.
46. Freyer, J.P. and R.M. Sutherland, *A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth*. *J Cell Physiol*, 1985. **124**(3): p. 516-24.
47. Rodriguez-Enriquez, S., et al., *Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids*. *J Cell Physiol*, 2008. **216**(1): p. 189-97.
48. De Witt Hamer, P.C., et al., *Quantification of viability in organotypic multicellular spheroids of human malignant glioma using lactate dehydrogenase activity: a rapid and reliable automated assay*. *J Histochem Cytochem*, 2005. **53**(1): p. 23-34.
49. Wu, F.J., et al., *Enhanced cytochrome P450 IA1 activity of self-assembled rat hepatocyte spheroids*. *Cell Transplant*, 1999. **8**(3): p. 233-46.
50. Freyer, J.P. and P.L. Schor, *Regrowth kinetics of cells from different regions of multicellular spheroids of four cell lines*. *J Cell Physiol*, 1989. **138**(2): p. 384-92.
51. Sutherland, R.M., et al., *Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma*. *Cancer Res*, 1986. **46**(10): p. 5320-9.
52. Bauer, K.D., P.C. Keng, and R.M. Sutherland, *Isolation of quiescent cells from multicellular tumor spheroids using centrifugal elutriation*. *Cancer Res*, 1982. **42**(1): p. 72-8.
53. Durand, R.E. and P.L. Olive, *Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342*. *J Histochem Cytochem*, 1982. **30**(2): p. 111-6.
54. Emaus, R.K., R. Grunwald, and J.J. Lemasters, *Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. **850**(3): p. 436-48.
55. Jacobson, J., M.R. Duchon, and S.J. Heales, *Intracellular distribution of the fluorescent dye nonyl acridine orange responds to the mitochondrial membrane potential: implications for assays of cardiolipin and mitochondrial mass*. *J Neurochem*, 2002. **82**(2): p. 224-33.
56. Freyer, J.P., *Rates of oxygen consumption for proliferating and quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids*. *Adv Exp Med Biol*, 1994. **345**: p. 335-42.

57. Freyer, J.P., *Decreased mitochondrial function in quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids*. J Cell Physiol, 1998. **176**(1): p. 138-49.
58. Yuhas, J.M., et al., *A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids*. Cancer Res, 1977. **37**(10): p. 3639-43.
59. Rodriguez-Enriquez, S., et al., *Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes*. Autophagy, 2006. **2**(1): p. 39-46.
60. Gornall, A.G., C.J. Bardawill, and M.M. David, *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. J Biol Chem, 1949. **177**(2): p. 751-66.
61. Carroll, J.S., et al., *p27(Kip1) induces quiescence and growth factor insensitivity in tamoxifen-treated breast cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4322-6.
62. Watanabe, S., et al., *Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Sci, 2010. **52**(3): p. 417-24.
63. Rodriguez-Enriquez, S., et al., *Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(10): p. 1744-51.
64. dos Santos, M.A., et al., *Metabolism of the microregions of human breast cancer*. Cancer Lett, 2004. **216**(2): p. 243-8.
65. Kunz-Schughart, L.A., et al., *The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model*. J Biomol Screen, 2004. **9**(4): p. 273-85.
66. Venkatasubramanian, R., M.A. Henson, and N.S. Forbes, *Incorporating energy metabolism into a growth model of multicellular tumor spheroids*. J Theor Biol, 2006. **242**(2): p. 440-53.
67. Perez-Gomez, C., et al., *Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells*. Biochem J, 2005. **386**(Pt 3): p. 535-42.
68. Kunz-Schughart, L.A., *Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor*. Cell Biol Int, 1999. **23**(3): p. 157-61.
69. Fulda, S., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Targeting mitochondria for cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(6): p. 447-64.
70. Ralph, S.N.J., *Mitochondria as targets for cancer therapy*. Mol. Nutr. Food Res., 2009. **53**: p. 9-28.
71. Chignola, R., et al., *Oscillating growth patterns of multicellular tumour spheroids*. Cell Prolif, 1999. **32**(1): p. 39-48.
72. Khaitan, D., et al., *Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy*. J Transl Med, 2006. **4**: p. 12.
73. Walenta, S., et al., *Metabolic imaging in multicellular spheroids of oncogene-transfected fibroblasts*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(4): p. 509-22.
74. Hochachka, P.W., et al., *Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9493-8.
75. Vaupel, P., C. Schaefer, and P. Okunieff, *Intracellular acidosis in murine fibrosarcomas coincides with ATP depletion, hypoxia, and high levels of lactate and total Pi*. NMR Biomed, 1994. **7**(3): p. 128-36.
76. Gorchach, A., et al., *Changes in growth, po(2) and ph after exposure to oxamate - studies of 2 human tumor-cell lines growing as multicellular spheroids*. Int J Oncol, 1995. **7**(4): p. 831-9.

77. Marin-Hernandez, A., et al., *HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms*. Mini Rev Med Chem, 2009. **9**(9): p. 1084-101.
78. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 891-9.
79. Walenta, S., T. Schroeder, and W. Mueller-Klieser, *Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology*. Curr Med Chem, 2004. **11**(16): p. 2195-204.
80. Chiche, J., et al., *Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 358-68.
81. Ullah, M.S., A.J. Davies, and A.P. Halestrap, *The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9030-7.
82. Mihm, S. and W. Droge, *Regulation of cytotoxic T-lymphocyte activation by L-lactate and pyruvate*. Cell Immunol, 1985. **96**(1): p. 235-40.
83. Fischer, K., et al., *Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3812-9.
84. Marin-Hernandez, A., et al., *Modeling cancer glycolysis*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(6): p. 755-67.
85. Osthus, R.C., et al., *Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21797-800.
86. Shim, H., et al., *c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6658-63.
87. Bensaad, K., et al., *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. Cell, 2006. **126**(1): p. 107-20.
88. Lui, V.W., et al., *Inhibition of c-Met downregulates TIGAR expression and reduces NADPH production leading to cell death*. Oncogene, 2011. **30**(9): p. 1127-34.
89. Jang, J.Y., et al., *Over-expression of adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) induces apoptosis and tumor regression in vivo*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 160.
90. Davies, C.D., et al., *Comparison of extracellular matrix in human osteosarcomas and melanomas growing as xenografts, multicellular spheroids, and monolayer cultures*. Anticancer Res, 1997. **17**(6D): p. 4317-26.
91. Murphy, B.J., et al., *Enhancement of heme oxygenase expression and activity in A431 squamous carcinoma multicellular tumor spheroids*. Cancer Res, 1993. **53**(12): p. 2700-3.
92. Fukuda, R., et al., *HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells*. Cell, 2007. **129**(1): p. 111-22.
93. Kenific, C.M., A. Thorburn, and J. Debnath, *Autophagy and metastasis: another double-edged sword*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 241-5.
94. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 245-53.
95. Kim, I. and J.J. Lemasters, *Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **300**(2): p. C308-17.

APÉNDICE 1
COLABORACIONES

Oxidative Phosphorylation as a Target to Arrest Malignant Neoplasias

Sara Rodríguez-Enríquez^{1,2}, Juan Carlos Gallardo-Pérez¹, Alvaro Marín-Hernández¹, José Luis Aguilar-Ponce², Edna Ayerim Mandujano-Tinoco¹, Abelardo Meneses² and Rafael Moreno-Sánchez^{*1}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México

²Laboratorio de Medicina Translacional, Instituto Nacional de Cancerología, México

Abstract: Since Warburg proposed in 1956 that cancer cells exhibit increased glycolysis due to mitochondrial damage, numerous researchers have assumed that glycolysis is the predominant ATP supplier for cancer cell energy-dependent processes. However, chemotherapeutic strategies using glycolytic inhibitors have been unsuccessful in arresting tumor proliferation indicating that the Warburg hypothesis may not be applicable to all existing neoplasias. This review analyzes recent information on mitochondrial metabolism in several malignant neoplasias emphasizing that, although tumor cells maintain a high glycolytic rate, the principal ATP production may derive from active oxidative phosphorylation. Thus, anti-mitochondrial drug therapy may be an adequate adjuvant strategy to arrest proliferation of oxidative phosphorylation-dependent neoplasias.

Keywords: Anti-mitochondrial drugs, glycolysis, oxidative phosphorylation, Warburg hypothesis, multi-site therapy, multi-drug therapy, respiratory inhibitors, uncouplers, lipophilic cation drugs, mitochondrial substrate oxidation, Krebs cycle.

INTRODUCTION

Warburg proposed several decades ago that tumor cells, in general, maintained an abnormally accelerated glycolysis rate even under aerobic conditions [1, 2]. Certainly, Warburg demonstrated that glycolysis was 60-times higher in rat ascites tumor cells than in liver (the organ of origin), but only 55 % of total ATP was produced by the fermentative process, whereas the rest was supplied by active oxygen consumption [1, 2], e.g., by mitochondrial ATP synthesis also called oxidative phosphorylation (OXPHOS). Neglecting the important role of mitochondria supplying ATP, his conclusion was that cancer cells have an impaired respiratory capacity which results in enhanced glycolytic rate [1, 2]. Nowadays this conclusion, known as Warburg's hypothesis, has become a hallmark of cancer malignancy transformation.

According to the Warburg proposal, tumor cell ATP must be obtained from hexose oxidation (e.g., mainly glucose, but also from fructose and mannose); in turn, ATP derived from mitochondrial substrates (which could not be actively oxidized by neoplasias) should be negligible. However, accumulating experimental evidence indicates that this proposal fails for a wide range of tumor cell lines [3, 4]. In this review several aspects of mitochondrial metabolism are updated, discussed and critically analyzed. Abundant evidence for the physiological relevance of mitochondrial function as the principal cellular energy center in cancer and, at the same time, as the biosynthetic engine that supports the high biosynthetic demand required for the accelerated cell proliferation is presented. Knowing that mitochondrial metabolism may play an important role sustaining tumor proliferation, anti-mitochondrial drug therapy emerges as an adequate adjuvant strategy to block neoplastic uncontrolled growth.

1. EXPERIMENTAL EVIDENCES SUPPORTING FUNCTIONAL OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

1.1. Active Mitochondrial Biogenesis in Some Malignant Neoplasias

In several rodent hepatomas (HC-252, C-57, Novikoff, 98/15) the mitochondrial morphology exhibits unusual dumbbell or cup shapes and the number of mitochondria *per* cell is less than 50% compared to the tissue of origin [reviewed in 5], suggesting an

active mitophagy (mitochondrial autophagy). However, in other rat tumor (Ehrlich) mitochondria orthodox shapes similar to those found in non-tumoral mitochondria are observed [6]. In fact, some human malignant neoplasias (thymic lymphoma) maintain a very active mitochondrial biogenesis which correlates with high mtDNA content, and increased expression of several OXPHOS genes (NADH and succinate dehydrogenases, cytochrome c oxidase) and respiration rate [7]. Thus, some neoplasias show unaltered or even higher number of mitochondria. The question that follows is whether these tumor mitochondria are functional or do they have diminished activity of relevant enzymes and transporters which may compromise OXPHOS and their other biosynthetic functions.

1.2. Active Mitochondrial Substrate Oxidation

Pyruvate

Controversial results have emerged from studies of mitochondrial pyruvate metabolism in cancer cells. For example, in rodent ascites cells pyruvate dehydrogenase complex (PDH) activity is 10-50- times lower than in non-tumorigenic cells (Table 1) [reviewed in 8]. Apparently, the lower PDH protein content and lower (4-times) CoA affinity than in its normal counterpart are two factors contributing to the lower tumor enzyme activity [9]. In AS-30D hepatocarcinoma, tumor PDH may oxidize mitochondrial pyruvate to acetoin and acetaldehyde [10]. Tumor PDH may also oxidize acetaldehyde to form acetoin which competitively inhibits PDH [11]. The low inhibition constant of PDH complex for acetoin ($K_i = 41 \mu\text{M}$) supports a physiological role for this kinetic mechanism to fully inactivate mitochondrial pyruvate oxidation. On the other hand, mitochondrial AMP at physiological concentrations (0.5-1 mM) acts as a potent tumor PDH activator [12]. In hepatocarcinoma and myeloid tumor isolated mitochondria, pyruvate oxidation is very active suggesting that the putative acetoin-induced PDH inhibition is overcome by the AMP-induced PDH activation [13; reviewed in 14] and/or that the acetoin level is well below the concentration required to inhibit PDH in these cancer cells.

It is worth recalling that mitochondrial acetyl CoA may also derive from other sources such as ketone bodies (KBs) and free fatty acid (FFA) oxidation. Therefore, assuming full PDH inactivation, there may still be a continuous acetyl CoA supply in cancer cells to feed the Krebs cycle. Also β -oxidation of FFA as well as KBs and glutamine oxidations generate NADH and FADH₂, both mitochondrial respiratory chain substrates.

Glutamine

In tumor cells, glutamine oxidation yields (1) reducing equivalents and pyruvate for nucleotide and amino acid synthesis,

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Col. Sección 16, Tlalpan, México D.F. 14080, México; Tel: (5255) 55 73 29 11; E-mail: rafael.moreno@cardiologia.org.mx

Table 1. Mitochondrial Enzyme Activities in Tumor and Normal Cells

Enzyme	Non-tumorigenic		Tumorigenic		Reference
	Cell Type	Activity	Cell Type	Activity	
Pyruvate Metabolism					
PDH	Rat mammary gland Rat liver	1-1.4 U/g wet weight tissue	Rat Ehrlich ascites Rat epidermal carcinoma: Rat Ehrlich ascites	0.026-0.1 U/g wet weight tissue 0.093 U/g packed cells	[9, a-c]
Glutamine Metabolism					
Plasma Gln transport	Rat hepatocytes Rat liver endothelial cells	0.09-2.4 mU/mg cellular protein	Hepatoma cells H4 Human neuroblastoma	0.42-14 mU/mg cellular protein	[15, d,e]
Mitochondrial Gln transport	Rat brain mitochondria Rat kidney mitochondria	3-7.5 mU/mg protein	Human Sk-Hep carcinoma Rat Ehrlich ascites	33-52 mU/mg cellular protein	[20, f,g]
GA	Rat liver Rat muscle	0.02-0.45 μ kat/g cellular protein	Lewis lung carcinoma bearing rat	1.26 μ kat/g cellular protein	[23, g,h]
	Human liver	25 mU/mg cellular protein	Human lung carcinoma	116-133 mU/mg cellular protein	
			Lymph node	5-10 U/g wet weight tissue	
GDH	Human leucocytes	0.618 μ kat/g cellular protein; 44 mU/mg cellular protein	Rat Ehrlich mitochondria	750 mU/mg protein	[i-k]
	Bovine liver mitochondria	186 mU/mg protein			
Aspartate transaminase	Rat liver	6.73 μ kat/g cellular protein	Lewis lung carcinoma	1.02 μ kat/g cellular protein	[23]
Mitochondrial NADP ⁺ ME	Rat hepatocytes	\leq 1 mU/mg cellular protein	AS-30D hepatoma Mouse thymoma Human leukemia Rat hepatoma	25-80 mU/mg cellular protein	[l,m]
Ketone Body Metabolism					
SCAAT	Rat hepatocytes	4.6 mU/mg cellular protein	Rat hepatocarcinomas JM2, RLT, H411E, MCA, RIT 7777	45-960 mU/mg cellular protein	[34]
Proline Metabolism					
POX	Rat liver homogenates	4.2 mU/mg homogenate protein	Human colorectal cancers RKO, HT29, HCT15	15 U/mg cellular protein	[n,o]

Abbreviations: GA, glutaminase; GDH, glutamate dehydrogenase; Gln, glutamine; Glu, glutamate; ME, malic enzyme; PDH, pyruvate dehydrogenase; POX, proline oxidase; SCAAT, succinyl-CoA acetoacetyl transferase.

1 kat corresponds to 1 mol substrate/sec.

*Knowles, S.E.; Ballard, F.J. *Biol. Neonate*, **1974**, *24*, 41-48.

^bSiess, E.A.; Nimmannit, S.; Wieland, O.H. *Cancer Res.*, **1976**, *36*, 55-59.

^cEboli, M.L.; Pasquini, A. *Cancer Lett.*, **1994**, *85*, 239-243.

^dMcGivan, J.D. *Biochem J.*, **1998**, *330*, 255-260.

^eLohmann, R.; Souba, W.W.; Bode, B.P. *Am. J. Physiol.*, **1999**, *276*, G743-G750.

^fAlbrecht, J.; Dolińska, M.; Hilgier, W.; Lipkowski, A.W.; Nowacki, J. *Neurochem Int.*, **2000**, *36*, 341-347.

^gBode, B.P.; Souba, W.W. *Ann. Surg.*, **1994**, *220*, 411-422.

^hArdawi, M.S.; Newsholme, E.A. *Biochem. J.*, **1984**, *217*, 289-296.

ⁱMoreadith, R.W.; Lehninger, A.L. *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 6215-6221.

^jKravos, M.; Malešič, I. *Neurodegener. Dis.*, **2010**, on line

^kHerrero-Yraola, A.; Bakhit, S.M.A.; Franke, P.; Weise, C.; Schweiger, M.; Jorcke, D.; Ziegler, M. *The EMBO J.* **2001**, *20*, 2404-2412.

^lMoreadith, R.W.; Lehninger, A.L. *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 6222-6227.

^mTeller, J.K.; Fahien, L.A.; Davis, J.W. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 10423-10432.

ⁿCooper, S.K.; Pandhare, J.; Donald, S.P.; Phang, J.M. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 10485-10492.

^oEhrnpreis, M.N.; Giambone, M.A.; Rojkind, M. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1980**, *629*, 184-193.

and for OXPHOS; (2) citrate for fatty acid and cholesterol synthesis; (3) pyruvate, oxaloacetate, glutathione as antioxidants; (4) 2-oxoglutarate (2-OG), succinate and fumarate as tumor gene transcription regulators and biosynthetic precursors; and (5) high NADH/NAD⁺ and FADH₂/FAD ratios for redox homeostasis. For efficient glutaminolysis, active plasma and mitochondrial glutamine transporters, both Krebs cycle and cytosolic enzymes, and respiratory chain activity are required (Fig. 1). Interestingly, the activity of almost all the glutaminolytic enzymes is higher in cancer cells, independently of tumor origin (Table 1), than that in non-tumor tissues [reviewed in 8].

Glutaminolysis starts with the entry of exogenous glutamine into tumor cells through over-expressed (at least 5 times more than normal counterparts) and very active glutamine transporters ASCT2, SNAT3, LAT1 or SCL7 [15-17]. The fate of cytosolic glutamine in cancer cells seems predominantly directed to mitochondria for generation of Krebs cycle intermediaries because: (i) there is over-expression of tumor transcription factors such as C-Myc which targets the plasma membrane SCL7 glutamine transporter and glutaminase genes [18]; (ii) there are higher rates of mitochondrial glutaminolytic enzymes and mitochondrial glutamine transporter (Table 1); and (iii) there is a lower rate of tumor glutamine PRPP amidotransferase (cytosolic) which competes with

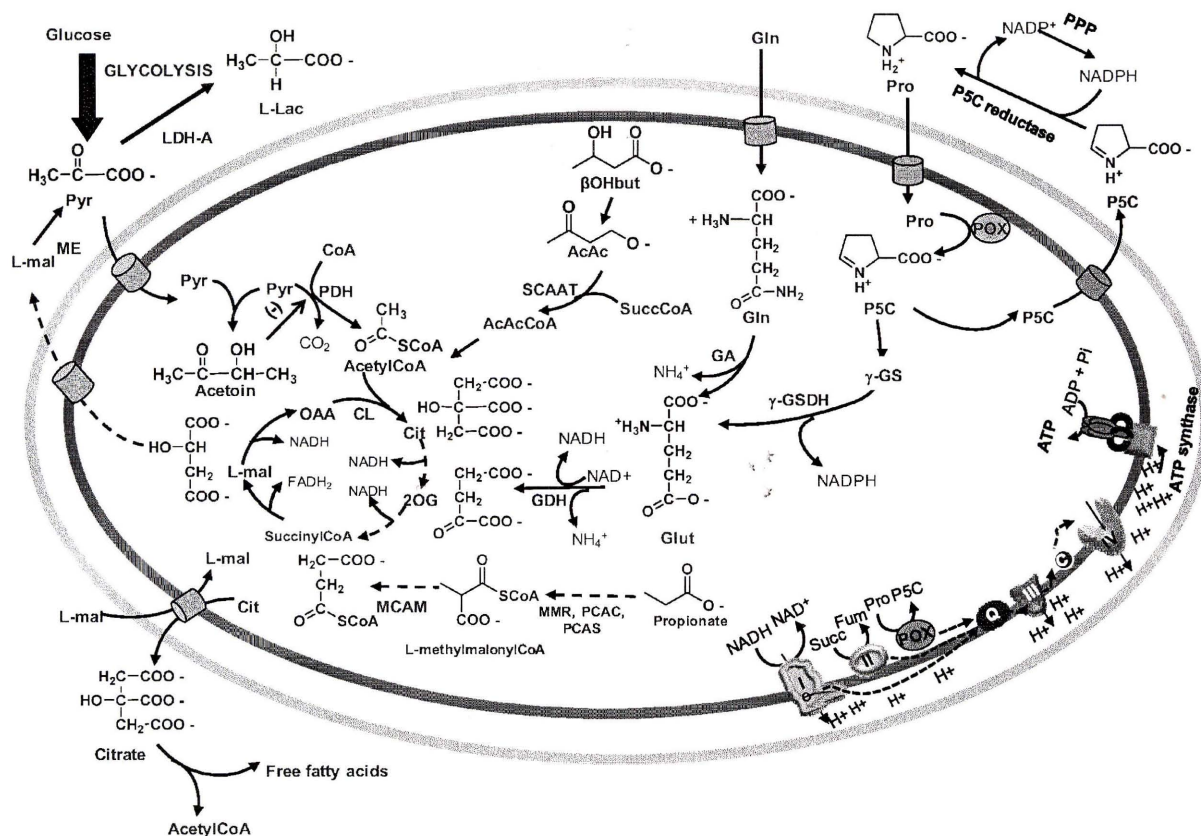


Fig. (1). Metabolic map showing the energy mitochondrial metabolism in some tumor cells. Abbreviations: AcAc, acetoacetyl; AcAcCoA, acetoacetyl-CoA; CL, citrate liase; Fum, fumarate; GA, glutaminase; GDH, glutamate dehydrogenase; Gln, glutamine; Glut, glutamate; L-Lac, L-lactate; L-mal, L-malate; MCAM, methylmalonyl-CoA mutase; MMCR, methylmalonyl CoA racemase; ME, malic enzyme; OAA, oxaloacetate; PDH, pyruvate dehydrogenase; PCAC, propionyl-CoA carboxylase; PCAS, propionyl-CoA synthetase; POX, proline oxidase; PPP, phosphate-pentose pathway; Pro, proline; pyr, pyruvate; P5C, pyrroline-5 carboxylate; Q, quinone pool; SCAAT, succinyl-CoA acetoacetyl transferase; succCoA, succinyl-CoA; Succ, succinate; 2OG, 2-oxoglutarate; β -OHbut, β -hydroxybutyrate; γ -GS, α -glutamate semialdehyde; γ -GSDH, γ -glutamate semialdehyde-dehydrogenase.

mitochondrial glutamine transporter for glutamine (4 vs. 52 nmol/min/mg protein, respectively) [19, 20].

Kinetic analysis of mitochondrial glutamine transport in Ehrlich hepatoma reveals (i) high specificity for L-glutamine and low affinity for other amino acids including D-glutamine; and (ii) high transport rate, affinity constant and protein over-expression compared to non-tumorigenic mitochondria (Table 1) [reviewed in 8]. In the mitochondrial matrix, glutaminase rapidly deaminates glutamine to glutamate and ammonia through a phosphate-dependent reaction. Kidney-type glutaminase predominates in some carcinoma and lymphoma cells and its expression is regulated by C-Myc. Likewise, the Liver-type isoenzyme is over expressed principally in leukemias and its expression is apparently independent of C-Myc. Both iso-enzymes are exclusively located in mitochondria and there is no experimental evidence of their presence in cytosol as suggested by Wise *et al.* (2008) [21]. In mitochondria isolated from Ehrlich ascites cells, glutamate dehydrogenase (GDH) activity is 17 times higher than that found in normal leukocytes (Table 1). In rat hepatocarcinoma biopsies, GDH activity can be 50 % higher (Morris and MDABP) or 50 % lower (ETI and Dunning) compared to normal tissues [22]. In normal mitochondria, glutamate can also be transformed into 2-OG by aspartate transaminase; however a 6.5 times lower activity for this enzyme has been detected in Lewis lung carcinoma-bearing liver rat compared to normal rat liver (Table 1) [23], suggesting that

glutamate oxidation goes principally through GDH in tumor cells. Once 2-OG is formed, it is oxidized through the Krebs cycle to malate (Fig. 1). In some tumor cells, NADP⁺-malic enzyme is over-expressed and distributed in both mitochondria (Table 1) and cytosol. Therefore, mitochondrial malate may be actively oxidized to mitochondrial pyruvate to generate acetyl-CoA or exported to the cytosol where it is transformed into lactate by an over-expressed lactate dehydrogenase type A [reviewed in 24] (Fig. 1).

Glutaminolysis is a specialized metabolic pathway that enables tumor growth and proliferation even in the absence of glucose. In fact, glutamine has been considered as the best oxidizable substrate to sustain proliferation in several human tumors [25]. It should be noted that for dynamic glutamine utilization in cancer cells, re-oxidation of the end-products NADH and FADH₂ by the respiratory chain is required. The H⁺ electrochemical gradient across the inner mitochondrial membrane formed by the respiratory chain in turn drives the synthesis of ATP by the ATP synthase or it is dissipated as heat by over-expressed uncoupling proteins [26, 27]. Information on glutamine metabolism is of clinical relevance because glutaminase and malic enzyme, enzymes with higher activity compared with those in normal cells, and the plasma membrane glutamine transporter ASCT2, which is presumably only expressed in tumor cells, may provide alternative and specific targets for cancer therapy.

Proline

Under nutritional stress, proline and hydroxy(OH)-proline are oxidized to glutamate to sustain tumor growth [28]. These imino acids, derived from extracellular matrix degradation, are actively oxidized in mitochondria from malignant cells that are subjected to nutritional stress (LoVo and RKO colon cancer cells) by up-regulating proline and OH-proline oxidases (POX; Table 1) through p53-, PPAR γ - and AMP-activated protein kinase- mediated mechanisms [reviewed in 28,29]. However, in gastric tract and renal cancer cells, POX expression can be found decreased [30]. The POX enzymes are also named proline and OH-proline dehydrogenases [28, 31]. POX and OH-POX are mitochondrial inner membrane flavo-proteins located close to the respiratory chain. In contrast to the other respiratory chain flavoproteins in NADH and succinate dehydrogenases (*e.g.*, respiratory complexes I and II) which transfer electrons to the quinone pool, POX and OH-POX transfer electrons directly to cytochrome c by-passing the quinone pool and the cytochrome bc1 complex [28].

It has recently shown that POX can reduce molecular oxygen to generate superoxide [32] contributing to the increase in the ROS pool observed after nutrient stress. POX generates Δ -pyrroline-5-carboxylate (P5C) which (a) may be exported to the cytosol and recycled to proline by the proline/pyrroline reductase or (b) be non-enzymatic and spontaneously transformed into glutamate- γ -semialdehyde, which is dehydrogenated by glutamate- γ -semialdehyde dehydrogenase to generate glutamate and then 2-OG, to feed the Krebs cycle for NADH generation, increase in anaplerotic substrates and OXPHOS activation (Fig. 1). Proline oxidation also provides an alternative pathway where the NADPH formed by the pentose-phosphate pathway is shuttled into mitochondria for proline cycling to finally generate FADH₂ (Fig. 1) [28]. Thus, in the absence of nutrients, tumor survival can be ensured by the proline induced-OXPHOS activation.

Ketone Bodies (KBs)

Host liver is an important source of KBs (acetoacetate, β -hydroxybutyrate) to drive ATP synthesis and as lipogenic precursors in tumor cells. By virtue of their protonated state, ketone bodies are able to freely diffuse across biological membranes. In normal mitochondria, KBs may also be incorporated into the mitochondrial matrix *via* monocarboxylate transporters [33]. In several rat hepatocarcinomas, KBs oxidation is accelerated due to the high mRNA content, protein over-expression and elevated activity (9-200 times *vs.* hepatocyte counterpart) of succinyl-CoA acetoacetyl transferase (SCAAT), enzyme that converts acetoacetate to acetoacetyl-CoA in the presence of succinyl-CoA [34, 35] (Table 1, Fig. 1). SCAAT over-expression correlates with the accelerated hepatoma growth suggesting a possible target in cancer therapy. In contrast, some gliomas lack the capacity to oxidize KBs due to a lower SCAAT activity compared to normal neurons and glia cells [36]; thus gliomas show greater dependence on glycolysis. In colon, rectum and small intestine neoplasias and in some hepatocarcinomas, mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2), which transforms acetoacetyl-CoA into HMG-CoA (the precursor of acetoacetate and acetyl-CoA), is down-regulated by C-Myc [37], and hence, ketogenesis is blocked.

Free Fatty Acids (FFA)

If glucose and/or glutamine are scarce, mitochondrial FFA β -oxidation provides another alternative energy supply pathway. Some carcinomas (human breast cancer) have low β -oxidation capacity [38], whereas others (HepG2) can actively oxidize palmitate and stearate through mitochondrial and peroxisomal β -oxidation, increasing the acetyl-CoA pool [39]. Activation of the P13K/Akt signal transduction system in some tumor cells [40] down-regulates the expression of carnitine palmitoyltransferase 1A [41], which may contribute to a decreased β -oxidation rate. Unfortunately, the enzyme activities have been not determined

which hampers the establishment of a solid correlation between the increases in flux (measured as acetyl-CoA production) with specific or generalized increase in the β -oxidation enzyme activities.

FFA and KBs oxidations can be stimulated by the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR), a transcriptional factor that up-regulates the mitochondrial very long-chain, long-chain, and short-chain acyl-CoA dehydrogenases (VLCAD, LCAD, SCAD), the short-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase (which is also required for degradation of KBs), and malonyl-CoA decarboxylase genes [reviewed in 42]. Several tumor cells (prostate, colon, breast, non-small cell lung and brain) over-express PPAR- γ isoform, which is also involved in the activation of growth, apoptosis and cellular differentiation [42]. In addition to its role in the regulation of lipids utilization, PPAR- α isoform seems also involved in the regulation of the glutamine and glucose homeostasis either decreasing [43] or increasing [44] the levels of these metabolites.

Propionate

In normal tissues, propionate is transformed in the mitochondrial matrix to propionyl-CoA, D-methylmalonyl-CoA, and L-methylmalonyl-CoA by propionyl-CoA synthetase (PCAS), propionyl-CoA carboxylase (PCAC), methylmalonyl CoA racemase and methylmalonyl-CoA mutase (MCAM) to yield succinyl-CoA, a Krebs cycle intermediate. Although propionate metabolism has not been extensively examined in tumor cells [reviewed in 8], some malignant carcinomas (CaCo-2 colon and EMT6) consume propionate at high rates, even in the presence of carbohydrates or glutamine, to increase the anaplerotic substrates succinate, malate and glutamate (Fig. 1) [45, 46].

1.3. Complete Krebs cycle

In Ehrlich rat hepatomas, some of the mitochondrial citrate formed from condensation of acetyl CoA and oxaloacetate by citrate synthase is actively exported to the cytosol to generate FFA, cholesterol, isoprenoids and to regenerate the cytosolic acetyl-CoA pool (Fig. 1). This incomplete citrate oxidation by "truncated" Krebs cycle is a consequence of low aconitase and isocitrate dehydrogenase activities and probably high tricarboxylate transporter activity. However, as described in the previous section, other carcinomas readily oxidize glutamine, KBs, FFA and propionate, indicating adequate functioning of the full set of Krebs cycle enzymes [reviewed in 14]. In consequence, high levels of the respiratory chain substrates, NADH and FADH₂, can be generated to sustain OXPHOS. Similarly to normal mitochondria, matrix free Ca²⁺ is a potent activator of tumor isocitrate dehydrogenase (ICDH) and 2-OGDH [reviewed in 14]; Ca²⁺ activation of ICDH and 2-OGDH might compensate for the low aconitase and ICDH activities. However, variations in matrix Ca²⁺ in tumor mitochondria have not been extensively explored.

To meet the high demand for ATP in proliferating cancer cells, mitochondria have to reduce coenzymes through the Krebs cycle at high rates and be able to preserve the H⁺ electrochemical gradient built up by the respiratory chain to drive ATP synthesis catalyzed by ATP synthase (and the ATP/ADP translocase and Pi carrier). Deficient ATP synthesis may be caused by the collapse of the H⁺ gradient induced by over-expressed uncoupling proteins as described for some cancer cells [26], or by decreased expression of the OXPHOS enzymes and transporters [27]. In the tumor mitochondria where the H⁺ gradient has been determined, it has been demonstrated that they build an electrical gradient of a higher magnitude than that attained by normal mitochondria [reviewed in 47]. Therefore, mitochondria from many cancer cell lines and tumors show all the required factors for efficient OXPHOS: adequate expression of OXPHOS enzymes and transporters; high activities of Krebs cycle individual enzymes and hence high pathway flux (*e.g.*, high CO₂ and NADH production); high rates of

electron transport and oxygen consumption; and elevated H⁺ gradients (Table 2).

The ectopic expression of oncogene H-Ras in immortalized bronchial epithelial cells promotes an increase in mitochondrial aspartate, glutamate/glutamine and uridine concentrations, suggesting Krebs cycle and aspartate/malate NADH shuttle activation, correlating with the significant increase in cellular oxygen consumption [48] and presumably ATP synthesis. These observations suggest that the acquisition of H-Ras induced cancer phenotype is associated with OXPHOS activation.

1.4. Oxygen Availability does not Limit OXPHOS in Solid Neoplasias

The prevalence of hypoxic areas (1- 10 $\mu\text{M O}_2$) inside solid tumors is a characteristic of the majority of solid neoplasias [49, 50]. Therefore, it is frequently assumed that OXPHOS (at the cytochrome c oxidase, COX level) is limited by the low O_2 availability inside the tumor. However, kinetic analysis of COX reveals that the oxygen concentration in hypoxic environments cannot compromise tumor COX functionality ($K_{m\text{O}_2} = 0.1\text{-}0.8 \mu\text{M}$) [51-55], implying that hypoxia may only indirectly affect this and other OXPHOS enzymes. In this regard, it has been documented that prolonged hypoxia (16-24 h) alters the gene transcription of several OXPHOS enzymes (glutaminase, 2-OGDH, respiratory complex I subunit-I, COX subunit-III, and ATPase subunit-6) in human and rodent carcinomas [56-58]. However, the enzyme activities and contents of hypoxia-associated transcription factors (HIF-1 α and p53) have not been evaluated except for glutaminase [56, 58], thus a transcription-function correlation (*e.g.*, the relationship between the transcription factor content, the target-protein content and activity, and in consequence the variations in the pathway flux where this target-protein operates) cannot be yet properly established.

In some carcinomas, the pyruvate dehydrogenase kinase-1 (PDK1) is up-regulated by hypoxia through HIF-1 α activation [59]. PDK1 inactivates the PDH complex by phosphorylation leading to the blockade of mitochondrial pyruvate oxidation, favoring cytosolic conversion to lactate by LDH, and impairing mitochondrial function [59]. PDK1 knock-down in head and neck squamous cancer induces the loss of the capacity to excrete lactate and pyruvate after prolonged and severe hypoxia (16-48 h at 0.1% O_2), showing the important role of PDK1 in maintaining tumor glycolysis [60]. However, it should be noted that the proposal of PDK1-mediated impairment of mitochondrial function depends on several assumptions: (1) pyruvate is the main oxidizable substrate in hypoxic cancer cells; (2) PDH is the rate limiting step of tumor Krebs cycle; and (3) mitochondrial pyruvate is exclusively oxidized by PDH. The first assumption seems incorrect because tumor cells are able to oxidize at high rates alternative substrates that feed the Krebs cycle such as glutamine, glutamate, proline [see section 2; reviewed in 4, 61], FFA (Hernández-Esquivel L., Marín-Hernández A., Rivero-Segura N, Moreno-Sánchez R and Rodríguez-Enriquez S., unpublished data) and KBs [35]. The second assumption has not been experimentally evaluated in tumor mitochondria (that a 1% decrease in PDH activity induces a 1% decrease in Krebs cycle flux), but the control of the Krebs cycle flux in normal mitochondria is shared by several enzymes. Questioning the third assumption, mitochondrial pyruvate might also be oxidized by a very active NADP⁺-malic enzyme to generate Krebs cycle intermediaries [reviewed in 4, 61]. In addition, total PDH phosphorylation and inactivation have not been demonstrated whereas knockdown of PDK1 increases respiration only by 25 % under hypoxia [59, 62]. Therefore, significant diminution in respiratory and ATP synthesis rates or, in contrast, glycolysis enhancement, induced by PDK-1 over-expression in cancer cells has not been clearly demonstrated.

Although the OXPHOS hypoxia-targets have not been yet identified, it is clear that 24 h hypoxia diminishes the oxygen rate consumption in several tumor [51, 56, 59, 63] and normal cells [64]. Therefore, to maintain the ATP levels under hypoxic stress, tumors over-express glycolytic proteins (GLUT-1, HK, PGI, ALDO, GAPDH, PGK, ENO1, PYK and LDH) [65, 66] and in consequence increase the glycolytic flux and the cytosolic ATP synthesis [67]. In the studies where hypoxia effects have been analyzed, the oxygen consumption and glycolysis rates have not been determined in the same tumor type, as has been calculated for normoxic conditions (Table 2); thus, the principal ATP-producer under prolonged hypoxia stress has not yet been identified. In this regard, we have determined that severe but physiological (0.1% atmospheric O_2) 24 h hypoxia shifts the cellular ATP-dependence from oxidative (80-90%, under normoxia) to glycolytic (60-70%, under hypoxia) metabolism in malignant human carcinomas to maintain cellular survival [56].

In vivo, cells constituting hypoxic inner cores in solid tumors are stressed by the scarce oxygen concentration but also by severe glucose limitation. Studies on the simultaneous effect of both stresses have been scarce. In several human malignant carcinomas (HeLa, MiaPaca2, PCI-43 and BxPC3) 24-48 h moderate hypoxia (1% O_2) plus low glucose (0.27 mM) increased (3-4 times) the mRNA content for some glycolytic proteins (HKII, GLUT1 and GLUT3) compared to 24-48 h hypoxia plus physiological glucose concentration (5.5 mM) [68]. Although glycolysis flux and glycolytic enzyme activities were not evaluated, it was assumed that the changes in the mRNA content led to increased glycolysis functionality. In contrast, 24-96 h hypoxia plus high glucose (25 mM) severely damaged breast tumor mitochondrial metabolism [56, 69]. Moreover, breast tumor cells, but not normal cells, subjected to 96 h hypoxia in the absence of glucose (replacing glucose by galactose and glutamine) showed an enhanced mitochondrial respiratory capacity that exceeded that developed by normal cells; the same increased respiration pattern was also shown by breast cancer cells cultured under normoxia and glucose deprivation [69]. Therefore, it may be concluded that high glucose restricts more potently than hypoxia the expression of OXPHOS genes [69], in addition to directly exerting kinetic inhibition of the OXPHOS flux (*i.e.*, Crabtree effect, the glycolysis inhibition of OXPHOS flux [70]) in cancer cells.

In turn, mitochondrial metabolism is also involved in the stabilization and activation of HIF-1 α since succinate and fumarate inhibits the 2-oxoglutarate dependent-prolyl hydroxylase activity. The accumulation of these two Krebs cycle intermediates is associated with the loss of function of succinate dehydrogenase and/or fumarate hydratase, two important tumor suppressors in some neoplasias [71].

Summarizing, prolonged hypoxia induces glycolysis activation and OXPHOS depression whereas hypoglycemia induces glycolysis as well as OXPHOS activation. Which energy pathway is then supplying the cellular ATP demand in those areas of solid tumors subjected to different degrees of hypoxia and hypoglycemia? To answer these questions, an integral analysis of mRNA, protein content, enzyme and transporter activities, and fluxes of the glycolytic and OXPHOS pathways carried out under closer tumor physiological conditions (*e.g.*, hypoxia/normoxia cycling, nutritional stress) may help to better understand the authentic energy metabolism adaptations of cancer cells to hostile micro-environments and to envision more efficient and realistic anticancer therapies. The same integral approach may also be required for analyzing the role of epigenetic regulation of energy metabolism gene expression as there is some recent evidence suggesting that histone acetylation/deacetylation affects expression and activity of some glycolytic and OXPHOS genes [72, 73].

2. OXPHOS IS THE PRINCIPAL CONTRIBUTOR TO ATP SUPPLY IN SOME MALIGNANT NEOPLASIAS UNDER NORMOXIA

Certainly it has been experimentally demonstrated that the glycolysis rate is increased in the majority of neoplasias independently of the tissue of origin [reviewed in 4]. However, only in a small fraction of analyzed tumors does glycolysis contribute importantly (50-70%) to the total cellular ATP, as determined under normoxic conditions. A similar conclusion can be reached from original Warburg data where glycolysis contribution to ATP supply accounted for 55%. Most importantly, in many presumed glycolytic tumors (Table 2), OXPHOS predominates over glycolysis for ATP supply.

It has been recently shown that lactate can be both actively generated or oxidized by aerobic tumor cells [74]. The authors proposed that solid tumors have a functional compartmentalization of energy metabolism in which lactate released from hypoxic cells, which are localized more than 150 μm [75] away from the O_2 supply source, may fuel the oxidative metabolism of the aerobic cellular subpopulation, which is presumably closer to blood vessels. For this lactate cycling, it is kinetically required that hypoxic cells express LDH-A ($K_{m\text{Lact}} = 7 \text{ mM}$) and monocarboxylate transporter 4 (MCT4) ($K_{m\text{Ext Lact}} = 22 \text{ mM}$), whereas aerobic cells should express LDH-B ($K_{m\text{Lact}} = 4 \text{ mM}$) and MCT1 ($K_{m\text{Ext Lact}} = 3.5\text{-}10 \text{ mM}$) [74]. However, these aspects remain to be experimentally tested. In this proposed lactate cycling, PDH would play a relevant role for

OXPHOS in oxidative cells because the lactate, internalized, would be oxidized to pyruvate which would have to be transformed into acetyl-CoA to feed Krebs cycle, the respiratory chain and ATP synthesis (Fig. 1).

As discussed previously, the solid tumor inner micro-environment develops hypoxic areas due to their disorganized tumor neo-vasculature. However, tumor cells may not be exposed to continuous oxygen limitation (chronic hypoxia). Recent studies have shown that oxygen delivery to mammalian solid tumors is constantly fluctuating, resulting in re-oxygenation events throughout the entire tumor [76, 77]. In consequence, the oxygen concentration in certain tumor micro-areas may fluctuate from $> 10 \text{ mmHg}$ (or $> 13 \mu\text{M O}_2$) to $< 3 \text{ mmHg}$ (or $4 \mu\text{M O}_2$) and *vice versa*, in relatively short time periods (seconds or minutes) [78]. This lowering in oxygenation may in turn induce severe changes in the tumor phenotype increasing metastases and proliferation potentials and radiotherapy resistance; and changing expression profile of numerous genes [79-81]. At the molecular level, intermittent hypoxia increases HIF-1 α [82] *albeit* by different mechanisms to those reported for chronic hypoxia [reviewed in 83]: intermittent hypoxia induces over-expression of specific HIF-target genes whose expression is not modified by chronic hypoxia [84]. On the contrary, in non-tumorigenic cells, intermittent hypoxia does not change the HIF-induced expression profile [85]. Expression of HIF-metabolic targets (glycolytic and OXPHOS enzymes and transporters) after intermittent hypoxia treatment has not been explored.

Table 2. OXPHOS Contribution to ATP Supply in Some Tumor Cells

Cell Type	Mitochondrial ATP contribution	Glycolysis ATP contribution	OXPHOS ATP contribution (%)
$\mu\text{mol/h/ 30-35 mg tumor homogenate protein}$			
Rat Hepatoma 5123	35-40	0.84	97.5
Rat Hepatoma Reuber H-35	82	1.0	99
Rat Hepatoma Morris 3924A	19	8.3	70
Rat Hepatoma Morris 7793	107.5	0.7	99
Rat Hepatoma Morris 7795	66	0.9	98
Rat Hepatoma Morris 7800	79	4.9	94
Rat Hepatoma Morris 7316B	120.5	9.77	92.5
Rat Hepatoma Primary DAB	18.5	4.1	82
$\text{nmol/min/mg cellular protein}$			
Rat AS-30D hepatocarcinoma	65	1.35	98
Human Hela carcinoma*	6	4	79
Human MCF-7 breast carcinoma*	14	3.5	91
$\mu\text{mol/min/ g wet tissue}$			
Human Breast carcinoma	9.25	0.45	95
Human Ovarian carcinoma	9.16	0.29	97
Human Melanoma	14.8	0.50	97
Human Thyroid carcinoma	13.7	0.55	96
Human Uterine carcinoma	9.92	0.57	95
Human Lung carcinoma	20.4	1.13	95
Rat tumour (DS-carcinosarcoma)	21.6	1.57	93

Modified from [3]. * Taken from [56].

In terms of energy efficiency, the total glucose oxidation yields 36-38 ATP *per* glucose, assuming P/O ratios of 3 and 2 for NADH and FADH₂ like most of the biochemistry text books, or 30-32 ATP *per* glucose, considering the experimentally determined P/O ratios of 2.5 and 1.5 for NADH and FADH₂, respectively. In marked contrast, glycolysis can only generate 2 ATP molecules *per* glucose, assuming no significant pathway leaks. Moreover, to rigorously determine the rate of glycolysis, particularly in tumor cells, the rate of lactate (+ pyruvate) formation must be corrected by adding the upper segment glycolytic inhibitors 2-deoxyglucose (2-DOG), arsenite or iodoacetic acid in parallel experiments, to discard lactate produced from glutaminolysis (see section 1.2), and alanine oxidation. Also, glycolysis should be determined in the absence of exogenous glucose to reveal the contribution of glycogenolysis to lactate production. Unfortunately, glycolytic inhibitors, as the majority of metabolic inhibitors, are non-specific and they may affect the activity of non-glycolytic enzymes. To rigorously determine the OXPHOS flux, the oxygen consumption rate must be corrected by adding oligomycin, a tightly bound and specific ATP synthase inhibitor. This correction is required because in tumor cells the activity of several non-mitochondrial oxygen-consuming enzymes (plasma membrane electron transport, heme oxygenase and cytochrome P₄₅₀) is increased [86-89]. Unfortunately, these control experiments for determining the rates of glycolysis and OXPHOS in cancer cells have been seldom carried out, which questions the calculations of ATP supply so far reported.

Several tumor cell lines have been analyzed in terms of their energy production (Table 2). Except for AS-30D, HeLa and MCF-7 carcinomas, the oxygen consumption determined in the rest of the neoplasias was not oligomycin-corrected, thus total respiration was considered for calculation of the ATP derived from OXPHOS. From these data, it is clear that OXPHOS predominates for ATP supply, in the neoplasias documented in Table 2. Other carcinomas (glioblastoma multiforme, astrocytoma, and certain forms of rat hepatomas) utilize both glycolysis and OXPHOS to an approximately equal extent for energy production [3, 90-92], whereas bone sarcoma, and lung, breast, skin, cervical, ovarian and uterus carcinomas all primarily make use of OXPHOS for the supply of ATP [3, 92-95].

The identification of the principal ATP supplier in neoplasias offers important alternatives for the anticancer therapy. For example, the selective inhibition of the major ATP supplier may abolish drastically tumor proliferation. In this regard, it has been determined that the growth of some human carcinoma cells (HeLa, AS-30D, mesothelioma, neuroblastoma and prostate cancer) is highly sensitive to OXPHOS inhibitors at submicromolar doses (casiopinas, oligomycin, α -TOS and analogues) [reviewed in 47]. However, this approach may not be successful *in vivo* because several normal organs and tissues predominantly depend on OXPHOS. Therefore, alternative strategies must be developed based on other biochemical differences between cancer and normal cells. For example, several mitochondrial drugs may specifically target cancer cells by *virtue* of changes in (i) their plasma and mitochondrial electrical trans-membrane potentials; (ii) the activity of specific enzymes; and (iii) their more acidic extracellular and cytosolic pH microenvironments. Some delocalized lipophilic cations (DLC) are concentrated to a higher extent (10-fold more *vs.* normal ones) into tumor cells and mitochondria in response to their higher electrical gradients across the plasma and inner mitochondrial membranes (negative inside). This cancer cell bioenergetic feature (although not yet documented for an extensive set of cancer cells) originates in part from its higher cardiolipin (augmenting the negative charge membrane surface density) and cholesterol (diminishing the ion passive diffusion across the membranes) contents compared to normal cells [reviewed in 47]. Therefore, DLCs affect cancer mitochondrial and cellular functions at relatively low doses without apparent effect on non-tumorigenic tissues [reviewed in 47] (see section 4 below for details).

Alternatively, some anticancer drugs such as α -tocopheryl succinate (α -TOS) and analogues induce apoptosis without affecting normal cells as result of a low esterase expression in malignant cells. In the absence of esterases, α -TOS is not cleaved to innocuous vitamin E, while the high level of esterases activity found in normal cells protects them against α -TOS [96, 97]. An acidic medium also favors the penetration of some anti-mitochondrial drugs such as α -TOS because the protonated drug does not confront the thermodynamic barrier of crossing membranes as an anion.

3. OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN STEM CELLS AND RHO CELLS

Stem Cells

Recently, several studies have focused on stem cells due to their role as cancer precursors. Interestingly, the activation of the differentiation process induces changes in the energy metabolism in normal stem cells. Whereas non-differentiated stem cells maintain high glycolytic protein contents and glycolysis rate, and thus high sensitivity towards glycolytic drugs, the differentiated cells develop high numbers of mtDNA copies, accelerated respiratory rates, high ATP content, and thus high sensitivity towards OXPHOS inhibitors. This pattern clearly indicates that an energy metabolism transition from glycolysis to OXPHOS is required to induce differentiation in normal stem cells [98]. Similar patterns regarding OXPHOS (up-regulation of citrate synthase, PDH, ICDH, SDH, fumarate hydratase and higher mitochondrial ATP-dependence) have also been observed during transformation of stem cells into oncogenic cells [99].

In cancer stem cells-derived solid and mature tumors, high up-regulation of hypoxia-related genes (HIF-1 α , HIF-2, VEGF) and glycolytic genes is observed, but with (1) no apparent change in the glycolytic flux and (2) high down-regulation of Krebs cycle genes. These observations indicate that (i) neoplastic transformation changes the glycolytic phenotype of normal stem cells towards an oxidative phenotype, contradicting the proposal that aerobic glycolysis is required for neoplastic transformation [100, 101]; and (ii) neoplastic transformed cells return to glycolytic dependence (induced by the inner hypoxic and hypoglycemic microenvironment) during solid tumor growth [99]. It seems clear that the complete characterization of the energy metabolism in stem cells is required to identify new metabolic targets for anticancer therapy.

Rho Cells

To maintain the cytosol redox status, OXPHOS-deficient (rho) cells couple their high glycolysis with an efficient plasma membrane redox system [102]. In consequence, rho cell growth is drastically inhibited by the glycolytic inhibitors 2-DOG, iodoacetamide or oxamate at 5-10-times lower doses than those used for normal counterparts [91, 102, 103]. Interestingly, OXPHOS inhibitors also induce lactate overproduction and significant cellular hyper-sensitization to glycolytic inhibitors in normal cells and in solid tumor with hypoxic micro-regions [47, 91], suggesting that solely a fully abolished OXPHOS switches the energy metabolism towards glycolysis [91].

The absence of mitochondria (and mtDNA) favors in some rho cells (HeLa, osteosarcoma) survival during chemotherapy because there is (i) diminished capacity for uptake and accumulation of positively charged antineoplastic drugs [103, reviewed in 47]; and (ii) increased resistance towards classical DNA-intercalating drugs [104]. In addition, decreased cellular ROS levels in neuron rho cells has been demonstrated [102, 105] whereas in other models (Namalwa rho cells), the up-regulation of the plasma membrane oxidoreductase [106] suggests that rho cells may be associated with an increase, rather than a lowering, in ROS [107]. These rho

Table 3. Effect of Antineoplastic Drugs used in Clinical Trials on Tumor Mitochondrial Metabolism

Drug	Effect	Tumor type	Reference
DNA-Intercalating agents			
Camptothecin	MMP reduction; high COX expression and activity	SiHa cells	[129, a]
Casiopina-Igly	SDH and 2-OGDH inhibition; OXPPOS flux inhibition; mitochondrial swelling	AS-30 rat and HeLa carcinomas	[b]
Cisplatin	NADH dehydrogenase inhibition; mitochondrial number lowering; altered mitochondrial morphology; ATP levels decrease	Dalton's lymphoma-bearing mice; EC-109 esophageal carcinoma; melanoma; Zadjela hepatoma,	[c-f]
Ditercalinium	mtDNA damage and degradation; diminution in cellular respiration; ATP levels decrease	HeLa carcinoma; L1210 leukemia	[114, 128]
Doxorubicin (Doxo)	Acyl-CoA thioesterase 2, Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase and mitochondrial precursor (HADH) downregulation. Inhibition of ADP-stimulated respiration, and P/O ratio, COX and ATP synthase activities	Burkitt lymphoma; Raji; Ehrlich hepatocarcinoma	[g,h]
Oxaliplatin	Mitochondrial depolarization	HCT-15 colon carcinoma	[i]
Epirubicin	Mitochondrial swelling	FM3A mammary carcinoma	[j]
Adjuvant chemotherapy			
Apoptolidin	F ₀ -F ₁ ATPase inhibition	A12-3Y leukemia	[k]
α-TOS and analogues	Respiratory chain complex II inhibition	H-Ras transformed fibroblasts	[118, 120]
Gemcitabine	Mitochondria morphology alteration and derangement of mitochondrial cristae; OXPPOS uncoupling	Bx-PC3 pancreatic carcinoma, leukemia cells	[l, m]
Taxol	Mitochondria morphology alteration; uncoupling effect and increase in ROS production; MMP loss; decrease in the MMP functionality.	SK-N-SH neuroblastoma; thyroid cancer; Ehrlich isolated mitochondria	[n-p]
Imatinib	Mitochondrial membrane depolarization	U87-MG and U373-MG glioma	[130]
Tirapazamine, tetrahydrocannabinol, 5-fluorouracil, sulindac, indomethacin	MMP reduction	HeLa, Colon, A549 and H460 lung, HepG2 carcinomas	[q-u]
NSAIDs	OXPPOS inhibitor	AS-30D hepatocarcinoma	[v]
Combination Therapy			
Doxo + taxol	MMP reduction, low ATP levels	Human cancer-bearing mice	[w]
Gemcitabine + TRA-8	MMP reduction	S2VP10 and MIA PaCa-2 pancreatic tumor lines	[w]
Irinotecan +5-Fluorouracil	MMP reduction	HT-29 and SNU-C4 human colon carcinoma	[x]

MMP, mitochondrial membrane potential; ROS, reactive oxygen species; TRA-8, monoclonal antibody (TRA-8) to human death receptor 5; NSAIDs, Non-steroidal anti-inflammatory drugs.

^aSánchez-Alcázar, J.A.; Ault, J.G.; Khodjakov, A.; Schneider, E. *Cell Death Differ.*, **2000**, *7*, 1090-1100.

^bMarín-Hernández, A.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Ramírez, L.; Moreno-Sánchez, R. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *65*, 1979-1989.

^cTkáčová, E.; Drobnik, J.; Kuzela, S. *Neoplasma*, **1984**, *31*, 129-137.

^dMurata, T.; Hibasami, H.; Maekawa, S.; Tagawa, T.; Nakashima, K. *Biochem. Int.*, **1990**, *20*, 949-955.

^eJing, X.B.; Cai, X.B.; Hu, H.; Chen, S.Z.; Chen, B.M.; Cai, J.Y. *Biochem. Cell Biol.*, **2007**, *85*, 265-271.

^fPrasad, S.B.; Rosangkima, G.; Kharbangar, A. *Mitochondrion*, **2010**, *10*, 38-45.

^gBianchi, C.; Bagnato, A.; Paggi, M.G.; Floridi, A. *Exp. Mol. Pathol.*, **1987**, *46*, 123-135.

^hJiang, Y.J.; Sun, Q.; Fang, X.S.; Wang, X. *Mol. Med.*, **2009**, *15*, 173-182.

ⁱMarchetti, P.; Galla, D.A.; Russo, F.P.; Ricevuto, E.; Flati, V.; Porzio, G.; Ficorella, C.; Cifone, M.G. *Anticancer Res.*, **2004**, *24*, 219-226.

^jAltinoz, M.A.; Bilir, A.; Gedikoglu, G.; Ozcan, E.; Oktem, G.; Muslimanoglu, M. *Cell Biol. Int.*, **2007**, *31*, 473-481.

^kWender, P.A.; Jankowski, O.D.; Longcore, K.; Tabet, E.A.; Seto, H.; Tomikawa, T. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 589-592.

^lRenner, K.; Amberger, A.; Konwalinka, G.; Kofler, R.; Gnaiger, E. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2003**, *1642*, 115-123.

^mYeo, T.K.; Kintner, J.; Armand, R.; Perez, R.; Lewis, L.D. *Hum. Exp. Toxicol.*, **2007**, *26*, 911-921.

ⁿEvtodienko, Y.V.; Teplova, V.V.; Sidash, S.S.; Ichas, F.; Mazat, J.P. *FEBS Lett.*, **1996**, *393*, 86-88.

^oAndré, N.; Carré, M.; Brasseur, G.; Pourroy, B.; Kovacic, H.; Briand, C.; Braguer, D. *FEBS Lett.*, **2002**, *532*, 256-260.

^pPushkarev, V.M.; Starenki, D.V.; Saenko, V.A.; Yamashita, S.; Kovzun, O.I.; Popadiuk, I.D.; Pushkarev, V.V.; Tronko, M.D. *Exp. Oncol.*, **2009**, *31*, 16-21.

^qWouters, B.G.; Delahoussaye, Y.M.; Evans, J.W.; Birrell, G.W.; Doric, M.J.; Wang, J.; MacDermid, D.; Chiu, R.K.; Brown, J.M. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 145-152.

^rLeite, S.; Martins, N.M.; Dorta, D.J.; Curti, C.; Uyemura, S.A.; dos Santos, A.C. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2006**, *99*, 294-299.

^sSchipping, W.; Samonigg, H.; Schaberl-Moser, R.; Greil, R.; Thödtmann, R.; Tschmelitsch, J.; Jagoditsch, M.; Steger, G.G.; Jakesz, R.; Herbst, F.; Hofbauer, F.; Rabl, H.; Wohlmuth, P.; Gnant, M.; Thaler, J.; *Br. J. Cancer*, **2007**, *97*, 1021-1027.

^tAthanasou, A.; Clarke, A.B.; Turner, A.E.; Kumaran, N.M.; Vakilpour, S.; Smith, P.A.; Bagiokou, D.; Bradshaw, T.D.; Westwell, A.D.; Fang, L.; Lobo, D.N.; Constantinescu, C.S.; Calabrese, V.; Loesch, A.; Alexander, S.P.; Clothier, R.H.; Kendall, D.A.; Bates, T.E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, *364*, 131-137.

^uKang, G.H.; Kim, G.S.; Lee, H.R.; Yuh, Y.J.; Kim, S.R. *Cancer Res. Treat.*, **2008**, *40*, 106-110.

^vMoreno-Sánchez, R.; Bravo, C.; Vásquez, C.; Ayala, G.; Silveira, L.H.; Martínez-Lavín, M. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, *57*, 743-752.

^wDeRosier, L.C.; Huang, Z.Q.; Sellers, J.C.; Buchsbaum, D.J.; Vickers, S.M. *J. Gastrointest. Surg.*, **2006**, *10*, 1291-1300.

^xGrivicich, I.; Regner, A.; da Rocha, A.B.; Grass, L.B.; Alves, P.A.; Kayser, G.B.; Schwartzmann, G.; Henriques, J.A. *Oncol. Res.*, **2005**, *15*, 385-392.

cell-like characteristics facilitate the development of a more invasive cancer phenotype in some aggressive carcinomas [108-110].

4. ANTI-MITOCHONDRIAL DRUGS AS THERAPEUTIC TARGET

The previous sections have provided experimental evidence indicating that at least some aggressive tumors maintain an efficient OXPHOS under normoxia, which in turn may sustain tumor proliferation (Table 2). Intriguingly, this statement is not new in the cancer field because it has been experimentally and reiteratively demonstrated by many years. For example, it is well known that the absence of glucose in culture media or the addition of potent glycolytic or gluconeogenic inhibitors (2-DOG or 3-mercaptopycolinate) does not arrest the growth of some carcinomas until anti-mitochondrial drugs are applied, alone or in combination with glycolytic inhibitors [111-113]. This observation suggests that mitochondria are contributing to tumor proliferation and consequently supports its clinical importance as a target for antineoplastic therapy. In this regard, any antineoplastic drug that affects mitochondria stability promoting apoptosis through the intrinsic pathway, and/or interfere with the mitochondrial energy metabolism by acting as OXPHOS inhibitors and mitochondrial uncouplers, or by destabilizing mtDNA, are considered as "anti-mitochondrial drug". Table 3 shows the effect of several antineoplastic drugs used in phase II clinical trials on OXPHOS enzyme activities and fluxes. Some DNA-intercalating agents alone or combined with other chemo-adjuvants modify mitochondrial metabolism at different levels at doses employed to disturb DNA (Table 3). Other drugs such as ditercalinium and etoposides affect both pyrimidine and purine nucleotides syntheses through severe inhibition of cellular respiration and diminution in ATP content [114], or induce massive tumor mitophagy [115]. Interestingly, drug resistant- tumor initiating cells, a small sub-population responsible for the invasive and malignant cancer phenotype, are highly susceptible to mitochondria-targeting drugs (e.g., sesquiterpene lactone) [116].

Other antineoplastic drugs such as α -TOS and analogues or the nonsteroidal anti-inflammatory drugs also behave as respiratory inhibitors or potent OXPHOS uncoupler agents and hence they are able to abolish the accelerated proliferation of several malignant and highly aggressive carcinomas [117-121]. The delocalized lipophilic cations (DLC) have been employed in phase I clinical trials due to their high selectivity towards tumor cells and mitochondria. DLCs include rhodamine derivatives (123, 3B, 6G), F16, dequalinium chloride, AA1 (2,6-bis(4-aminophenyl)-4-[4-(dimethylamino)phenyl] thiopyrylium chloride), MKT-077 (1-ethyl-2-([3-ethylbenzothiazolin-2-ylidene]-4-oxothiazolidin-2-ylidene)methyl) pyridium). Rhodamines are used as specific optical probes to monitor changes in mitochondrial membrane potential [reviewed in 47].

Accumulation of DLCs inside normal cells and mitochondria decreases OXPHOS capacity at different levels including mtDNA fragmentation, diminution in the ADP-stimulated respiration, inhibition of the ATP synthase, COX and SDH activities, and acting as uncoupler [reviewed in 47]. In isolated liver mitochondria, low doses of AA1 inhibit the mitochondrial ATP hydrolysis [reviewed in 47]. MKT-077 has been used in phase I clinical trials with apparently encouraging results against solid malignancies [122]. However, high MKT-077 toxicity on some normal tissues due to the absence of MDR protein was also documented; MDR is able to expel xenobiotics such as MKT-077 [reviewed in 123]. Combination therapy by using DLCs with glycolytic inhibitors, or paclitaxel with traditional plant medicinals, decreases the high tumor proliferation of malignant neoplasias [112, 124] through inhibition of the Krebs cycle tumor enzymes SDH, ICDH, 2-OGDH

and malate dehydrogenase in *in vivo* lung cancer models [125] (Table 3).

In addition to their inhibitory effect on OXPHOS, some anticancer drugs (a) interact with mtDNA which in turn may affect mitochondrial metabolism [126] or/and (b) affect mtDNA biogenesis through DNA polymerase gamma inhibition [127]. The DNA intercalating-agent doxorubicin may also directly interact with mtDNA inducing a severe decrease in the mtDNA content, NADH dehydrogenase (or Complex I) and cytochrome c oxidase (COX)-I expression and COX activity in rat kidney, whereas other mitochondrial enzymes (citrate synthase and SDH) increase significantly after drug treatment [126]. Similar to Doxo, ditercalinium and camptothecin induce massive degradation of mtDNA in HeLa, SiHa and leukemia cells [127-129] (Table 3) as well as in DS7 mitochondrial-dependent fibroblasts, in which the decrease in mtDNA correlates with a severe depression in COX activity [128].

Another mechanism associated with the diminution in the mitochondrial content and consequently mtDNA is mitophagy activation. For example, imatinib increases the formation of autophagic vesicles, induces mitochondrial membrane disruption and finally apoptosis [130]. Therefore, it seems that several currently used antineoplastic drugs have secondary cellular targets many of which are located in mitochondria. The simultaneous targeting of several proteins by the anticancer drugs appears essential for mediating their effects on cancer cell development and growth. This hypothesis requires further experimental evaluation.

CONCLUDING REMARKS

Tumor cell metabolism is designed to sustain proliferation and survival of daughter cells. Thus, cancer cells are committed to provide sufficient glycolytic and Krebs cycle anaplerotic intermediaries and ATP to ensure and sustain the accelerated tumor growth. Apparently, the high energy demand cannot be solely covered by an increased glycolysis in several tumors. Therefore, at least for oxidative tumors, the application of mitochondria-directed drugs may be a promising alternative therapeutic strategy. Understanding of the cancer energy metabolism may help to improve the design of more potent and specific drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by CONACyT-México grants No. 107183 to SR-E and No. 80534 and 123636 to RM-S, and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal grant No. No. PICS08-5.

ABBREVIATIONS

COX	=	cytochrome c oxidase
DLC	=	delocalized lipophilic cations
GDH	=	glutamate dehydrogenase
HMGCS2	=	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase2
HIF-1 α	=	Hypoxia Inducible Factor-1 α
ICDH	=	isocitrate dehydrogenase
MCAM	=	methylmalonyl-CoA mutase
mtDNA	=	mitochondrial DNA
OXPHOS	=	oxidative phosphorylation
PCAS	=	propionyl-CoA synthetase
PCAC	=	propionyl-CoA carboxylase
PDK-1	=	pyruvate dehydrogenase kinase-1

PDH	=	pyruvate dehydrogenase complex
POX	=	proline dehydrogenase
SCAAT	=	succinyl-CoA acetoacetyl transferase
SDH	=	succinate dehydrogenase
α -TOS	=	α -tocopheryl-succinate
2-OG	=	2-oxoglutarate
2-OGDH	=	2-oxoglutarate dehydrogenase

REFERENCES

- [1] Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.*, **1927**, *8*, 519-530.
- [2] Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science*, **1956**, *123*, 309-314.
- [3] Zu, X.L.; Guppy, M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *313*, 459-465.
- [4] Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.*, **2007**, *274*, 1393-1418.
- [5] Pedersen, P.L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor Res.*, **1978**, *22*, 190-274.
- [6] Hackenbrock, C.R.; Rehn, T.G.; Weinbach, E.C.; Lemasters, J.J. Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochondria in the intact ascites tumor cell. *J. Cell Biol.*, **1971**, *51*, 123-137.
- [7] Samper, E.; Morgado, L.; Estrada, J.C.; Bernad, A.; Hubbard, A.; Cadenas, S.; Melov, S. Increase in mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and glycolysis in murine lymphomas. *Free Radic. Biol. Med.*, **2009**, *46*, 387-396.
- [8] Ralph, S.J.; Rodríguez-Enríquez, S.; Neuzil, J.; Moreno-Sánchez, R. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Mol. Aspects Med.*, **2010**, *31*, 29-59.
- [9] Lazo, P.A.; Sols, A. Pyruvate dehydrogenase complex of ascites tumour. Activation by AMP and other properties of potential significance in metabolic regulation. *Biochem. J.*, **1980**, *190*, 705-710.
- [10] Baggetto, L.G.; Lehninger, A.L. Isolated tumoral pyruvate dehydrogenase can synthesize acetoin which inhibits pyruvate oxidation as well as other aldehydes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1987**, *145*, 153-159.
- [11] Baggetto, L.G.; Testa-Parussini, R. Role of acetoin on the regulation of intermediate metabolism of Ehrlich ascites tumor mitochondria: its contribution to membrane cholesterol enrichment modifying passive proton permeability. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1990**, *283*, 241-248.
- [12] Lazo, P.A.; Sols, A. Identification of an AMP-activatable pyruvate dehydrogenase isozyme in embryos and tumors. *FEBS Lett.*, **1980**, *120*, 287-288.
- [13] Abou-Khalil, S.; Abou-Khalil, W.H. Pyruvate-dependent oxidative phosphorylation in erythroid and myeloid tumor mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1985**, *236*, 792-796.
- [14] Rodríguez-Enríquez, S.; Moreno-Sánchez, R. Intermediary metabolism of fast-growth tumor cells. *Arch. Med. Res.*, **1998**, *29*, 1-12.
- [15] Wasa, M.; Wang, H.S.; Okada, A. Characterization of L-glutamine transport by a human neuroblastoma cell line. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2002**, *282*, C1246-C1253.
- [16] Sidoryk, M.; Matyja, E.; Dybel, A.; Zielinska, M.; Bogucki, J.; Jaskólski, D.J.; Liberski, P.P.; Kowalczyk, P.; Albrecht, J. Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport*, **2004**, *15*, 575-578.
- [17] Fuchs, B.C.; Bode, B.P. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin. Cancer Biol.*, **2005**, *15*, 254-266.
- [18] Gao, P.; Tchernyshyov, I.; Chang, T.C.; Lee, Y.S.; Kita, K.; Ochi, T.; Zeller, K.I.; De Marzo, A.M.; Van Eyk, J.E.; Mendell, J.T.; Dang, C.V. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, **2009**, *458*, 762-765.
- [19] Prajda, N.; Morris, H.P.; Weber, G. Glutamine-phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase (amidophosphoribosyltransferase, EC 2.4.2.14) activity in normal, differentiating, and neoplastic kidney. *Cancer Res.*, **1979**, *39*, 3909-3914.
- [20] Molina, M.; Segura, J.A.; Aledo, J.C.; Medina, M.A.; Núñez de Castro, I.; Márquez, J. Glutamine transport by vesicles isolated from tumour-cell mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.*, **1995**, *308*, 629-633.
- [21] Wise, D.R.; DeBerardinis, R.J.; Mancuso, A.; Sayed, N.; Zhang, X.Y.; Pfeiffer, H.K.; Nissim, I.; Daikhin, E.; Yudkoff, M.; McMahon, S.B.; Thompson, C.B. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*, 18782-18787.
- [22] Pitot, H.C.; Potter, V.R. An enzymic study on the cellular origin of the Dunning and the Novikoff hepatomas in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **1960**, *40*, 537-539.
- [23] Rivera, S.; Azcón-Bieto, J.; López-Soriano, F.J.; Miralpeix, M.; Argilés, J.M. Amino acid metabolism in tumour-bearing mice. *Biochem. J.*, **1988**, *249*, 443-449.
- [24] Marín-Hernández, A.; Gallardo-Pérez, J.C.; Ralph, S.J.; Rodríguez-Enríquez, S.; Moreno-Sánchez, R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2009**, *9*, 1084-1101.
- [25] DeBerardinis, R.J.; Lum, J.J.; Hatzivassiliou, G.; Thompson, C.B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.*, **2008**, *7*, 11-20.
- [26] Derdak, Z.; Mark, N.M.; Beldi, G.; Robson, S.C.; Wands, J.R.; Baffy, G. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 2813-2819.
- [27] Samudio, I.; Fiegl, M.; Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res.*, **2009**, *69*, 2163-2166.
- [28] Phang, J.M.; Donald, S.P.; Pandhare, J.; Liu, Y. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids*, **2008**, *35*, 681-690.
- [29] Phang, J.M.; Liu, W.; Zabirnyk, O. Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annu Rev Nutr.*, **2010**, *30*, 441-463.
- [30] Liu, Y.; Borchert, G.L.; Donald, S.P.; Diwan, B.A.; Anver, M.; Phan, J.M. Proline oxidase functions as a mitochondrial tumor suppressor in human cancers. *Cancer Res.*, **2009**, *69*, 64141-6422.
- [31] Hu, C.A.; Donald, S.P.; Yu, J.; Lin, W.W.; Liu, Z.; Steel, G.; Obie, C.; Valle, D.; Phang, J.M. Overexpression of proline oxidase induces proline-dependent and mitochondria-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.*, **2007**, *295*, 85-92.
- [32] Liu, Y.; Borchert, G.L.; Donald, S.P.; Surazynski, A.; Hu, C.A.; Weydert, C.J.; Oberley, L.W.; Phang, J.M. MnSOD inhibits proline oxidase-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, **2005**, *26*, 1335-1342.
- [33] Poole, R.C.; Halestrap, A.P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol.*, **1993**, *264*, C761-C782.
- [34] Zhang, W.W.; Lindahl, R.; Churchill, P. Regulation of succinyl coenzyme A:acetoacetyl coenzyme A transferase in rat hepatoma cell lines. *Cancer Res.*, **1990**, *50*, 5858-5862.
- [35] Briscoe, D.A.; Fiskum, G.; Holleran, A.L.; Kelleher, J.K. Acetoacetate metabolism in AS-30D hepatoma cells. *Mol. Cell Biochem.*, **1994**, *136*, 131-137.
- [36] Fredericks, M.; Ramsey, R.B. 3-Oxo acid coenzyme A transferase activity in brain and tumors of the nervous system. *J. Neurochem.*, **1978**, *31*, 1529-1531.
- [37] Cararero, N.; Mascaró, C.; Mayordomo, C.; Vilardell, F.; Haro, D.; Marrero, P.F. Ketogenic HMGCS2 Is a c-Myc target gene expressed in differentiated cells of human colonic epithelium and down-regulated in colon cancer. *Mol. Cancer Res.*, **2006**, *4*, 645-653.
- [38] Menendez, J.A.; Colomer, R.; Lupu, R. Inhibition of fatty acid synthase-dependent neoplastic lipogenesis as the mechanism of gamma-linolenic acid-induced toxicity to tumor cells: an extension to Nwankwo's hypothesis. *Med. Hypotheses*, **2005**, *64*, 337-341.
- [39] Wong, D.A.; Bassilian, S.; Lim, S.; Paul Lee, W.N. Coordination of peroxisomal beta-oxidation and fatty acid elongation in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 41302-41309.
- [40] Hennesy, B.T.; Smith, D.L.; Ram, P.T.; Lu, Y.; Mills, G.B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2005**, *4*, 988-1004.
- [41] DeBerardinis, R.J.; Lum, J.J.; Thompson, C.B. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 37372-37380.
- [42] Ralph, S.J.; Rodríguez-Enríquez, S.; Neuzil, J.; Moreno-Sánchez, R. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as target for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Mol. Asp. Med.*, **2010**, *31*, 29-59.
- [43] Grabacka, M.; Pierzchalska, M.; Reiss, K. Peroxisome Proliferator Activated Receptor α Ligands As Anti-Cancer Drugs Targeting Mitochondrial Metabolism. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2010**.
- [44] Atherton H.J.; Bailey, N.J.; Zhang, W.; Taylor, J.; Major, H.; Shockcor, J.; Clarke, K.; Griffin, J.L. A combined 1H-NMR spectroscopy- and mass spectrometry-based metabolomic study of the PPAR-alpha null mutant mouse defines profound systemic changes in metabolism linked to the metabolic syndrome. *Physiol Genomics*, **2006**, *27*, 178-186.
- [45] Wehrle, J.P.; Ng, C.E.; McGovern, K.A.; Aiken, N.R.; Shungu, D.C.; Chance, E.M.; Glickson, J.D. Metabolism of alternative substrates and the bioenergetic status of EMT6 tumor cell spheroids. *NMR Biomed.*, **2000**, *13*, 349-360.
- [46] Malaisse, W.J.; Zhang, T.M.; Verbruggen, I.; Willem, R. Enzyme-to-enzyme channelling of Krebs cycle metabolic intermediates in Caco-2 cells exposed to [2-13c]propionate. *Biochem. J.*, **1996**, *317*, 861-863.
- [47] Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Gallardo-Pérez, J.C.; Carreño-Fuentes, L.; Moreno-Sánchez, R. Targeting of cancer energy metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, *53*, 29-48.
- [48] Telang, S.; Lane, A.N.; Nelson, K.K.; Arumugam, S.; Chesney, J. The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism. *Mol. Cancer*, **2007**, *6*, 77.
- [49] Kallinowski, F.; Schlenger, K.I.; Runkel, S.; Kloes, M.; Stohrer, M.; Okunieff, P.; Vaupel, P. Blood flow, metabolism, cellular microenvironment,

- and growth rate of human tumor xenografts. *Cancer Res.*, **1989**, *49*, 3759-3764.
- [50] Erickson, K.; Braun, R.D.; Yu, D.; Lanzen, J.; Wilson, D.; Brizel, D.M.; Secomb, J.E.; Dewhirst, M.W. Effect of longitudinal oxygen gradients on effectiveness of manipulation of tumor oxygenation. *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 4705-4712.
- [51] Froese, G. The respiration of ascites tumour cells at low oxygen concentrations. *Biochim. Biophys. Acta*, **1962**, *57*, 509-519.
- [52] Rumsey, W.L.; Schlosser, C.; Nuutinen, E.M.; Robiolo, M.; Wilson, D.F. Cellular energetics and the oxygen dependence of respiration in cardiac myocytes isolated from adult rat. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 15392-15402.
- [53] Gnaiger, E.; Lassnig, B.; Kuznetsov, A.; Rieger, G.; Margreiter, R. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J. Exp. Biol.*, **1998**, *201*, 1129-1139.
- [54] Pecina, P.; Gnaiger, E.; Zeman, J.; Pronicka, E.; Houstek, J. Decreased affinity for oxygen of cytochrome-c oxidase in Leigh syndrome caused by SURF1 mutations. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2004**, *287*, C1384-C1388.
- [55] Mason, M.G.; Nicholls, P.; Wilson, M.T.; Cooper, C.E. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2006**, *103*, 708-713.
- [56] Rodríguez-Enriquez, S.; Carreño-Fuentes, L.; Gallardo-Pérez, J.C.; Saavedra, E.; Quezada, H.; Vega, A.; Marín-Hernández, A.; Olin-Sandoval, V.; Tórres-Márquez, M.E.; Moreno-Sánchez, R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in zebrafish and possibly in cervix carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2010**, *10*, 626-639.
- [57] Ebert, B.L.; Gleadle, J.M.; O'Rourke, J.F.; Bartlett, S.M.; Poulton, J.; Ratcliffe, P.J. Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem. J.*, **1996**, *313*, 809-814.
- [58] Kobayashi, S.; Millhorn, D.E. Hypoxia regulates glutamate metabolism and membrane transport in rat PC12 cells. *J. Neurochem.*, **2001**, *76*, 1935-1948.
- [59] Papandreou, I.; Cairns, R.A.; Fontana, L.; Lim, A.L.; Denko, N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.*, **2006**, *3*, 187-197.
- [60] Wigfield, S.M.; Winter, S.C.; Giatromanolaki, A.; Taylor, J.; Koukourakis, M.L.; Harris, A.L. PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. *Br J Cancer*, **2008**, *98*, 1975-1984.
- [61] Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enriquez, S.; Saavedra, E.; Marín-Hernández, A.; Gallardo-Pérez, J.C. The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors*, **2009**, *35*, 209-225.
- [62] Kim, J.W.; Tchernyshyov, I.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.*, **2006**, *3*, 177-185.
- [63] Zhang, H.; Gao, P.; Fukuda, R.; Kumar, G.; Krishnamachary, B.; Zeller, K.I.; Dang, C.V.; Semenza, G.L. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*, **2007**, *11*, 407-420.
- [64] Casey, T.M.; Pakay, J.L.; Guppy, M.; Arthur, P.G. Hypoxia causes downregulation of protein and RNA synthesis in noncontracting mammalian cardiomyocytes. *Circ Res.*, **2002**, *90*, 777-783.
- [65] Macheda, M.L.; Rogers, S.; Best, J.D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell. Physiol.*, **2005**, *202*, 654-662.
- [66] Maher, J.C.; Wangpaichitr, M.; Savaraj, N.; Lampidis, T.J. Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitors 2-deoxy-D-glucose. *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, *6*, 732-741.
- [67] Nielsen, F.U.; Daugaard, P.; Bentzen, L.; Stødkilde-Jørgensen, H.; Overgaard, J.; Horsman, M.R.; Maxwell, R.J. Effect of changing tumor oxygenation on glycolytic metabolism in a murine C3H mammary carcinoma assessed by *in vivo* nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 5318-5325.
- [68] Natsuizaka, M.; Ozasa, M.; Darmanin, S.; Miyamoto, M.; Kondo, S.; Kamada, S.; Shindoh, M.; Higashino, F.; Suhara, W.; Koide, H.; Aita, K.; Nakagawa, K.; Kondo, T.; Asaka, M.; Okada, F.; Kobayashi, M. Synergistic up-regulation of hexokinase-2, glucose transporters and angiogenic factors in pancreatic cancer cells by glucose deprivation and hypoxia. *Exp. Cell Res.*, **2007**, *313*, 3337-3348.
- [69] Smolková, K.; Bellance, N.; Scandurra, F.; Génot, E.; Gnaiger, E.; Plecítá-Hlavatá, L.; Jezek, P.; Rossignol, R. Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to glycemia and hypoxia. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **2010**, *42*, 55-67.
- [70] Rodríguez-Enriquez, S.; Juárez, O.; Rodríguez-Zavala, J.S.; Moreno-Sánchez, R. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, *268*, 2512-2519.
- [71] Koivunen P, Hirsila M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *287*, 4524-4532.
- [72] Wallace DC, Fan W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*, **2010**, *10*, 12-31.
- [73] Liu X, Wang X, Zhang J, Lam EK, Shin VY, Cheng AS, Yu J, Chan FK, Sung JJ, Jin HC. Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis. *Oncogene*, **2010**, *29*, 442-450.
- [74] Nonveau, P.; Végran, F.; Schroeder, T.; Wergin, M.C.; Verrax, J.; Rabbani, Z.N.; De Saedeleer, C.J.; Kennedy, K.M.; Diepart, C.; Jordan, B.F.; Kelley, M.J.; Gallez, B.; Wahl, M.L.; Feron, O.; Dewhirst, M.W. Targeting lactate-activated respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.*, **2008**, *118*, 3930-3942.
- [75] Brown, J.M. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy—eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 5863-5870.
- [76] Brurberg, K.G.; Skogmo, H.K.; Graff, B.A.; Olsen, D.R.; Rofstad, E.K. Fluctuations in pO₂ in poorly and well-oxygenated spontaneous canine tumors before and during fractionated radiation therapy. *Radiother. Oncol.*, **2005**, *77*, 220-226.
- [77] Cárdenas-Navia, L.I.; Mace, D.; Richardson, R.A.; Wilson, D.F.; Shan, S.; Dewhirst, M.W. The pervasive presence of fluctuating oxygenation in tumors. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 5812-5819.
- [78] Pigott, K.H.; Hill, S.A.; Chaplin, D.J.; Saunders, M.I. Microregional fluctuations in perfusion within human tumours detected using laser Doppler flowmetry. *Radiother. Oncol.*, **1996**, *40*, 45-50.
- [79] Cairns, R.A.; Kalliomaki, T.; Hill, R.P. Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of K1T1 murine tumors. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 8903-8908.
- [80] Martinière, P.; Defresne, F.; Bouzin, C.; Saliez, J.; Lair, F.; Grégoire, V.; Michiels, C.; Dessy, C.; Feron, O. Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 11736-11744.
- [81] Chaudary, N.; Hill, R.P. Increased expression of metastasis-related genes in hypoxic cells sorted from cervical and lymph nodal xenograft tumors. *Lab. Invest.*, **2009**, *89*, 587-596.
- [82] Jiang, B.H.; Semenza, G.L.; Bauer, C.; Marti, H.H. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.*, **1996**, *271*, C1172-C1180.
- [83] Semenza, G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*, **2009**, *24*, 97-106.
- [84] Prabhakar, N.R. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J. Appl. Physiol.*, **2001**, *90*, 1986-1994.
- [85] Polotsky, V.Y.; Savransky, V.; Bevan-Fonti, S.; Reinke, C.; Li, J.; Grigoryev, D.N.; Shimoda, L.A. Intermittent and sustained hypoxia induce a similar gene expression profile in the human aortic endothelial cells. *Physiol. Genomics*, **2010**, on line.
- [86] Murphy, B.J.; Laderoute, K.R.; Vreman, H.J.; Grant, T.D.; Gill, N.S.; Stevenson, D.K.; Sutherland, R.M. Enhancement of heme oxygenase expression and activity in A431 squamous carcinoma multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.*, **1993**, *53*, 2700-2703.
- [87] Wu, F.J.; Friend, J.R.; Rimmel, R.P.; Cerra, F.B.; Hu, W.S. Enhanced cytochrome P450 1A1 activity of self-assembled rat hepatocyte spheroids. *Cell Transplant.*, **1999**, *8*, 233-246.
- [88] Herst, P.M.; Berridge, M.V. Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer lines. *Biochim Biophys Acta*, **2007**, *1767*, 170-177.
- [89] Tang, X.; Chueh, P.J.; Jiang, Z.; Layman, S.; Martin, B.; Kim, C.; Morré, D.M.; Morré D.J. Essential role of copper in the activity and regular periodicity of a recombinant, tumor-associated, cell surface, growth related and time-keeping hydroquinone (NADH) oxidase with protein disulfide-thiol interchange activity (ENOX2). *J. Bioenerg Biomembr.*, **2010**, *42*, 355-360.
- [90] Lowry, O.H.; Berger, S.J.; Carter, J.G.; Chi, M.M.; Manchester, J.K.; Knor, J.; Pusateri, M.E. Diversity of metabolic patterns in human brain tumors: enzymes of energy metabolism and related metabolites and cofactors. *J. Neurochem.*, **1983**, *41*, 994-1010.
- [91] Liu, H.; Hu, Y.P.; Savaraj, N.; Priebe, W.; Lampidis, T.J. Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 5542-5547.
- [92] Elwood J.C.; Lin Y.C.; Cristofalo, V.J.; Weinhouse, S.; Morris, H.P. Glucose utilization in homogenates of the Morris hepatoma 5123 and related tumors. *Cancer Res.*, **1963**, *23*, 906-913.
- [93] Balaban, R.S.; Bader, J.P. Studies on the relationship between glycolysis and (Na⁺ + K⁺)-ATPase in cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1984**, *804*, 419-426.
- [94] Rodríguez-Enriquez, S.; Vital-González, P.A.; Flores-Rodríguez, F.L.; Marín-Hernández, A.; Ruiz-Azuara, L.; Moreno-Sánchez, R. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2006**, *215*, 208-217.
- [95] Kallinowski, F.; Schlenger, K.H.; Kloes, M.; Stohrer, M.; Vaupel, P. Tumor blood flow: the principal modulator of oxidative and glycolytic metabolism, and of the metabolic microclimate of human tumor xenografts *in vivo*. *Int. J. Cancer.*, **1989**, *44*, 266-272.
- [96] Neuzil, J.; Massa, H. Hepatic processing determines dual activity of phenacetophenyl succinate: a novel paradigm for a shift in biological activity due to pro-vitamin-to-vitamin conversion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *327*, 1024-1027.
- [97] Ralph, S.J.; Low, P.; Dong, L.; Lawen, A.; Neuzil, J. Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **2006**, *1*, 327-346.

- [98] Chen, C.T.; Shih, Y.R.; Kuo, T.K.; Lee, O.K.; Wei, Y.H. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **2008**, *26*, 960-968.
- [99] Funes, J.M.; Quintero, M.; Henderson, S.; Martinez, D.; Qureshi, U.; Westwood, C.; Clements, M.O.; Bourbouli, D.; Pedley, R.B.; Moncada, S.; Boshoff, C. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, *104*, 6223-6228.
- [100] Peterkofsky, B.; Prather, W. Correlation between the rates of aerobic glycolysis and glucose transport, unrelated to neoplastic transformation, in a series of BALB 3T3-derived cell lines. *Cancer Res.*, **1982**, *42*, 1809-1816.
- [101] Gatenby, R.A.; Gillies, R.J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer.*, **2004**, *4*, 891-899.
- [102] Hyun, D.H.; Hunt, N.D.; Emerson, S.S.; Hernández, J.O.; Mattson, M.P.; de Cabo, R. Up-regulation of plasma membrane-associated redox activities in neuronal cells lack functional mitochondria. *J. Neurochem.*, **2007**, *100*, 1364-1374.
- [103] Hu, Y.; Moraes, C.T.; Savaraj, N.; Priebe, W.; Lampidis, T.J. Rho(0) tumor cells: a model for studying whether mitochondria are targets for rhodamine 123, doxorubicin, and other drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, *60*, 1897-1905.
- [104] Singh, K.K.; Russell, J.; Sigala, B.; Zhang, Y.; Williams, J.; Keshav, K.F. Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. *Oncogene*, **1999**, *18*, 6641-6646.
- [105] Cuperus, R.; Leen, R.; Tytgat, G.A.; Caron, H.N.; van Kuilenburg, A.B. Fenretinide induces mitochondrial ROS and inhibits the mitochondrial respiratory chain in neuroblastoma. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2010**, *67*, 807-816.
- [106] Larn, J.A.; Vailant, F.; Linnane, A.W.; Lawen, A. Up-regulation of the plasma membrane oxidoreductase as prerequisite for the viability of human Namalwa rho 0 cells. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 30097-30100.
- [107] Berridge, M.V.; Tan, A.S. Cell-surface NAD(P)H-oxidase: relationship to trans-plasma membrane NADH-oxidoreductase and a potential source of circulating NADH-oxidase. *Antioxid. Redox Signal.*, **2000**, *2*, 277-288.
- [108] Ferraresi, R.; Troyano, L.; Pinti, M.; Roat, E.; Lugli, E.; Quaglino, D.; Taverna, D.; Bellizzi, D.; Passarino, G.; Cossarizza, A. Resistance of mtDNA-depleted cells to apoptosis. *Cytometry A*, **2008**, *73*, 528-537.
- [109] Moro, L.; Arbini, A.A.; Yao, J.L.; di Sant'Agnesse, P.A.; Marra, E.; Greco, M. Mitochondrial DNA depletion in prostate epithelial cells promotes anoikis resistance and invasion through activation of PI3K/Akt2. *Cell Death Differ.*, **2009**, *16*, 571-583.
- [110] Mineri, R.; Pavelka, N.; Fernandez-Vizarrá, E.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Zeviani, M.; Tiranti, V. How do human cells react to the absence of mitochondrial DNA? *PLoS One*, **2009**, *4*, e5713.
- [111] Lampidis, T.J.; Bernal, S.D.; Summerhayes, I.C.; Chen, L.B. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res.*, **1983**, *43*, 716-720.
- [112] Fearon, K.C.; Plumb, J.A.; Burns, H.J.; Calman, K.C. Reduction of the growth rate of the Walker 256 tumor in rats by rhodamine 6G together with hypoglycemia. *Cancer Res.*, **1987**, *47*, 3684-3687.
- [113] Kaplan, O.; Navon, G.; Lyon, R.C.; Faustino, P.J.; Straka, E.J.; Cohen, J.S. Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. *Cancer Res.*, **1990**, *50*, 544-551.
- [114] Esnault, C.; Brown, S.C.; Segal-Bendirdjian, E.; Coulaud, D.; Mishal, Z.; Roques, B.P.; Le Pecq, J.B. Selective alteration of mitochondrial function by Ditercalinium (NSC 335153), a DNA bisintercalating agent. *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, *39*, 109-122.
- [115] Reipert, S.; Berry, J.; Hughes, M.F.; Hickman, J.A.; Allen, T.D. Changes of mitochondrial mass in the hemopoietic stem cell line FDCP-mix after treatment with etoposide: a correlative study by multiparameter flow cytometry and confocal and electron microscopy. *Exp. Cell Res.*, **1995**, *221*, 281-288.
- [116] Neuzil, J.; Stantic, M.; Zobalova, R.; Chladova, J.; Wang, X.; Prochazka, L.; Dong, L.; Andera, L.; Ralph, S.J. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, *355*, 855-859.
- [117] Neuzil, J.; Dyason, J.C.; Freeman, R.; Dong, L.F.; Prochazka, L.; Wang, X.F.; Scheffler, I.; Ralph, S.J. Mitocans as anti-cancer agents targeting mitochondria: lessons from studies with vitamin E analogues, inhibitors of complex II. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **2007**, *39*, 65-72.
- [118] Dong, L.F.; Freeman, R.; Liu, J.; Zobalova, R.; Marin-Hernandez, A.; Stantic, M.; Rohlena, J.; Valis, K.; Rodriguez-Enriquez, S.; Butcher, B.; Goodwin, J.; Brunk, U.T.; Witting, P.K.; Moreno-Sanchez, R.; Scheffler, I.E.; Ralph, S.J.; Neuzil, J. Suppression of tumor growth *in vivo* by the mitocan alpha-tocopheryl succinate requires respiratory complex II. *Clin. Cancer Res.*, **2009**, *15*, 1593-1600.
- [119] Johnsen, J.I.; Lindskog, M.; Ponthan, F.; Pettersen, I.; Elfman, L.; Orrego, A.; Sveinbjörnsson, B.; Kogner, P. Cyclooxygenase-2 is expressed in neuroblastoma, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis and inhibit tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 7210-7215.
- [120] Huang, R.H.; Chai, J.; Tarnawski, A.S. Identification of specific genes and pathways involved in NSAIDs-induced apoptosis of human colon cancer cells. *World J. Gastroenterol.*, **2006**, *28*, 6446-6452.
- [121] Dong, L.F.; Jameson, V.J.; Tilly, D.; Cerny, J.; Mahdavian, E.; Marin-Hernández, A.; Hernández-Esquivel, L.; Rodríguez-Enriquez, S.; Stursa, J.; Witting, P.K.; Stantic, B.; Rohlena, J.; Truksa, J.; Kluckova, K.; Dyason, J.C.; Ledvina, M.; Salvatore, B.A.; Moreno-Sánchez, R.; Coster, M.J.; Ralph, S.J.; Smith, R.A.; Neuzil, J. Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anticancer activity *via* mitochondrial complex II. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, 3717-3728.
- [122] Britten, C.D.; Rowinsky, E.K.; Baker, S.D.; Weiss, G.R.; Smith, L.; Stephenson, J.; Rothenberg, M.; Smetzer, L.; Cramer, J.; Collins, W.; Von Hoff, D.D.; Eckhardt, S.G. A phase I and pharmacokinetic study of the mitochondrial-specific rhodacyanine dye analog MKT 077. *Clin. Cancer Res.*, **2000**, *6*, 42-49.
- [123] Kurtoglu, M.; Lampidis, T.J. From delocalized lipophilic cations to hypoxia: blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, *53*, 68-75.
- [124] Bernal, S.D.; Lampidis, T.J.; McIsaac, R.M.; Chen, L.B. Anticarcinoma activity *in vivo* of rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye. *Science*, **1983**, *222*, 169-172.
- [125] Senthilnathan, P.; Padmavathi, R.; Magesh, V.; Sakthickaran, D. Modulation of TCA cycle enzymes and electron transport chain systems in experimental lung cancer. *Life Sci.*, **2006**, *78*, 1010-1014.
- [126] Lebrecht, D.; Setzer, B.; Rohrbach, R.; Walker, U.A. Mitochondrial DNA and its respiratory chain products are defective in doxorubicin nephrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2004**, *19*, 329-336.
- [127] Okamoto, M.; Ohsato, T.; Nakada, K.; Isobe, K. Ditercalinium chloride, a pro-anticancer drug, intimately associates with mammalian mitochondrial DNA and inhibits its replication. *Curr. Genet.*, **2003**, *43*, 364-370.
- [128] Segal-Bendirdjian, E.; Coulaud, D.; Roques, B.P.; Le Pecq, J.B. Selective loss of mitochondrial DNA after treatment of cells with ditercalinium (NSC 335153), an antitumor bis-intercalating agent. *Cancer Res.*, **1988**, *48*, 4982-4992.
- [129] Ha, S.W.; Kim, Y.J.; Kim, W.; Lee, C.S. Antitumor Effects of Camptothecin Combined with Conventional Anticancer Drugs on the Cervical and Uterine Squamous Cell Carcinoma Cell Line SiHa. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **2009**, *13*, 115-121.
- [130] Shingu, T.; Fujiwara, K.; Bögl, O.; Akiyama, Y.; Moritake, K.; Shinjima, N.; Tamada, Y.; Yokoyama, T.; Kondo, S. Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *Int. J. Cancer*, **2009**, *124*, 1060-1071.