



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN LÍNEAS  
CELULARES DE CARCINOMA PULMONAR BAJO  
CONDICIONES DE ESTRÉS METABÓLICO ASOCIADO AL  
MICROAMBIENTE TUMORAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**ALMA DELIA VALENCIA CAMARGO**



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: HOMERO HERNÁNDEZ Y MONTES**

**VOCAL:**                   **Profesor: MARINA GAVILANES RUIZ**

**SECRETARIO:**           **Profesor: AIDA SUSANA ROMERO GARCÍA**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ**

**2do. SUPLENTE:**       **Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN,  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO  
VILLEGAS”

**ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Aida Susana Romero García

---

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dr. Heriberto Prado García

---

**SUSTENTANTE:**

Alma Delia Valencia Camargo

---

*“Se gana fuerza, valentía y seguridad en cada experiencia donde se mira el miedo a la cara. Debes hacer lo que crees que no puedes hacer.”*

*- Eleanor Roosevelt -*

*“No tengo talentos especiales, pero sí soy profundamente curioso.”*

*- Albert Einstein -*

*"Can tumour cells be destroyed in the living animal through lack of energy? If the carcinoma problem is attacked in its relation to the physiology of metabolism the first question is: In what way does the metabolism of growing tissue differ from the metabolism of resting tissue?"*

*-Otto Warburg-*

# Índice

Introducción .....	1
Cáncer .....	1
Cáncer pulmonar .....	2
Marcas de clase del cáncer .....	3
Metabolismo de células no malignas .....	3
Glicólisis .....	3
Mitocondria.....	6
Ciclo de Krebs.....	7
Fosforilación oxidativa .....	9
Capacidad reductora celular.....	10
Antecedentes.....	12
Reprogramación metabólica en las células tumorales .....	12
Efecto Warburg.....	12
Metabolismo de las mitocondrias en cáncer .....	13
Microambiente tumoral .....	16
Hipoxia en cáncer .....	16
Producción de lactato por las células tumorales y sus consecuencias .....	18
Acidosis en cáncer.....	19
Simbiosis metabólica .....	20
Marcadores de membrana involucrados en el metabolismo energético .....	21
Receptor de transferrina tipo 1 (CD71) .....	21
Ecto-5'-nucleotidasa (CD73).....	21
Transportador de aminoácidos (CD98) .....	22
Marcador de células madre cancerosas (CD133).....	23
Justificación .....	24
Hipótesis .....	25
Objetivos.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares .....	26
Materiales y métodos .....	27
Reactivos .....	27

Equipos .....	27
Esquema general de trabajo .....	28
Cultivo celular .....	29
Conteo y viabilidad celular.....	29
Condiciones de cultivo.....	29
Evaluación de la masa mitocondrial utilizando MitoTracker Green por citometría de flujo ...	30
Evaluación del potencial de membrana mitocondrial utilizando JC-1 por citometría de flujo	33
Evaluación de la capacidad reductora celular utilizando alamarBlue por fluorometría .....	36
Evaluación de la expresión de los marcadores CD71, CD73, CD98 y CD133 por inmunofluorescencia y citometría de flujo .....	37
Análisis estadístico .....	39
Resultados.....	40
Las líneas celulares de carcinoma pulmonar mostraron diferente susceptibilidad a los cambios de fuente de carbono, pH y tensión de oxígeno.....	40
En lactosis neutra se observó una disminución de la masa mitocondrial en las líneas de carcinoma pulmonar .....	44
El potencial de membrana mitocondrial presentó un comportamiento diferente en cada línea celular .....	47
El potencial de membrana mitocondrial de la línea celular A-549 presentó una mayor susceptibilidad ante los cambios en el microambiente que la línea celular Calu-1.....	50
Las líneas celulares de carcinoma pulmonar cultivadas con glucosa e hipoxia mostraron una tendencia a incrementar su capacidad reductora celular .....	53
Expresión de los marcadores de membrana involucrados en el metabolismo energético ...	54
Las células A-549 cultivadas en acidosis láctica e hipoxia incrementaron la expresión del receptor de transferrina CD71 .....	55
Las células Calu-1 cultivadas con lactato disminuyeron la expresión de la ecto-5'-nucleotidasa CD73.....	56
La expresión del transportador de aminoácidos CD98 fue susceptible a la hipoxia en línea celular A-549 y a la lactosis en la línea celular Calu-1.....	58
Discusión .....	61
Modelos del fenotipo metabólico de las células de carcinoma pulmonar cultivadas en diferentes condiciones.....	66
Conclusiones .....	70
Referencias.....	71



## Abreviaturas

<b>7-AAD</b>	7- Aminoactinomicina D
<b><math>\Delta\psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>Acetil-CoA</b>	Acetil-Coenzima A
<b>ADP</b>	Adenosina-5'-difosfato
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>CCCP</b>	Carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavín adenín dinucleótido reducido
<b>GTP</b>	Guanosina-5'-trifosfato
<b>HIF</b>	Factor de transcripción inducibles por hipoxia
<b>LDHA</b>	Lactato deshidrogenasa A
<b>LDHB</b>	Lactato deshidrogenasa B
<b>GLUT1</b>	Transportador de glucosa 1
<b>JC-1</b>	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-yoduro de tetraetilbencimidazolcarbocianina
<b>MCT</b>	Transportador de monocarboxilato
<b>MFI</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
<b>NSCLC</b>	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfatos
<b>SCLC</b>	Cáncer pulmonar de células pequeñas
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino

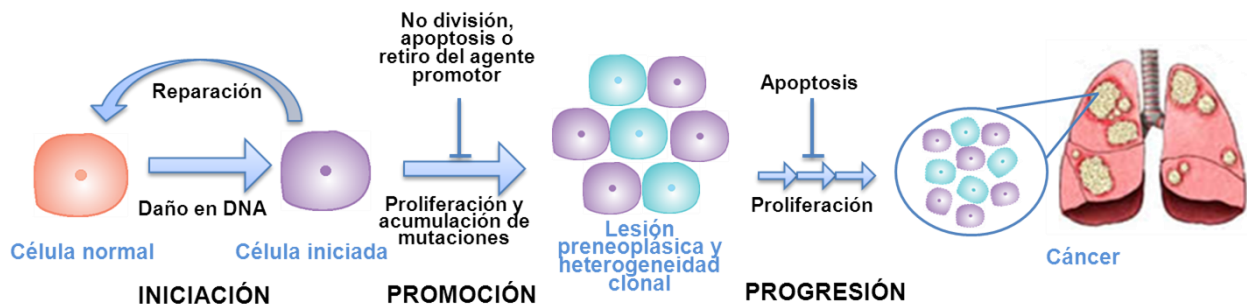


## Introducción

### Cáncer

El cáncer es la manifestación clínica de un conjunto de enfermedades causadas por mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes de estabilidad, lo que lleva a la proliferación y el crecimiento celular descontrolado. [62, 80, 128] Las células transformadas invaden el tejido normal que las rodea y son capaces de diseminarse hasta invadir otros tejidos (metástasis). [5, 62, 80]

El proceso que ocurre para la aparición del cáncer se conoce como carcinogénesis e involucra mutaciones causadas por agentes físicos, químicos y/o biológicos; además de la selección de células que progresivamente incrementan su capacidad de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis. De forma general, el proceso de carcinogénesis se divide en tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Figura 1). [19, 62]



**Figura 1. Modelo de carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión.** La iniciación consiste en un evento mutacional que no es correcta o completamente reparado. Una vez que esto ocurre, la célula puede tener varios destinos: 1) permanecer en un estado estático de no división, 2) sufrir apoptosis si las mutaciones adquiridas son incompatibles con la vida o 3) dividirse y proliferar. Si la célula prolifera ocurre lo que se denomina promoción. La promoción involucra la expansión clonal selectiva de las células iniciadas para producir una lesión preneoplásica, acumulándose cambios genéticos y epigenéticos que dan lugar a células fenotípicamente diferentes (heterogeneidad clonal). Los agentes “promotores” llevan a una proliferación celular sostenida a través de un incremento en la proliferación y/o la inhibición de la apoptosis. La progresión es la conversión de las lesiones preneoplásicas a cáncer. En esta etapa, debido al incremento en la síntesis de DNA y en la proliferación celular adquiridos durante la promoción, la posibilidad de que ocurran más daños genéticos aumenta. Con la formación de la neoplasia, se logra crecimiento autónomo y/o falta del control del crecimiento. [62, 99] Adaptado de la referencia 62



## ***Cáncer pulmonar***

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En 2008 se le atribuyeron 7,6 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total) a nivel mundial. Se estima que para 2030 habrá 13,1 millones de muertes a causa del cáncer. <sup>[89]</sup>

En 2008, el cáncer pulmonar tuvo la mayor tasa de incidencia (1,1 millones de casos nuevos) y de mortalidad (950 000 defunciones) a nivel mundial en hombres; mientras que en mujeres fue el cuarto en incidencia (515 000 casos nuevos) y el segundo en mortalidad (427 000 defunciones). <sup>[51, 53]</sup> En México hubo 9148 casos nuevos de cáncer pulmonar, causando 8807 defunciones, con lo que se situó en el cuarto lugar en incidencia y mortalidad tomando en cuenta ambos sexos. <sup>[52]</sup>

El tabaco es la principal causa de cáncer pulmonar, provocando hasta 90% de todas las muertes por esta enfermedad; sin embargo, menos del 20% de los fumadores desarrollan cáncer, lo cual sugiere que existen otros factores importantes para el desarrollo de este padecimiento. <sup>[13]</sup>

El cáncer pulmonar se divide en dos grupos principales con base en diferencias histológicas, de diseminación y de respuesta al tratamiento: <sup>[123]</sup>

- **Cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC).** Se origina a partir de células neuroendocrinas. Usualmente tiene una localización peribronquial con infiltración hacia la submucosa bronquial y el tejido peribronquial. Con frecuencia los tumores muestran necrosis extensa y se diseminan rápidamente, incluso antes de presentarse los síntomas. <sup>[8, 93, 123]</sup>
- **Cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).** Se origina a partir de células epiteliales. Es el tipo de cáncer pulmonar más común, usualmente crece y se disemina más lentamente que el SCLC pero es menos sensible a quimioterapia y radioterapia que el SCLC. <sup>[79, 81]</sup> El NSCLC está integrado por tres subtipos:



- **Adenocarcinomas.** Es un cáncer epitelial glandular que suele desarrollarse en células secretoras de moco; la mayoría son tumores periféricos. Son el subtipo más común. <sup>[79, 128]</sup>
- **Carcinoma de células escamosas.** La mayoría de estos tumores surgen en el sistema bronquial, especialmente en los bronquios segmentarios y, aproximadamente un tercio, en las vías respiratorias periféricas pequeñas. <sup>[128]</sup>
- **Carcinoma de células grandes.** Este tipo de tumores puede encontrarse tanto en la periferia del pulmón como en la zona central, apareciendo frecuentemente como tumores necróticos grandes. Tienen a crecer y diseminarse más rápido que los otros tipos. <sup>[7, 123]</sup>

### ***Marcas de clase del cáncer***

Existen características distintivas compartidas por los tumores malignos que permiten a las células tumorales sobrevivir, crecer y diseminarse, las cuales son conocidas como “marcas de clase del cáncer”; tales características son: el mantenimiento de la señalización proliferativa, la inmortalidad replicativa, la insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inducción de la angiogénesis y la invasión y metástasis. Sin embargo, recientemente se ha sugerido la inclusión de dos rasgos distintivos por ser considerados de gran importancia en el desarrollo y progresión del cáncer, éstos son: la evasión a la respuesta inmunológica y la reprogramación metabólica. <sup>[40]</sup>

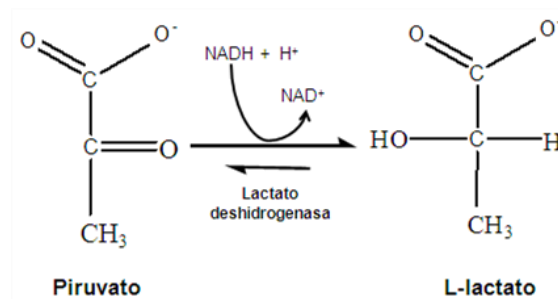
## **Metabolismo de células no malignas**

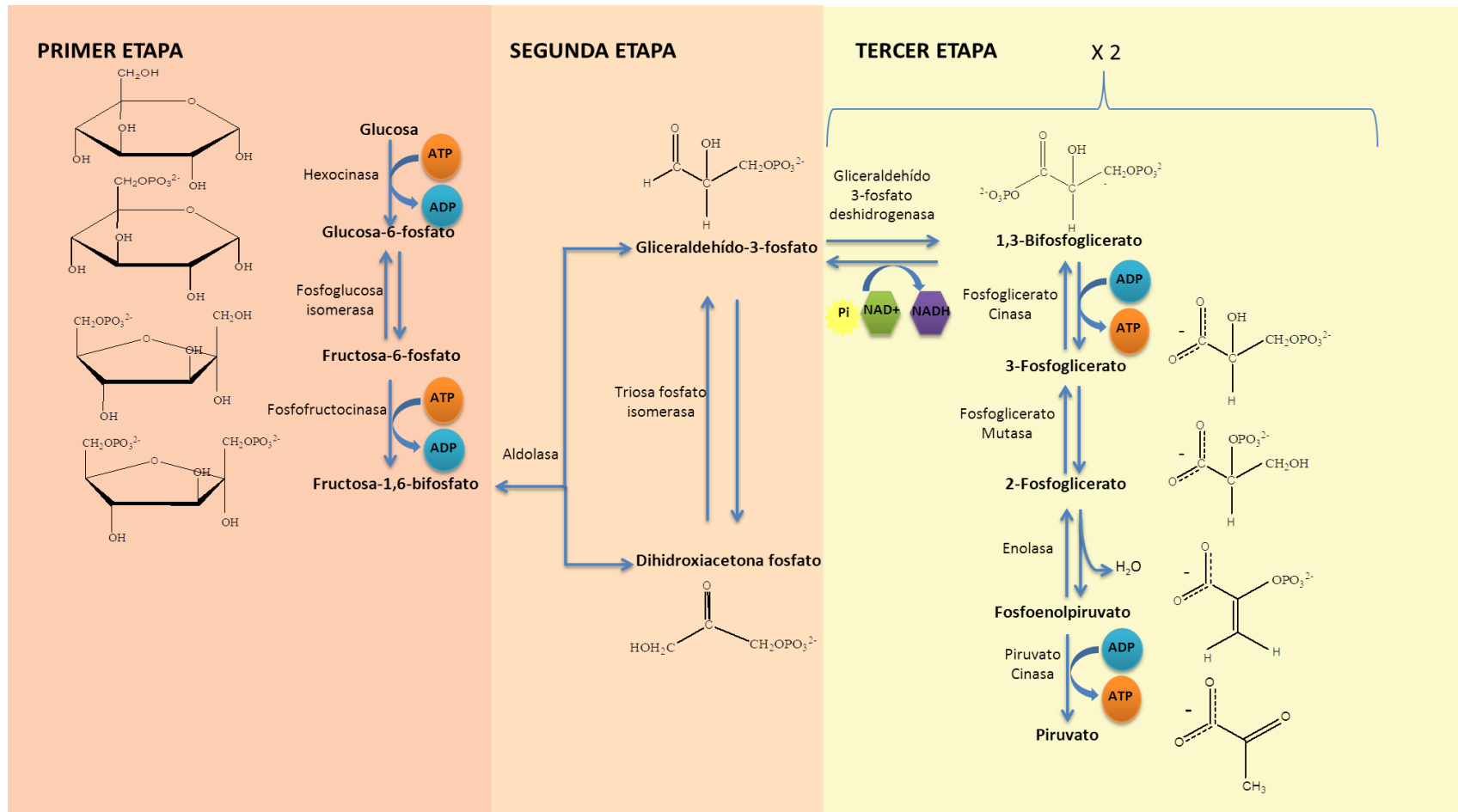
### ***Glicólisis***

La glicólisis es una vía catabólica del citoplasma que cataliza la oxidación gradual de la glucosa hasta piruvato. Los productos finales de esta vía son: dos moléculas de piruvato capaces de seguir siendo oxidadas, energía almacenada en dos moléculas de Adenosina-5'-trifosfato (ATP) y dos moléculas de Nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH) más dos protones ( $H^+$ ) (Figura 2). <sup>[64]</sup>



En la mayoría de los tejidos humanos, la glicólisis sólo es el primer paso en la oxidación de la glucosa, y una mayor cantidad de energía se obtiene en los procesos subsecuentes que se mencionarán más adelante. A pesar de esto, para el cerebro, la retina, los eritrocitos y el músculo esquelético durante la contracción vigorosa, la glicólisis es la principal fuente de energía. <sup>[10, 83]</sup> Después, en un proceso conocido como fermentación ácido láctica, el piruvato producido puede ser reducido a lactato al aceptar los electrones del NADH, regenerando NAD<sup>+</sup>. <sup>[83]</sup>



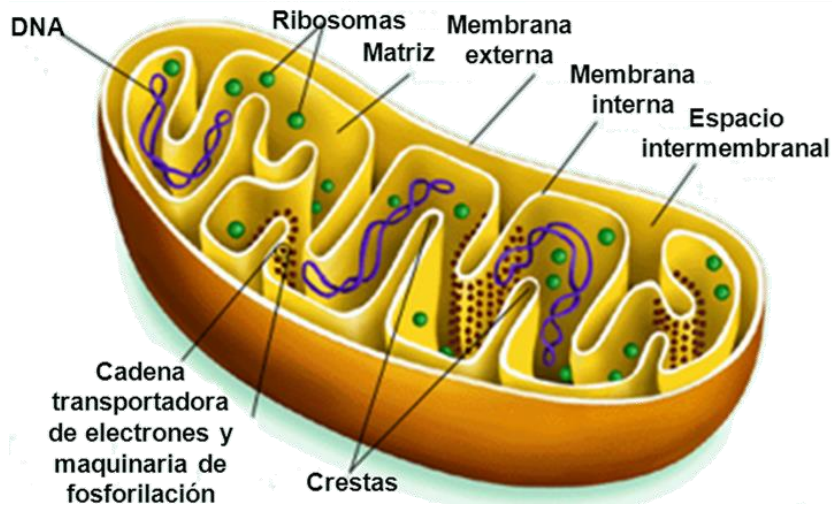


**Figura 2. La vía glicolítica puede ser dividida en tres etapas.** 1) La conversión de glucosa en fructosa-1,6-bifosfato, la cual comprende dos reacciones de fosforilación y una de isomerización, con un consumo total de dos moléculas de ATP. Esta etapa tiene por objetivo impedir que la glucosa salga de la célula y formar un compuesto listo para ser escindido en dos unidades fosforiladas de tres carbonos. 2) A partir de la fructosa de seis carbonos se forman dos moléculas interconvertibles de tres carbonos, con lo cual las cadenas de carbono de todas las hexosas metabolizadas se convierten en un producto común: el gliceraldehído-3-fosfato. 3) Cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato sufre una segunda fosforilación por fosfato inorgánico; en este paso se forma una molécula de NADH por cada molécula de tres carbonos. Las siguientes reacciones dan lugar a la formación de una molécula de piruvato y dos de ATP por cada molécula de tricarbonada. <sup>[10, 83]</sup> Adaptado de la referencia 10



## Mitocondria

Las mitocondrias son organelos celulares con una membrana doble (Figura 3), que están distribuidos en el citoplasma de la mayoría de las células eucariontes. Cada mitocondria tiene su propio DNA mitocondrial (mtDNA), ribosomas y RNA de transferencia, por lo que la biogénesis mitocondrial se lleva a cabo de forma independiente al resto de la célula, antes de la mitosis. [30, 70, 91]



**Figura 3. Estructura de la mitocondria.** Las mitocondrias presentan dos compartimentos: la matriz y el espacio intermembranal, los cuales están delimitados por dos membranas, una externa lisa y una interna fuertemente plegada. La membrana externa rodea el organelo, mientras que la membrana interna encierra la matriz mitocondrial; las invaginaciones de esta última membrana crean crestas en las que se localizan la cadena transportadora de electrones, la maquinaria de fosforilación y los transportadores de membrana. [64, 69]

Las mitocondrias son un centro metabólico muy importante debido a que producen más del 90% del ATP celular. [90] En ellas se lleva a cabo el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de algunos aminoácidos. Además, están involucradas en la producción de especies reactivas de oxígeno y la apoptosis. [29, 110]

El papel metabólico de las mitocondrias hace que su número, tamaño y forma varíen de acuerdo a los requerimientos de la célula y al patrón de actividad de cada órgano. Los tejidos con mayor actividad metabólica, como el miocardio y los túbulos contorneados distales del riñón, tienen más mitocondrias. [91, 92] La cantidad de

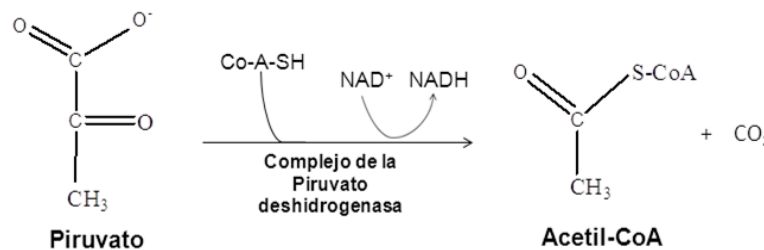


mitocondrias cambia en un mismo tejido de acuerdo al estado en que se encuentren las células, así, en el músculo esquelético el número de mitocondrias aumenta con el ejercicio. <sup>[92]</sup> Las dimensiones de la mitocondria parecen estar relacionadas con la actividad celular, ya que usualmente varían de 0,5  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1  $\mu\text{m}$  a 7  $\mu\text{m}$  de longitud, pero en el miocardio pueden observarse mitocondrias de hasta 10  $\mu\text{m}$ . <sup>[91]</sup>

### ***Ciclo de Krebs***

El ciclo de Krebs es una ruta metabólica que finaliza la oxidación de los carbohidratos, los ácidos grasos y algunos aminoácidos hasta  $\text{CO}_2$  y genera los cofactores reducidos NADH y Flavín adenín dinucleótido reducido ( $\text{FADH}_2$ ); además, provee de precursores para la biosíntesis de macromoléculas y forma una Guanosina-5'-trifosfato (GTP), por lo que se considera una vía catabólica y anabólica. <sup>[10, 83]</sup> El ciclo de Krebs es común a todas las células aerobias y en las células eucariontes se lleva a cabo en la matriz mitocondrial. <sup>[68]</sup>

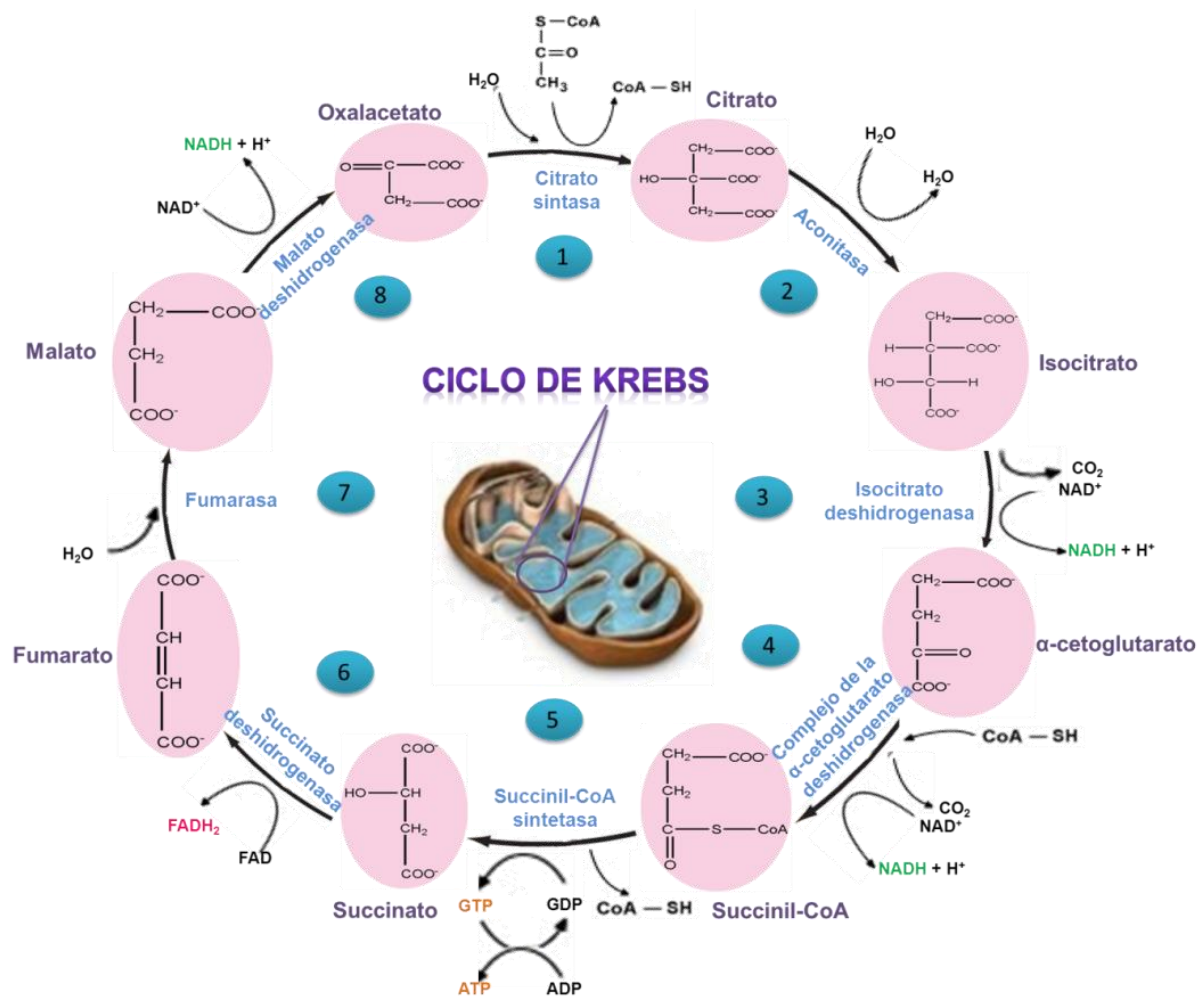
Los carbohidratos y los ácidos grasos entran al ciclo de Krebs en forma de acetil-Coenzima A (acetil-CoA). Los aminoácidos entran como acetil-CoA o como otras moléculas intermediarias en el ciclo. En el caso de la glucosa, la acetil-CoA se forma a partir del piruvato producido en la glicólisis, el cual puede ser transportado a la matriz mitocondrial, donde pierde su grupo carboxilo y forma el grupo acetilo que se condensará con la coenzima A (CoA) para formar acetil-CoA. Esta reacción es catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa y se lleva a cabo junto con la reducción de una molécula de  $\text{NAD}^+$ : <sup>[64,83]</sup>







La acetil-CoA se incorpora al ciclo de Krebs por una reacción de condensación entre su grupo acetilo y uno de los intermediarios del ciclo, el oxalacetato. En el resto de la vía los metabolitos del ciclo sufren oxidaciones y descarboxilaciones que finalmente regeneran el oxalacetato inicial, producen dos moléculas de  $\text{CO}_2$  y almacenan los electrones de los intermediarios en forma de tres moléculas de  $\text{NADH}$  y una de  $\text{FADH}_2$  (Figura 4). [68]



**Figura 4. El ciclo de Krebs se divide en ocho pasos generales.** 1) La acetil-CoA cede su grupo acetilo al oxalacetato, y forma una molécula de citrato. 2) El citrato se isomeriza a isocitrato. 3) El isocitrato sufre una descarboxilación, formando el  $\alpha$ -cetoglutarato, una molécula de  $\text{CO}_2$  y una de  $\text{NADH}$ . 4) Una segunda descarboxilación da lugar a la succinil-CoA y a una segunda molécula de  $\text{NADH}$ . 5) La ruptura del enlace tioéster de la succinil-CoA forma el succinato y libera energía que se utiliza para formar GTP, la cual puede donar su grupo fosfato terminal a la Adenosina difosfato (ADP) y formar ATP en una reacción catalizada por la nucleósido difosfato cinasa. 6) El succinato se oxida a fumarato por la succinato deshidrogenasa, una enzima que en eucariontes se encuentra unida a la membrana mitocondrial interna. Una molécula de  $\text{FAD}$  se reduce a  $\text{FADH}_2$  durante la reacción. 7) El fumarato es convertido a malato. 8) La oxidación del malato regenera el oxalacetato para continuar con el ciclo y forma una tercera molécula de  $\text{NADH}$ . [68, 83]



### ***Fosforilación oxidativa***

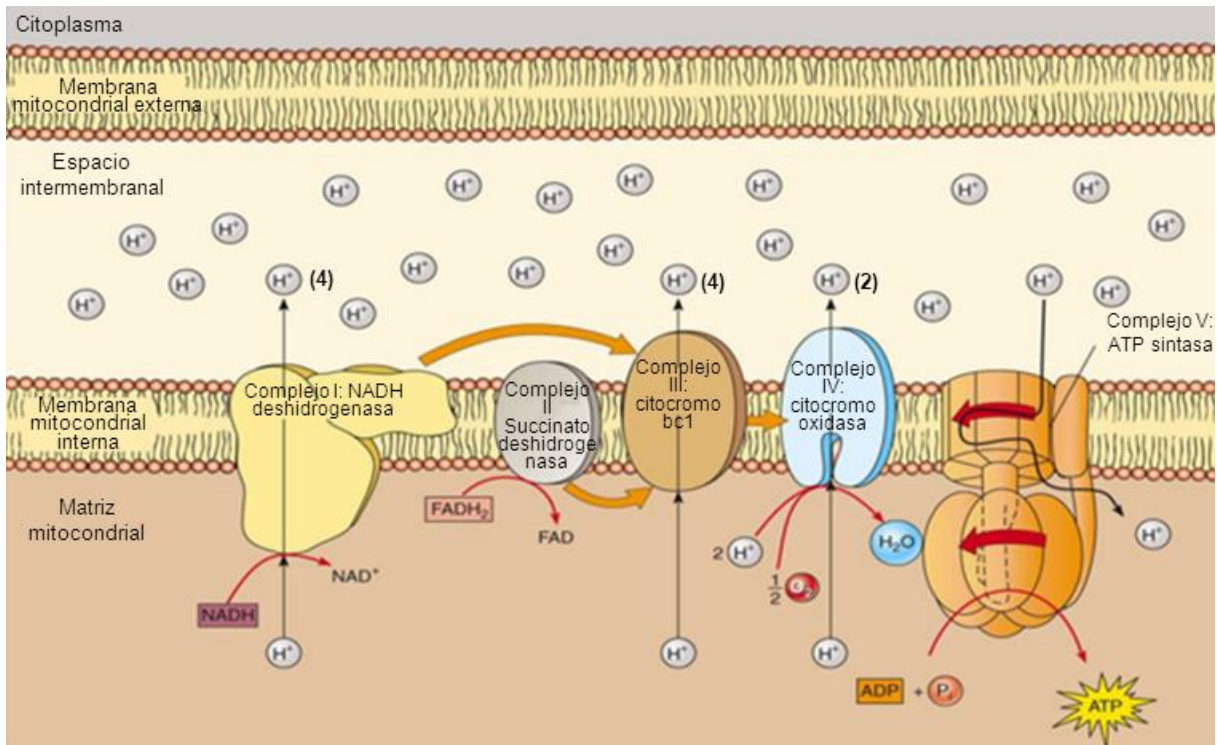
La fosforilación oxidativa es un proceso que utiliza el poder reductor de los cofactores NADH y FADH<sub>2</sub> obtenidos de la oxidación de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos en la obtención de la mayor parte del ATP celular en presencia de oxígeno, culminando el metabolismo energético de los organismos aerobios. <sup>[64, 83]</sup> Los componentes de esta vía se localizan en la membrana mitocondrial interna. <sup>[83]</sup>

La fosforilación oxidativa inicia con la oxidación del NADH y el FADH<sub>2</sub> generados en la glicólisis, el ciclo de Krebs o en la β-oxidación. Los electrones del NADH y el FADH<sub>2</sub> son transportados, a través de complejos óxido-redox, hasta su último aceptor de electrones que es el O<sub>2</sub>. A medida que los electrones fluyen por la cadena respiratoria, los protones son bombeados por los complejos I, III y IV hacia el espacio intermembranal. El paso de los protones genera un gradiente de pH (la matriz tiene un pH superior al del espacio intermembranal) y una diferencia de potencial a lo largo de la membrana interna (interior negativo y exterior positivo); juntos forman lo que se conoce como gradiente electroquímico. Cuando los protones fluyen a favor de su gradiente electroquímico (del espacio intermembranal a la matriz), liberan el ATP formado por la ATP sintasa (Figura 5). La oxidación de los cofactores reducidos y la fosforilación del ADP son procesos acoplados por un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial. <sup>[4, 70, 83]</sup>

El potencial de membrana mitocondrial y la tasa de fosforilación oxidativa varían de acuerdo a los requerimientos de ATP. Una disminución en el ADP significa baja demanda energética y disminuye la tasa de fosforilación, llevando a un incremento en el gradiente de protones y a una disminución del transporte de electrones. Un incremento en el contenido de ADP (por aumento de la hidrólisis del ATP debido a alta demanda energética) incrementa la tasa de fosforilación por el complejo V, disminuyendo el gradiente de protones y estimulando el transporte de electrones y el consumo de oxígeno. <sup>[69]</sup> El potencial de membrana mitocondrial también es un reflejo del funcionamiento de la mitocondria. Una reducción severa del potencial comúnmente es resultado de la inhibición en el transporte de electrones; mientras que, potenciales muy altos han sido reportados en condiciones de estrés y se han



relacionado con una fosforilación oxidativa menos eficiente. <sup>[56, 70]</sup> La capacidad de la fosforilación oxidativa varía de un tejido a otro y con la edad. <sup>[69, 92]</sup>



**Figura 5. Los electrones de los transportadores reducidos se transfieren a través de complejos con potenciales de óxido-reducción crecientes y la energía liberada impulsa la síntesis de ATP.** El proceso inicia cuando se retira un ion hidruro del NADH y es convertido en un protón y dos electrones. Los electrones son captados por el complejo I y transferidos a la coenzima Q (o ubiquinona). En este paso el complejo I bombea cuatro protones al espacio intermembranal. Los electrones provenientes del FADH<sub>2</sub> entran directamente por la coenzima Q; estos electrones proceden de la oxidación del succinato por la succinato deshidrogenasa, así como de la acetil-CoA, el  $\alpha$ -glicerolfosfato y otros sustratos. El complejo III cataliza la transferencia de los electrones de la ubiquinona al citocromo c bombeando también cuatro protones. Finalmente, el complejo IV transfiere los electrones del citocromo c al oxígeno, reduciéndolo a agua y bombeando en el proceso dos protones al espacio intermembranal. El flujo de protones a favor del gradiente, a través de la ATP sintasa causa cambios conformacionales en el sitio catalítico de esta enzima, provocando la síntesis y liberación del ATP. <sup>[4, 31, 59, 64, 132]</sup>

### Capacidad reductora celular

El término “capacidad reductora celular” se refiere a cofactores con características óxido-redox que le permiten a la célula transferir electrones para llevar a cabo procesos metabólicos como la producción de energía y el anabolismo. Estos cofactores también se conocen como “poder reductor”.

La capacidad reductora celular está dada principalmente por dos moléculas: Nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH) y Nicotinamida adenín



dinucleótido fosfato reducido (NADPH), que a pesar de sólo diferir en un grupo fosfato, no son intercambiables metabólicamente. Ambas moléculas almacenan la energía obtenida de la oxidación de biomoléculas, pero la energía del NADH se utiliza para sintetizar ATP a través de la fosforilación oxidativa y la del NADPH para biosíntesis reductiva. <sup>[127]</sup>

El NADH y el NADPH se forman a partir de sus pares oxidados:  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ . Ambas moléculas oxidadas reciben los electrones por medio de enzimas denominadas deshidrogenasas; sin embargo, el  $\text{NAD}^+$  lo hace acoplado a la glicólisis, la  $\beta$ -oxidación y el ciclo de Krebs, mientras que el  $\text{NADP}^+$  se reduce acoplado a la vía de las pentosas fosfato, principalmente. <sup>[23, 88]</sup>

Las concentraciones intracelulares de  $\text{NAD}^+$  y NADH son superiores a las de las formas fosforiladas. El  $\text{NAD}^+$  predomina en su forma oxidada, mientras que el  $\text{NADP}^+$  predomina en su forma reducida, lo que indica que la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  es superior a la relación  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . <sup>[98]</sup> Mientras más NADH tiene disponible una célula, más energía puede producir, por lo que la cantidad de NADH que contiene una célula depende de la energía que ésta requiere. <sup>[14]</sup>



## Antecedentes

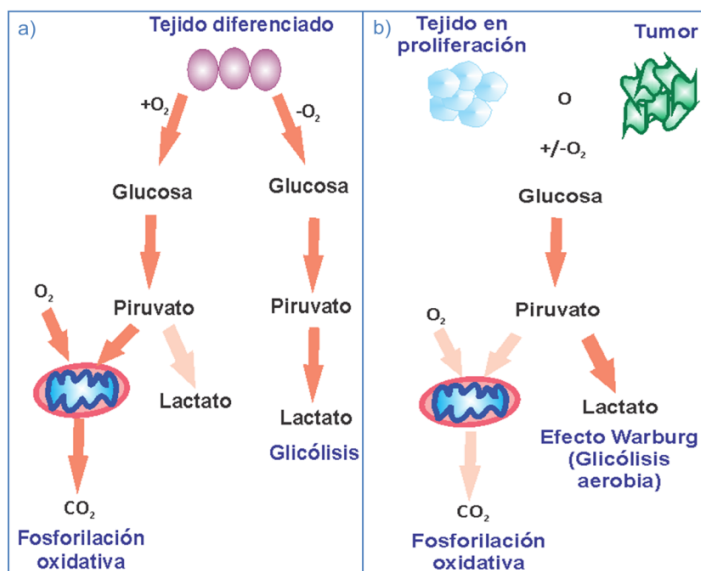
### Reprogramación metabólica en las células tumorales

El concepto de reprogramación metabólica se refiere a cambios en la regulación de las rutas metabólicas en las células tumorales. Estos cambios incluyen la activación de vías alternas normalmente apagadas en células no malignas; así como la inhibición o desregulación de otras vías que sí forman parte del metabolismo de las células normales.

### Efecto Warburg

En la década de 1920, Otto Warburg y colaboradores descubrieron que las células tumorales oxidaban la mayor parte de la glucosa a través de la glicólisis y fermentación ácido láctica, independientemente de la disponibilidad de oxígeno. A este fenómeno en donde se prefiere la fermentación ácido láctica sobre el metabolismo energético mitocondrial con aumento en la actividad glicolítica, aún en presencia de oxígeno se le denominó efecto Warburg o glicólisis aerobia (Figura 6).

[25, 65, 130]



**Figura 6. El efecto Warburg fue el primer indicio de una reprogramación metabólica en las células tumorales. a)** En presencia de oxígeno, las células de los tejidos diferenciados inician el metabolismo de la glucosa con la glicólisis y lo finalizan en la mitocondria con la fosforilación oxidativa. Cuando el oxígeno es insuficiente, el piruvato generado en la glicólisis no entra a la mitocondria y se convierte a lactato. **b)** Otto Warburg descubrió que las células tumorales presentaban un metabolismo distinto, ya que en ellas la mayoría de la glucosa se metaboliza a lactato, independientemente de la tensión de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg o glicólisis aerobia. Este fenómeno también ocurre en las células diferenciadas con una alta proliferación. <sup>[126]</sup> Adaptado de la referencia 126

Warburg propuso que la glicólisis aerobia ocurría porque las células neoplásicas adquirían un daño mitocondrial permanente que les llevaba a depender de la



glicólisis. Sin embargo, investigaciones posteriores encontraron que el metabolismo oxidativo mitocondrial aporta energía de forma importante en líneas celulares de glioma, de cáncer de cérvix y de hepatoma de ratón. [37, 102, 103, 126] Lo anterior puso en duda la hipótesis de una disfuncionalidad mitocondrial en las células tumorales, sugiriéndose que el efecto Warburg no es una característica de todas las células tumorales pero que este fenotipo puede ser adquirido debido a la alta proliferación y en respuesta a las severas condiciones microambientales. [82]

### ***Metabolismo de las mitocondrias en cáncer***

Recientemente, el papel de las mitocondrias en el desarrollo y progresión del cáncer ha despertado gran interés, lo que ha llevado a realizar múltiples investigaciones sobre el tema. En las células malignas se han encontrado tanto alteraciones en las vías metabólicas que se llevan a cabo en la mitocondria, como cambios en su potencial, tamaño y forma. [82]

Existe evidencia experimental de que la glutaminólisis, una vía metabólica de la mitocondria encargada de la utilización de la glutamina, se encuentra altamente activa en varios tipos de cáncer, entre ellos: glioblastoma, leucemia y carcinoma hepatocelular. [2, 22, 74, 133] La glutaminólisis genera malato y oxalacetato. La conversión de malato a piruvato por la enzima málica genera NADPH, mientras que a partir del oxalacetato se produce citrato (Figura 7). El NADPH y el citrato son metabolitos necesarios para la síntesis de lípidos, por lo que la glutaminólisis es importante para la proliferación de las células tumorales. [25]

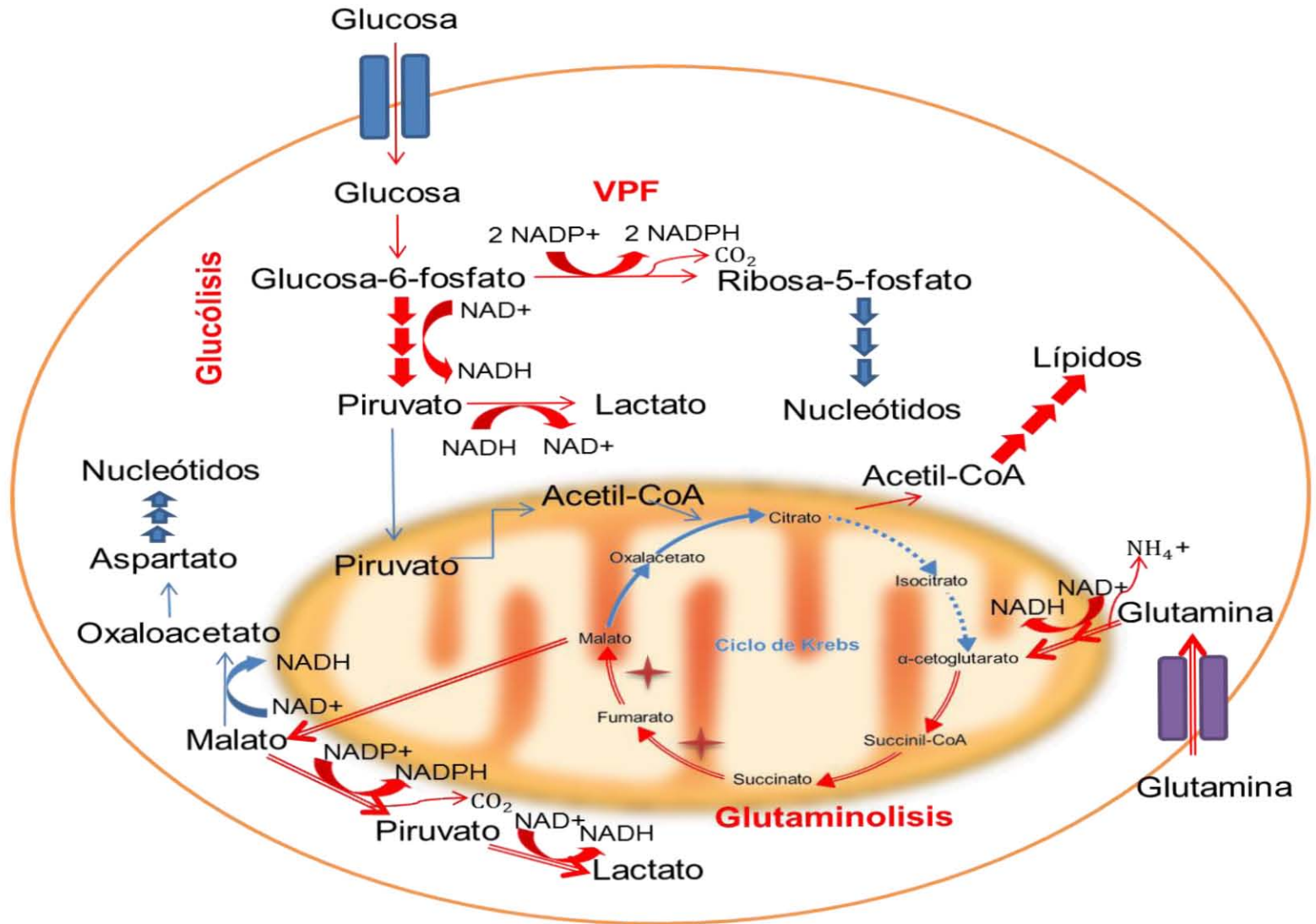
El ciclo de Krebs es una de las vías metabólicas que han presentado alteraciones en las células tumorales. En mitocondrias aisladas de células de hepatoma se ha encontrado que gran parte del citrato del ciclo sale de la mitocondria para biosíntesis de lípidos; sin embargo, también se ha observado que la glutaminólisis se encarga de reabastecer el ciclo de Krebs a nivel del  $\alpha$ -cetoglutarato (Figura 7). [9, 94] En feocromocitomas y paragangliomas se han encontrado mutaciones en la succinato deshidrogenasa, mientras que en leiomioma, leiomiosarcoma y carcinoma renal se han identificado mutaciones en la fumarasa. [25, 66] Lo anterior provoca la acumulación de succinato y fumarato (Figura 7). Estos sustratos podrían favorecer la activación de



los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs) y generar un estado pseudohipóxico que lleve a un metabolismo predominantemente glicolítico en las células tumorales. <sup>[66]</sup>

Otros estudios en células tumorales han indicado una menor actividad de los complejos I, III y IV de la fosforilación oxidativa, así como de la ATP sintasa, pudiendo llevar a la acumulación de NADH en las células tumorales. <sup>[25, 32, 36, 113]</sup>

A pesar de lo anterior, también se ha observado que el metabolismo mitocondrial de algunas células tumorales se encuentra activo y es importante en la producción de ATP. Estudios en la línea celular de carcinoma de cérvix SiHa demostraron que la síntesis de ATP se lleva a cabo principalmente en la mitocondria, mientras que en las células de cáncer de mama MCF-7 se reportó que el 80% de la producción de ATP se debe al metabolismo oxidativo y el 20% al glicolítico. <sup>[15, 39]</sup> Incluso en células tumorales con un fenotipo predominantemente glicolítico, el metabolismo celular puede ser redirigido e incrementar la actividad de la mitocondria. En las células tumorales de cáncer pulmonar A-549 y H460 se encontró que al inhibir enzimas de la glicólisis, la respiración mitocondrial incrementaba, mientras que la inhibición de la lactato deshidrogenasa en células de cáncer de mama provocó un aumento en la respiración mitocondrial y una disminución del potencial de membrana mitocondrial. <sup>[27, 139]</sup>



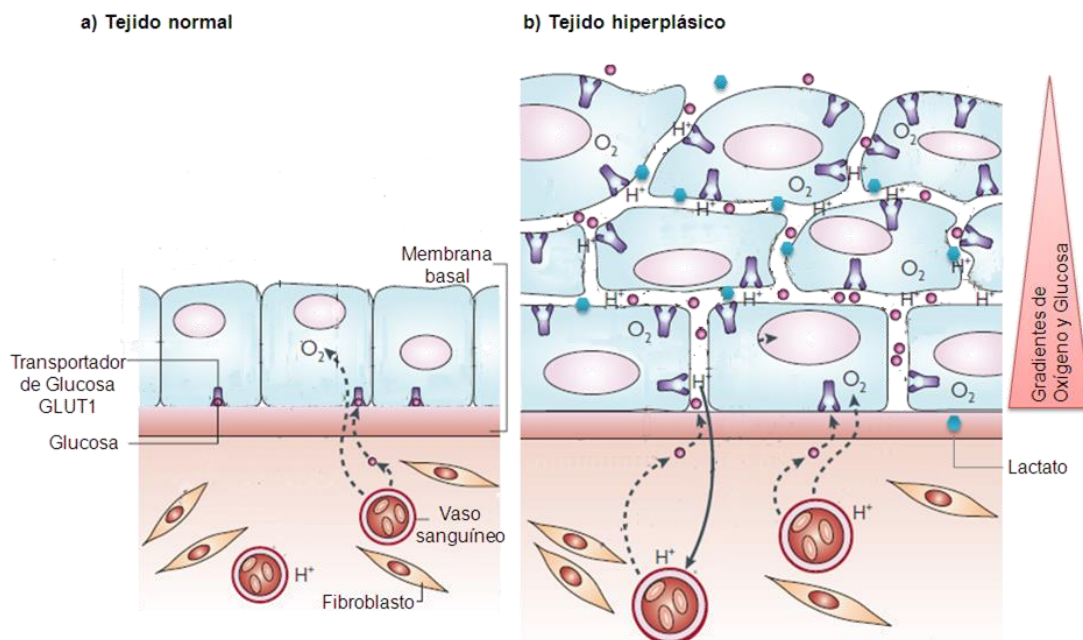
**Figura 7. Esquema general del metabolismo que puede operar en las células tumorales.**  $\rightarrow$  = enzimas que se han encontrado altamente activas.  $\cdots\rightarrow$  = Enzimas cuya actividad podría estar disminuida  $\Rightarrow$  = Glutaminólisis.  $\star$  = Enzimas que se encuentran inactivas en algunos tipos de cáncer, por lo que se podría producir una acumulación de succinato y fumarato. VPF = Vía de las pentosas fosfato.





## Microambiente tumoral

Las células que dan origen al tumor no siguen un patrón de crecimiento coordinado y proliferan lejos de la membrana basal que se encuentra entre las células del tejido y los vasos sanguíneos. Lo anterior provoca que el oxígeno y los nutrientes tengan que difundir distancias mayores, creando regiones de baja tensión de oxígeno (hipoxia) y gradientes de glucosa. Además, la alta actividad glicolítica característica de las células tumorales lleva a una gran producción de lactato. El lactato generado se secreta vía el transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) mediante simporte con protones, provocando la acidificación del medio extracelular (Figura 8). [33, 67, 104]



**Figura 8. El microambiente dentro del tumor se forma como consecuencia del crecimiento descontrolado y del metabolismo alterado de las células tumorales. a) Microambiente en un tejido normal.** Las células proliferan de forma controlada, por lo que la distribución de oxígeno y nutrientes es óptima para todas las células. **b) Microambiente en un tejido hiperplásico.** La isquemia en el tumor, producto del crecimiento descontrolado de las células tumorales, provoca una disminución en el aporte de oxígeno y de nutrientes para las células más alejadas de los vasos sanguíneos. El metabolismo glicolítico lleva a una alta producción de lactato y la acidificación del medio. [33] Adaptado de la referencia 33

### Hipoxia en cáncer

En los tejidos de los mamíferos, la concentración de  $O_2$  oscila entre el 2% y el 9%. La hipoxia usualmente se relaciona con concentraciones  $\leq 2\%$  de  $O_2$ . [12]



El oxígeno es el primer sustrato cuya concentración declina durante el desarrollo del tumor. <sup>[33]</sup> Debido a que la distancia de difusión del oxígeno tiene un máximo de 200  $\mu\text{m}$ , las células oxigenadas se limitan a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  desde el vaso sanguíneo. <sup>[33, 137]</sup> A pesar de que las células tumorales adquieren capacidad angiogénica, la microvasculatura generada es desorganizada y con un flujo inestable; así que con frecuencia no logra resolver la deficiencia de oxígeno, lo que lleva a episodios transitorios o prolongados de hipoxia y reoxigenación. <sup>[67, 137]</sup>

En células normales, la hipoxia severa limita la producción de ATP por medio de la fosforilación oxidativa, pudiendo detener la proliferación celular y/o inducir apoptosis; sin embargo, en las células tumorales se han observado cambios genéticos (como la expresión de HIFs) y metabólicos que les permiten sobrevivir e incluso proliferar en ambientes hipóxicos. <sup>[35, 41]</sup>

En células de carcinoma de cérvix (SiHa), la inhibición de la cadena respiratoria con rotenona por 48 h provocó una reducción en la producción de ATP del 35% y 16% en cultivos normóxicos e hipóxicos, respectivamente, indicando que en estas células tumorales, la fosforilación oxidativa era funcional y que se podía obtener ATP por esta vía tanto en condiciones de normoxia como en hipoxia. <sup>[17]</sup>

El estudio por citometría de flujo de células de glioma M010b cultivadas en hipoxia (0,6% de  $\text{O}_2$ ) por 24 h reveló una disminución de la masa mitocondrial de  $13,2 \pm 8,8\%$  y un aumento del potencial de membrana mitocondrial de  $16,4 \pm 5,6\%$ , respecto a las células cultivadas en normoxia. <sup>[124]</sup> La línea celular de carcinoma pulmonar A-549 cultivada en hipoxia (2% de  $\text{O}_2$ ) mostró una menor actividad de la enzima citrato sintasa ( $\approx -23\%$ ), lo que se relaciona con una menor masa mitocondrial. <sup>[45]</sup> Esto indica que las mitocondrias de las células M010b y A-549 son susceptibles a la hipoxia y que esta condición provoca una disminución de los requerimientos de mitocondrias.

La cantidad de NADH y ATP celular se evaluaron en las células A-549 sometidas a 2% de  $\text{O}_2$  por 24 h, encontrándose un ligero incremento del NADH y una disminución del 30% del ATP respecto a las células en normoxia. <sup>[45]</sup> Lo anterior sugiere que el



transporte de electrones se encuentra activo en hipoxia y normoxia pero que la hipoxia reduce levemente la actividad de éste.

Las células tumorales que se encuentran en un microambiente hipóxico se caracterizan por una mayor inestabilidad genómica e inmortalidad celular y se les ha relacionado con un incremento en la migración celular y con un potencial maligno mayor. [34, 35, 41, 67, 108, 141] Lo anterior las hace un blanco importante en la terapia contra el cáncer, pero por su localización se vuelven menos accesibles a la radioterapia.

### ***Producción de lactato por las células tumorales y sus consecuencias***

La glicólisis y glutaminólisis son vías metabólicas que producen una gran cantidad de lactato y que están altamente activas en las células tumorales. [42] Para evitar la acumulación de lactato dentro de la célula, éste es secretado al medio extracelular por medio del transportador MCT4 en simporte con protones. [104]

En condiciones normales, sólo el hígado, el músculo y el cerebro son capaces de metabolizar el lactato. El hígado lo utiliza para gluconeogénesis; mientras que miocitos y neuronas pueden convertirlo a piruvato y metabolizarlo a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. [60, 96] Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que las células tumorales también tienen la capacidad de utilizar el lactato como fuente de carbono. En células de carcinoma de cérvix (SiHa) y de cáncer de próstata (PC-3), se descubrió que el lactato puede ser utilizado para producir ATP pero que se requiere consumo de oxígeno. [21, 116] En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, la utilización de lactato en normoxia llevó a un incremento en la masa mitocondrial celular, [73] lo que podría indicar una mayor utilización del metabolismo mitocondrial cuando el lactato es la fuente de carbono.

El contenido de lactato varía ampliamente entre tumores, incluso si son del mismo tamaño, grado u origen. [60] Sin embargo, en biopsias de tumores primarios de cáncer cervical, cabeza y cuello, se ha detectado una correlación directa entre los niveles de lactato y la incidencia de metástasis. [108, 129] La presencia de lactato en el



microambiente tumoral también se ha asociado con la inhibición de la respuesta inmunológica, la estimulación de la angiogénesis y la radioresistencia. <sup>[42]</sup>

### ***Acidosis en cáncer***

En las células normales, el pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) es menor al pH extracelular ( $\text{pH}_e$ ). Sin embargo, las células tumorales tienen un gradiente de pH reverso: su  $\text{pH}_i$  es  $\geq 7,4$  y su  $\text{pH}_e$  oscila entre 6,7 y 7,1. <sup>[132]</sup>

Como se mencionó anteriormente, la secreción de lactato mediante simporte con protones es una de las causas de acidez extracelular y se conoce como acidosis láctica. También, la hidratación del  $\text{CO}_2$  a bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y un protón se ha identificado como una fuente importante de acidez tumoral, debido a que en las células tumorales la vía de las pentosas fosfato que se encuentra altamente activa produce  $\text{CO}_2$  en altas cantidades. <sup>[46]</sup> La mayoría de las investigaciones realizadas se centran en la acidosis láctica, ya que en el microambiente tumoral suelen presentarse juntos ambos factores.

Se ha encontrado que el pH puede modificar el crecimiento de las células tumorales *in vitro*. En líneas celulares de cáncer cervical y de mama (HeLa y MCF-7) se estudió el crecimiento celular a un pH neutro (7,3) y a un pH ácido (6,3), encontrándose una mayor tasa de crecimiento a pH 7,3 en ambos casos. <sup>[50]</sup>

En la línea celular murina de cáncer de mama 4T1, se reportó que la acidosis láctica prolonga la vida de las células en condiciones de privación de glucosa mediante arresto celular en la fase G0/G1 (las células se encuentran metabólicamente menos activas y por, lo tanto dependen menos de la glucosa), inducción de la autofagia e inhibición de la apoptosis. Lo anterior llevó a proponer que en ausencia de glucosa, la acidosis láctica mantiene viables a las células del tumor hasta que el suministro de glucosa se reestablece. <sup>[137]</sup>

Adicionalmente, la acidosis láctica podría redirigir el metabolismo de las células tumorales, ya que en tumores de cáncer de mama se encontró que la acidosis láctica provoca una sobreexpresión de genes asociados al ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa, metabolismo de ácidos grasos y de aminoácidos; mientras que reprime

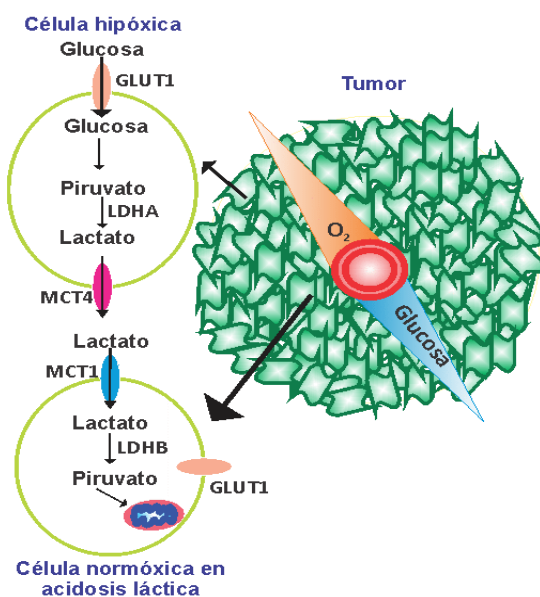


genes glicolíticos. *In vitro*, las células de carcinoma de cérvix cultivadas en acidosis láctica mostraron un menor consumo de glucosa y una mayor cantidad de ATP proveniente de la fosforilación oxidativa (72%).<sup>[17]</sup> Los hallazgos anteriores indican que la acidosis láctica suprime la glicólisis y redirige la producción de energía hacia el metabolismo aerobio.

La acidosis tumoral provoca la degradación de la matriz extracelular y la muerte de las células que rodean el tumor, por lo que la acidez tumoral se ha ligado con un incremento en la capacidad metastásica tumoral.<sup>[67]</sup>

### ***Simbiosis metabólica***

Debido a la naturaleza heterogénea del microambiente tumoral en el que las células más alejadas de los vasos sanguíneos se encuentran en hipoxia y con una menor biodisponibilidad de glucosa, mientras que las células cercanas a los vasos sanguíneos se encuentran en normoxia y una mayor disponibilidad de glucosa, además de una alta cantidad de lactato procedente del mismo metabolismo tumoral, se ha propuesto la existencia de una “simbiosis metabólica” tumoral. En ella se propone que las células normóxicas consumen el lactato en lugar de la glucosa, lo que permite que el gradiente de glucosa llegue hasta aquellas células que se encuentran en hipoxia, consiguiendo la supervivencia de las células tumorales en ambas condiciones (Figura 9).<sup>[116]</sup>



**Figura 9. La simbiosis metabólica podría ser un mecanismo de supervivencia de las células tumorales en la heterogeneidad del microambiente tumoral.** Las células que se encuentran en regiones hipóxicas utilizan la glucosa a través del GLUT1, al metabolizarla secretan una gran cantidad de lactato mediante el transportador de monocarboxilato 4 (MCT4). Este lactato es internalizado a través del MCT1 por las células normóxicas. En ellas, el lactato es convertido a piruvato por la lactato deshidrogenasa B (LDHB) y posteriormente metabolizado a través del ciclo del Krebs y la fosforilación oxidativa.<sup>[104,116]</sup> Adaptado de la referencia 105



En biopsias de carcinomas de cabeza, cuello, mama y colon, así como de cáncer pulmonar, se ha observado la expresión del transportador de monocarboxilato 1 (MCT1), el cual se encarga de internalizar el lactato en la célula. <sup>[116]</sup> La expresión del MCT1 se ha encontrado exclusivamente en las regiones vascularizadas y normóxicas de los tumores y es consistente con un aumento en la expresión de la lactato deshidrogenasa B (LDHB). <sup>[104]</sup> En un modelo murino se llevó a cabo la inhibición del MCT1, la cual retardó el crecimiento tumoral y provocó una necrosis en las regiones hipóxicas, sugiriendo que la supervivencia de las células en hipoxia dependía de la simbiosis metabólica. <sup>[116]</sup>

## **Marcadores de membrana involucrados en el metabolismo energético**

### ***Receptor de transferrina tipo 1 (CD71)***

El receptor de transferrina tipo 1 es una glicoproteína asociada a membrana que se encarga de capturar e internalizar el hierro asociado a la transferrina. <sup>[97, 99, 136]</sup>

La glicoproteína CD71 se ha encontrado incrementada en tumores de varios tipos de cáncer con respecto a sus tejidos no neoplásicos. En cáncer de colon, cáncer de vejiga y glioma, la expresión de CD71 ha correlacionado directamente con el grado del tumor. <sup>[101, 101, 111]</sup> En cáncer de pulmón de células no pequeñas la sobreexpresión del receptor de transferrina se ha asociado a una alta proliferación celular y alto potencial metastásico. <sup>[63, 141]</sup>

En células de hepatoma y de eritroleucemia expuestas a hipoxia, se ha reportado un aumento en el mRNA del receptor de transferrina, encontrándose que el promotor del gen que codifica para la glicoproteína CD71 tiene un sitio de unión para HIF-1. <sup>[71, 120]</sup>

### ***Ecto-5'-nucleotidasa (CD73)***

Ectoenzimas de superficie, como la ecto-5'-nucleotidasa o CD73, metabolizan los nucleótidos liberados. CD73 es una glicoproteína unida a membrana que cataliza la hidrólisis del AMP a adenosina. La adenosina se une a receptores que



desencadenan varias respuestas celulares, entre ellas el reciclaje de los nucleótidos de adenina. <sup>[6, 120]</sup>

Normalmente CD73 se expresa en células endoteliales y hematopoyéticas; sin embargo, este marcador también se ha encontrado en varios tipos de cáncer, como en melanoma y en cáncer de mama, siendo mayor su expresión en células con alta capacidad de invasión. <sup>[86, 106, 143]</sup> En un estudio en pacientes con tumores de ovarios se encontró que el 70% de ellos sobreexpresaban la ecto-5'-nucleotidasa CD73. <sup>[86]</sup>

Se ha encontrado en células del epitelio intestinal que HIF-1 tiene un sitio de unión en el promotor del gen CD73, por lo que la síntesis de novo de la glicoproteína CD73 podría estar regulada por hipoxia. <sup>[120]</sup> En carcinoma gástrico, se ha reportado que la expresión del HIF-1 $\alpha$  correlaciona con la expresión de la ecto-5'-nucleotidasa. <sup>[72]</sup>

### ***Transportador de aminoácidos (CD98)***

La proteína transmembranal CD98, es un heterodímero que participa en el transporte de L-aminoácidos. <sup>[135]</sup>

En un estudio comparativo entre tumores primarios y metastásicos (cáncer de colon, mama, cabeza y cuello, genitales, tejidos blandos, gástrico, hepatocelular, tiroides y timo), se encontró que las células tumorales de sitios metastásicos tenían una mayor expresión del transportador CD98. <sup>[57]</sup>

En tumores pulmonares neuroendócrinos, la expresión de la proteína CD98 correlacionó con la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ , sugiriendo que la hipoxia está relacionada con el metabolismo de los aminoácidos. <sup>[58]</sup>

En líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix (HeLa) y de hepatoma (HepG2) se encontró que la proteína CD98 está involucrada en la estabilización y regulación del transportador GLUT1, por lo que CD98 no sólo juega un papel importante en el transporte de los aminoácidos, sino que también contribuye a la regulación del metabolismo de la glucosa. <sup>[87]</sup>



### ***Marcador de células madre cancerosas (CD133)***

CD133 es una glicoproteína transmembranal que inicialmente fue descrita como un marcador específico para células progenitoras hematopoyéticas humanas CD34+, células madre de linajes neurales, epiteliales y endoteliales y sus contrapartes tumorales.<sup>[11]</sup> Sin embargo, el marcador CD133 también se ha encontrado en varios tipos de tumores. Las células tumorales CD133+ poseen una marcada capacidad de proliferación, de auto-renovación y de diferenciación.<sup>[11, 26, 114]</sup>

En biopsias de tumores de pulmón, de cerebro y de ovario, se ha identificado la presencia de células CD133+.<sup>[11, 26, 27, 114]</sup> En las biopsias de tumores de pulmón, las células CD133+ presentaron un incremento en la expresión de genes involucrados en motilidad y expulsión de fármacos en comparación con las células CD133-.<sup>[11]</sup>

Al exponer a tres condiciones consideradas de estrés metabólico: hipoxia, inhibición del complejo I de la cadena respiratoria con rotenona y depleción del mtDNA a las células de glioma U251, se reportó un incremento en la expresión de CD133 en las tres condiciones; por lo que se propuso a CD133 como un marcador de estrés bioenergético.<sup>[38]</sup> En otro estudio la expresión del marcador CD133 se incrementó en células madre cancerosas de glioma (X01, X02 y X03) cultivadas en hipoxia (1% de O<sub>2</sub>) por 48 h.<sup>[115]</sup>





## Justificación

El metabolismo de las células tumorales es un tópico que ha cobrado interés recientemente. En un inicio se pensaba que las células de un tumor mantenían el mismo fenotipo metabólico; sin embargo, ahora se sabe que las células tumorales son capaces de cambiar su metabolismo de acuerdo al microambiente en el que se encuentran. En particular, el papel de las mitocondrias en la adaptación al microambiente tumoral ha sido controvertido, ya que mientras algunos autores sugieren una participación mitocondrial prácticamente nula, otros proponen a las mitocondrias como un organelo capaz de modular su actividad ante las diferentes condiciones de crecimiento.

Las investigaciones realizadas apuntan a que el metabolismo de las células tumorales les proporciona ventajas de supervivencia y proliferación, por lo que conocer las alteraciones metabólicas permitirá identificar posibles blancos terapéuticos para eliminar a las células tumorales. Si bien, se han realizado numerosos estudios sobre el metabolismo de las células tumorales en condiciones de hipoxia, acidosis o lactosis, no se ha abordado el estudio del metabolismo energético tumoral considerando la combinación de las condiciones descritas, aunque en un tumor sólido la hipoxia, la acidosis y lactosis pueden presentarse simultáneamente.



## Hipótesis

Si las mitocondrias de las líneas celulares de carcinoma pulmonar A-549 y Calu-1 son funcionales y capaces de responder a su entorno; entonces al inducir un estrés metabólico al modificar la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y el pH, las células modularán su masa y potencial de membrana mitocondrial en función de las condiciones mencionadas. Dicha modulación podría correlacionar con la expresión de las moléculas involucradas en el metabolismo celular CD71, CD73, CD98 o CD133.



## Objetivos

### Objetivo general

Analizar la actividad mitocondrial de las líneas celulares de carcinoma pulmonar A-549 y Calu-1 cultivadas bajo condiciones de estrés metabólico inducido al variar la fuente de carbono, el pH y la tensión de oxígeno; así como determinar si la expresión de los marcadores involucrados en el metabolismo energético correlaciona con la actividad mitocondrial.

### Objetivos particulares

- Determinar la masa y el potencial de membrana mitocondrial de las líneas celulares A-549 y Calu-1 incubadas en diferentes condiciones de crecimiento variando la fuente de carbono (glucosa y lactato), el pH (acidosis y condiciones neutras) y la tensión de oxígeno (hipoxia y normoxia).
- Determinar la capacidad reductora celular en las líneas celulares incubadas en las condiciones de crecimiento antes mencionadas.
- Determinar la expresión de los marcadores de membrana involucrados en el metabolismo energético (CD71, CD73, CD98 y CD133) en las líneas celulares incubadas en las condiciones de crecimiento antes mencionadas.



## Materiales y métodos

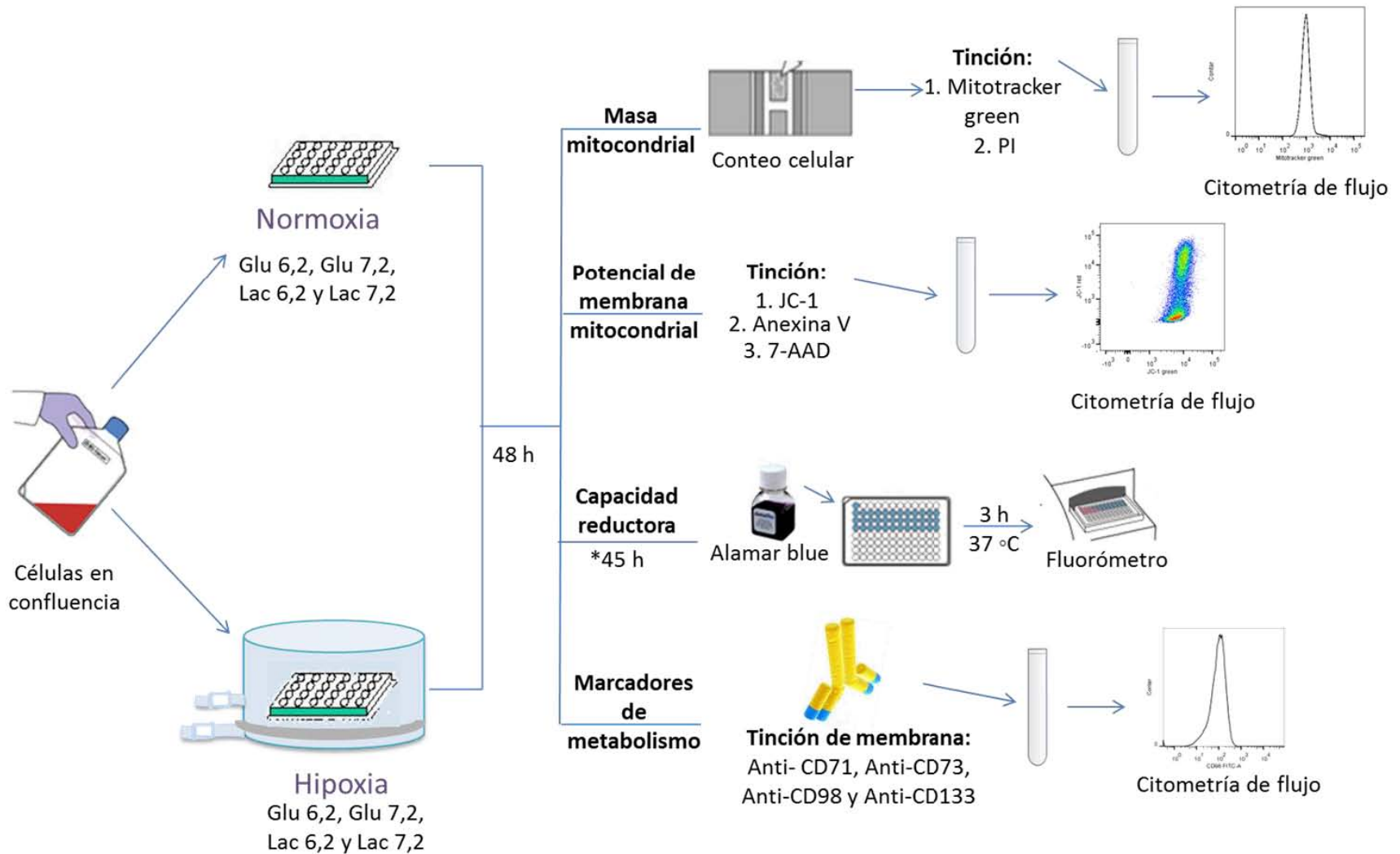
### Reactivos

El medio de cultivo RPMI-1640 (con o sin glucosa), el L-lactato de sodio que se agregó a los medios sin glucosa y la solución antibiótica (10 000 U/mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina) se adquirieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. El suero fetal bovino (SFB) se compró a Thermo Scientific, Logan, Utah, USA. La solución de tripsina (0,05%) - verseno (0,05%) libre de calcio y magnesio se compró a In vitro, D.F., México. El azul tripano se adquirió en Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. Los anticuerpos anti-CD71 (APC, clona OKT9), anti-CD73 (PerCP-eFluor 710, clona AD2) y anti-CD98 (FITC, clona 5E5) se adquirieron a eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA; el anticuerpo anti-CD133 (PE, clona AC133) se compró a Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA. El alamarBlue se compró a Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. Mitotracker Green se compró a Invitrogen, Eugen, OR, USA, y el yoduro de propidio a Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. El 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-yoduro de tetraetilbencimidazolcarbocianina (JC-1) y la carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP) provenían del kit "MitoProbe JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry" de Invitrogen, Eugen, OR, USA. La Anexina V (Alexa Fluor 647) se compró a BioLegend, San Diego CA, USA y la 7- Aminoactinomicina D (7-AAD) a Becton Dickinson Pharmingen, San José, CA.

### Equipos

Se utilizó un fluorómetro Fluoroskan Ascent FL de Labsystems. El citómetro de flujo utilizado fue el FACSCanto II de Becton Dickinson. La incubación de las células en normoxia se realizó en una incubadora Sanyo Electric Co., Ltd, mientras que para incubar las células en condiciones de hipoxia se utilizó una cámara de incubación modular Billups-Rothenberg.

## Esquema general de trabajo



\*En la prueba de capacidad reductora las células se incubaron 45 h, se agregó el AlamarBlue y se continuó la incubación hasta completar 48 h  
Glu = Glucosa; Lac = Lactato; 6,2 = pH 6,2; 7,2 = pH 7,2; PI = Yoduro de propidio; 7-AAD = 7- Aminoactinomicina D



## Cultivo celular

Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar A-549 y de carcinoma epidermoide Calu-1, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) y cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v y con una solución de antibióticos al 1% v/v (100 U/mL de penicilina y 0,1 µg/mL de estreptomina). Las líneas celulares se incubaron a 37°C con 21% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

Al llegar a confluencia las células fueron tratadas con tripsina para desprenderlas y transferirlas a una nueva caja con medio fresco.

## Conteo y viabilidad celular

El conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer. Para la discriminación entre células vivas y muertas se utilizó el colorante vital azul tripano. Este colorante se encuentra negativamente cargado, por lo que se interna únicamente en las células muertas que tienen su membrana dañada. <sup>[123]</sup>

## Condiciones de cultivo

Para llevar a cabo cada ensayo, las líneas celulares fueron sometidas a distintas condiciones de cultivo modificando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y el pH (Tabla 1).

Hipoxia (2% de O <sub>2</sub> )	Normoxia (21% de O <sub>2</sub> )
Glucosa pH=7,2	Glucosa pH=7,2
Glucosa pH=6,2	Glucosa pH=6,2
Lactato pH=7,2	Lactato pH=7,2
Lactato pH=6,2	Lactato pH=6,2

**Tabla 1.** Condiciones de cultivo empleadas en los experimentos.

Se utilizó medio RPMI-1640 con D- glucosa (2,0 g/L) o medio RPM1-1640 con L- lactato de sodio (2,8 g/L) suplementado con el SFB al 10% v/v y la solución de antibióticos. El pH del medio se ajustó a 7,2 o 6,2.



Las células en normoxia se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 21% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Para las células en hipoxia se creó una atmósfera húmeda que contenía 2% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 93% de N<sub>2</sub> y se incubaron en la cámara de incubación modular Billups-Rothenberg.

Las células tratadas en las diferentes condiciones se incubaron durante 48 horas y se evaluó:

- a) La masa mitocondrial por tinción con MitoTracker Green
- b) El potencial de membrana mitocondrial por tinción con JC-1
- c) La capacidad reductora celular por reducción del alamarBlue
- d) La expresión de los marcadores del metabolismo CD71, CD73, CD98 y CD133 empleando inmunofluorescencia

### **Evaluación de la masa mitocondrial utilizando MitoTracker Green por citometría de flujo**

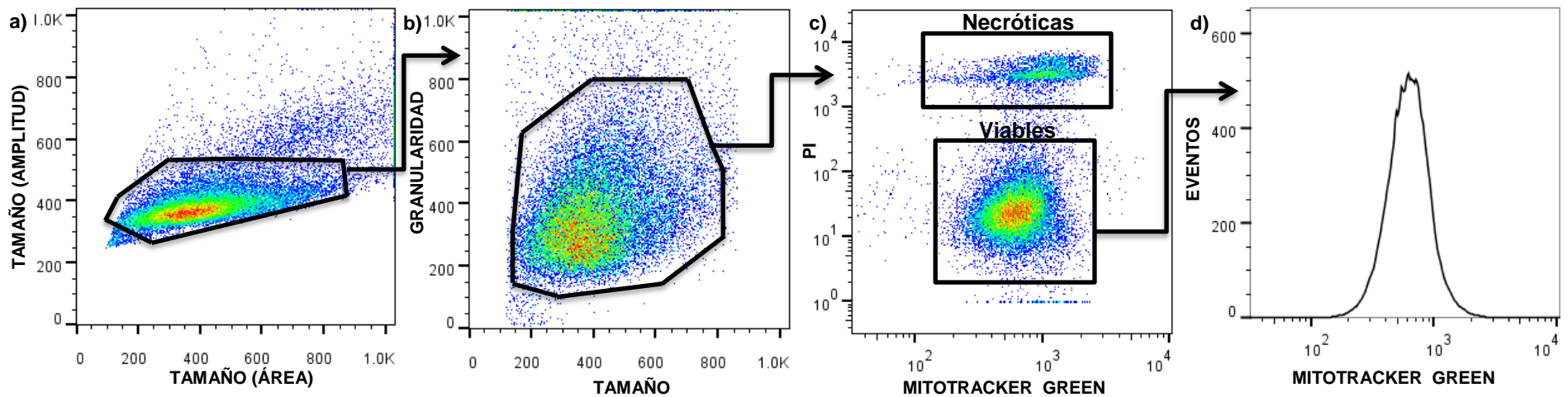
MitoTracker Green es un compuesto no fluorescente en soluciones acuosas pero que al acumularse en el ambiente lipídico mitocondrial emite fluorescencia de forma independiente del potencial de membrana mitocondrial. <sup>[1]</sup> Por lo tanto, la fluorescencia del compuesto en la célula es directamente proporcional a la masa mitocondrial de ésta.

Para cada condición se colocaron 100 000 células A-549 o 150 000 células Calu-1 totales. A las 48 horas de tratamiento, las células se desprendieron mediante el tratamiento con tripsina y se lavaron con amortiguador salino de fosfatos (PBS) 1X. Posteriormente se resuspendieron, se contaron en una cámara de Neubauer utilizando azul tripano y fueron lavadas. Las células se resuspendieron en MitoTracker Green 200 nM (200 µL por cada 100 000 células) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después, las células fueron lavadas y se resuspendieron en 200 µL de yoduro de propidio (5µg/mL) con el objetivo de discriminar a las células muertas y analizar solamente a la población de células viables (yoduro de propidio negativas).



Las muestras teñidas se leyeron en el citómetro de flujo FACSCanto II. Se adquirieron al menos 20 000 eventos provenientes de la región de células viables y se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI) del Mitotracker Green proveniente de dicha población. Los resultados obtenidos se analizaron con el software FlowJo V10. El esquema general de análisis se muestra en la Figura 10.



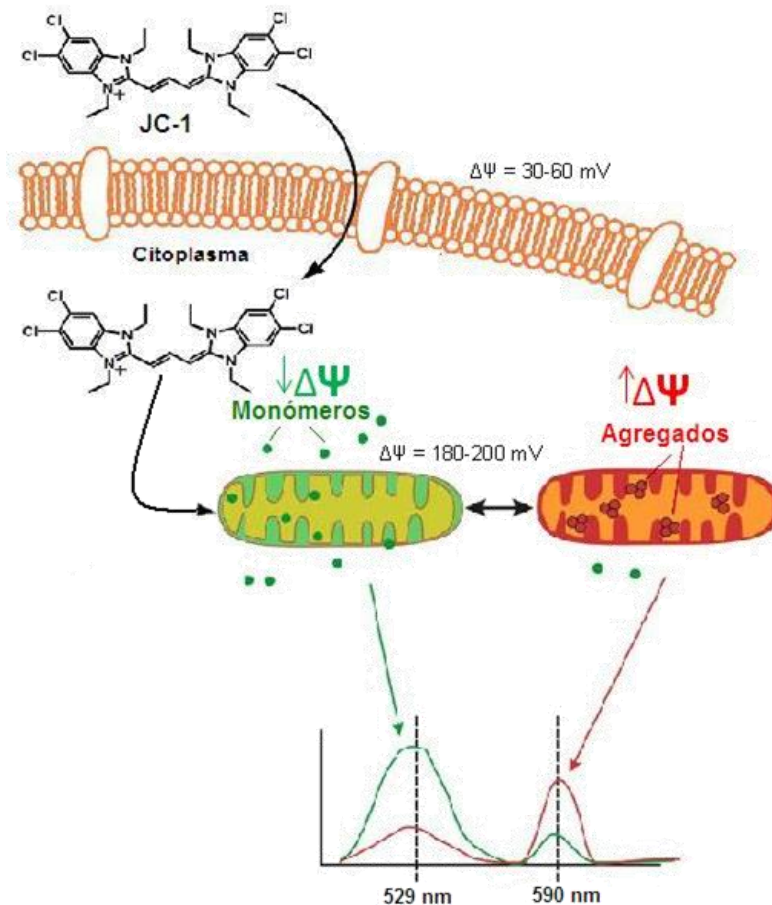


**Figura 10. Estrategia de análisis para la evaluación de la masa mitocondrial.** a) La gráfica de tamaño (área) contra tamaño (amplitud) nos permitió discriminar los agregados celulares debido a que emiten una señal de mayor área y mayor amplitud que las células individuales. b) A partir de las células no agregadas se realizó la gráfica de tamaño contra granularidad, con la que además de descartar los restos celulares (menor tamaño), fue posible observar cambios en el tamaño y la granularidad de las células bajo las condiciones estudiadas. c) De la población de células tumorales seleccionada en la gráfica b), se graficó la fluorescencia debida al MitoTracker Green contra la del yoduro de propidio (PI) para seleccionar a las células viables (yoduro de propidio negativas). d) Se realizó un histograma de la fluorescencia del MitoTracker Green, tomando en cuenta solamente a la población viable. A partir de este histograma se determinó la MFI del MitoTracker Green proveniente de cada condición, la cual es proporcional a la masa mitocondrial.



## Evaluación del potencial de membrana mitocondrial utilizando JC-1 por citometría de flujo

JC-1 es un fluorocromo catiónico de fluorescencia verde en su forma monomérica que al unirse a la mitocondria es capaz de formar agregados de fluorescencia roja en forma dependiente del potencial de membrana mitocondrial (Figura 11), ambas fluorescencias pueden ser detectadas por citometría de flujo. [54] El cociente de la MFI emitida en el rojo (590 nm) entre la MFI emitida en el verde (529 nm) (cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$ ) será directamente proporcional al potencial de membrana mitocondrial.



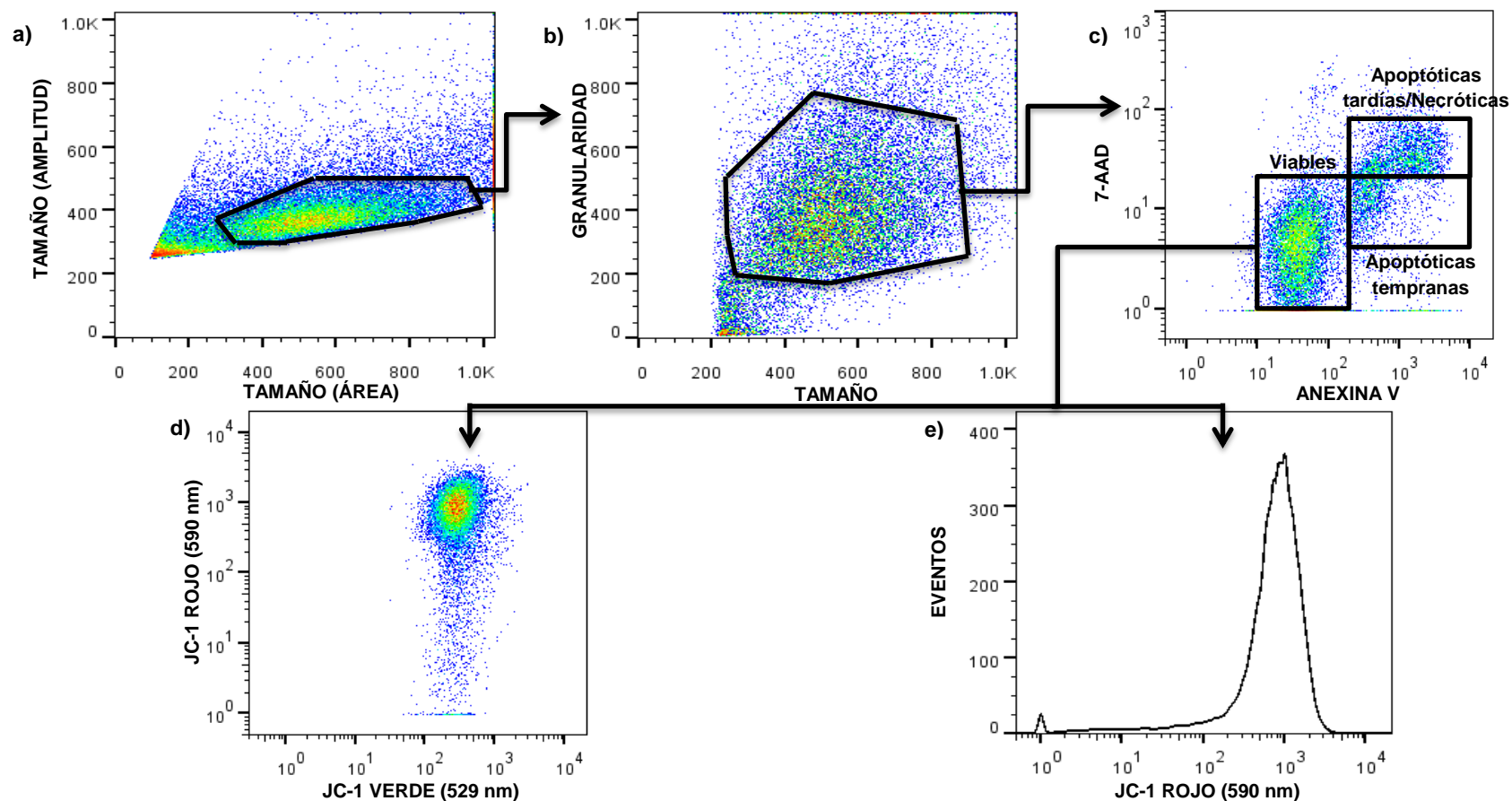
**Figura 11. Fundamento de la evaluación del potencial de membrana mitocondrial.** JC-1 se incorpora y acumula en la matriz mitocondrial debido a la carga positiva del fluorocromo y la carga negativa de la matriz. Si la diferencia del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) es baja, el fluorocromo permanece en su forma monomérica y emite fluorescencia verde (529 nm); pero si el  $\Delta\Psi$  es alto, el compuesto forma agregados de fluorescencia roja (590 nm).



Para comprobar que bajo nuestras condiciones experimentales era posible detectar cambios en el potencial de membrana, se utilizó carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP), un ácido débil que transporta los protones a través de la membrana mitocondrial y que abate el potencial de ésta.<sup>[55, 122]</sup> Dado que el potencial de membrana mitocondrial se abate en los procesos de muerte celular, se utilizó Anexina V y 7-AAD para descartar a las células apoptóticas tempranas (7-AAD negativas y Anexina V positivas) y apoptóticas tardías o necróticas (7-AAD negativas y Anexina V dobles positivas); y así verificar que los cambios en el potencial ocurrieran únicamente por las condiciones experimentales establecidas para estudio y no por la muerte celular.

En este ensayo se utilizaron 50 000 células A-549 o 75 000 células Calu-1 totales por condición. Transcurridas las 48 horas de incubación las células se recuperaron utilizando tripsina, se transfirieron a tubos de citometría y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de JC-1 (2  $\mu$ M). Al tubo para CCCP se le añadió este compuesto a una concentración final de 100  $\mu$ M. Todos los tubos se incubaron por 30 minutos a 37°C. Después se realizó un segundo lavado con PBS 1X y se agregaron 100  $\mu$ L de Anexina V (0,6  $\mu$ g/mL) preparados con amortiguador de HEPES. Enseguida las células se incubaron por 15 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 400  $\mu$ L de 7-AAD (0,1  $\mu$ g/mL) preparado con amortiguador de HEPES.

Las muestras teñidas se leyeron en el citómetro de flujo FACSCanto II. Se adquirieron al menos 20 000 eventos provenientes de la región de células viables y se determinó la MFI del JC-1 en los canales de fluorescencia para las longitudes de onda de 529 nm y 590 nm. Los resultados obtenidos se analizaron con el software FlowJo V10. El esquema general de análisis se muestra en la Figura 12.



**Figura 12. Estrategia de análisis para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial.** a) La gráfica de tamaño (área) contra tamaño (amplitud) nos permitió discriminar los agregados celulares. b) A partir de las células no agregadas se realizó la gráfica de tamaño contra granularidad. c) De la población de células tumorales seleccionada en la gráfica b), se elaboró la gráfica de 7-AAD vs Anexina V para seleccionar a las células viables (7-AAD y Anexina V doble negativas). A partir de la población de células viables, se realizó la gráfica d) que relaciona las dos fluorescencias que emite JC-1 (roja vs verde) y se elaboró el histograma e) de la fluorescencia roja. Se calcularon la MFI roja (590 nm) y la MFI verde (529 nm) para cada población. El cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  es proporcional al potencial de membrana mitocondrial.



## Evaluación de la capacidad reductora celular utilizando alamarBlue por fluorimetría

La capacidad reductora celular se evaluó utilizando alamarBlue, un compuesto que al ser reducido por reductasas intracelulares (principalmente diaforasas) y la mitocondria, vira de azul índigo a su forma fluorescente rosa, que puede ser detectada a través de un fluorómetro (Figura 13). [3, 85, 95]



**Figura 13. Par óxido-reducción del alamarBlue.** La forma oxidada del alamarBlue (resazurina) vira a rosa (resorufina) al ser reducida intracelularmente por diaforasas y la mitocondria.

En este ensayo se utilizaron 5 000 células A-549 o 7 500 células Calu-1 totales por condición. Una vez transcurridas 45 horas de incubación, se agregó un volumen de alamarBlue equivalente al 10% de la suspensión celular o blanco y se continuó incubando hasta completar 48 h, tiempo al que se leyó la fluorescencia en un fluorómetro (excitación 544 nm, emisión 590 nm). Posteriormente, las células se sometieron al tratamiento con tripsina para desprenderlas y se lavaron con PBS 1X. Después se resuspendieron en PBS 1X y se determinó su número y su viabilidad mediante conteo en la cámara de Neubauer, utilizando la tinción con azul tripano. Finalmente se calculó la relación de fluorescencia por célula, de acuerdo a la ecuación 1.

$$\text{Fluorescencia por célula} = \frac{\text{Fluorescencia para cada condición}}{\text{Número de células para cada condición}} \dots 1)$$

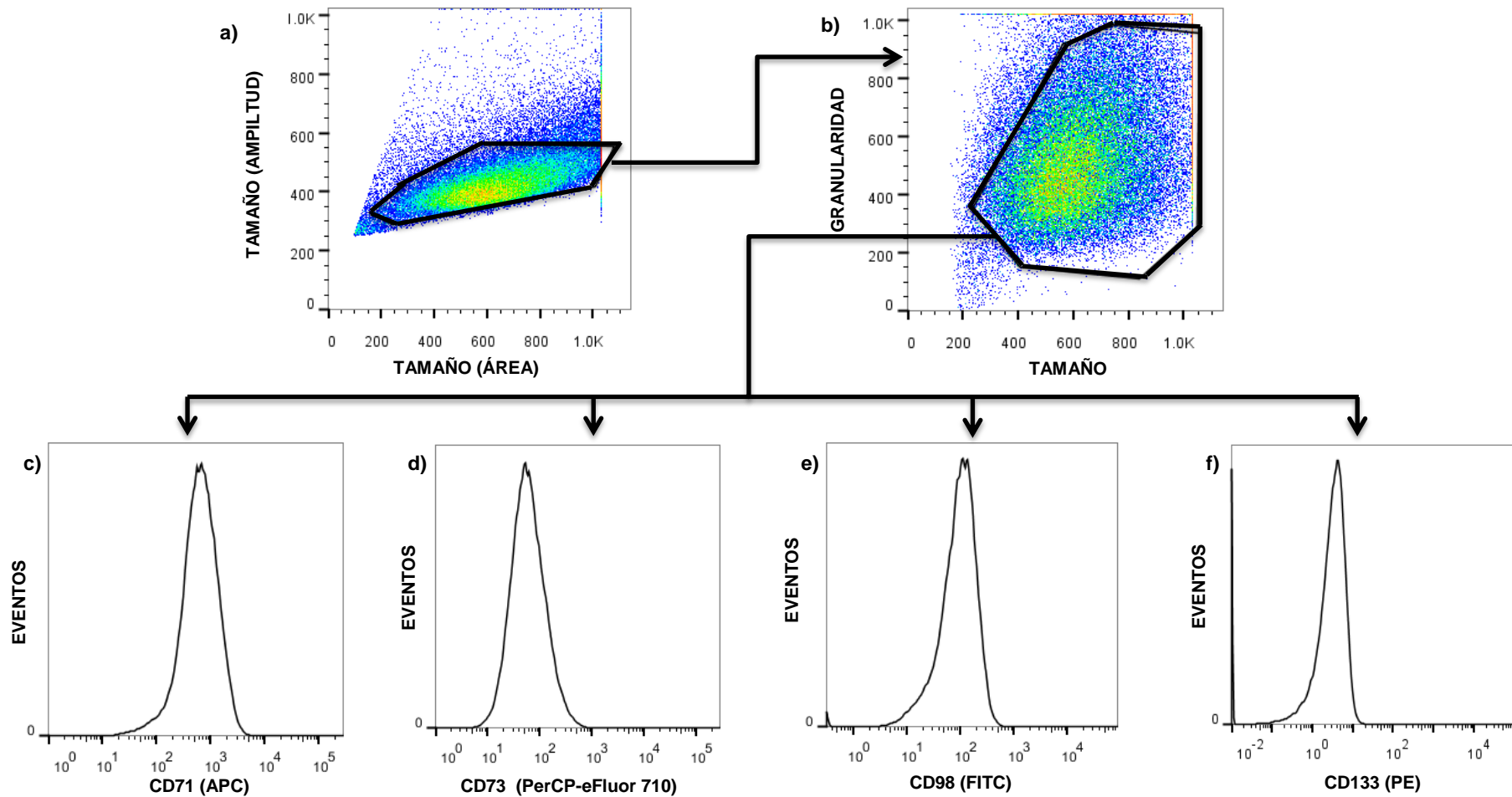


## **Evaluación de la expresión de los marcadores CD71, CD73, CD98 y CD133 por inmunofluorescencia y citometría de flujo**

La expresión de los marcadores involucrados en el metabolismo se evaluó realizando una inmunotinción de membrana, la cual se basa en el uso de anticuerpos marcados dirigidos contra los antígenos a estudiar. A mayor expresión del marcador, mayor unión antígeno-anticuerpo y mayor fluorescencia, es decir, una alta fluorescencia correlaciona directamente con una alta expresión del antígeno evaluado.

Para este ensayo se colocaron 100 000 células A-549 o 150 000 células Calu-1 totales por condición. Transcurridas las 48 horas de cultivo bajo las diferentes condiciones, se procedió a recolectar las células mediante el tratamiento con tripsina. Las células se lavaron con PBS con albúmina (1% p/v) y azida de sodio (0,1% p/v) y posteriormente se agregó la mezcla de los anticuerpos anti-CD71, anti-CD73, anti-CD98 y anti-CD133, de acuerdo a la técnica de Sharma *et al.* <sup>[112]</sup> Las células se incubaron con los anticuerpos a temperatura ambiente con agitación ligera durante 30 minutos. Finalmente se realizó un lavado y se fijó con paraformaldehído al 1% p/v.

Las muestras teñidas se leyeron en el citómetro de flujo FACSCanto II. Se adquirieron al menos 20 000 eventos provenientes de la región de células no agregadas o individuales y se determinó la MFI de las marcas fluorescentes correspondientes a cada anticuerpo. Los resultados obtenidos se analizaron con el software FlowJo V10. El esquema general de análisis se muestra en la Figura 14.



**Figura 14. Estrategia de análisis para la evaluación de la expresión de los marcadores involucrados en el metabolismo.**

a) La gráfica de tamaño (área) contra tamaño (amplitud) nos permitió discriminar los agregados. b) A partir de las células individuales se realizó la gráfica de tamaño contra granularidad. c) De la población de células tumorales seleccionada en la gráfica b), se realizaron los histogramas correspondientes a la fluorescencia de cada marcador: a) = CD71 (APC), b) = CD73 (PerCP-eFluor 710), c) = CD98 (FITC) y d) = CD133 (PE). A partir de los histogramas correspondientes a las células positivas, se calculó la MFI, la cual es directamente proporcional a la expresión de cada molécula.



## Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5. Para determinar si había diferencia significativa entre las diferentes condiciones de cultivo se utilizó ANOVA de una vía. Las pruebas post hoc que se emplearon fueron:

- Prueba de Dunnett para comparar la masa mitocondrial y la viabilidad celular. Todas las condiciones de cultivo se compararon contra las células cultivadas en medio con glucosa, pH 7,2 y normoxia (control).
- Prueba de Bonferroni para comparar potencial de membrana mitocondrial, capacidad reductora celular y la expresión de los marcadores involucrados en el metabolismo energético. Las comparaciones se realizaron entre todas las condiciones de cultivo.

Se consideró una  $p < 0,05$  como diferencia estadísticamente significativa.

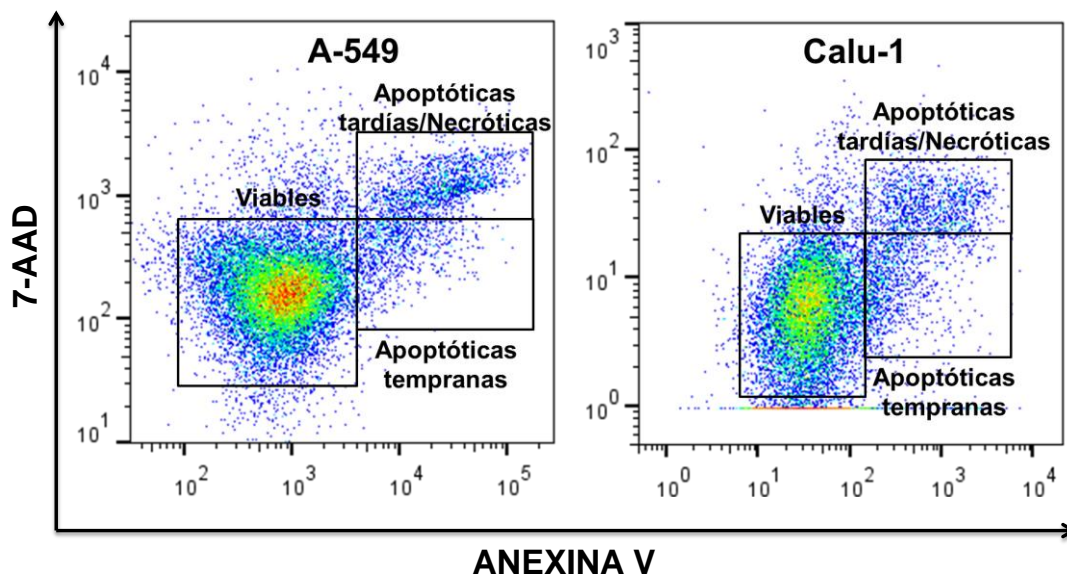




## Resultados

### Las líneas celulares de carcinoma pulmonar mostraron diferente susceptibilidad a los cambios de fuente de carbono, pH y tensión de oxígeno

Estudios previos han demostrado que la hipoxia puede inducir apoptosis en las células tumorales y que la acidosis láctica también puede afectar la viabilidad. [47, 78, 117] Para determinar si nuestras condiciones de cultivo (glucosa o lactato, pH 6,2 o 7,2 e hipoxia o normoxia) estaban modificando la viabilidad de las células de carcinoma pulmonar se utilizó el método de determinación de apoptosis por marcaje con Anexina V y 7-AAD, empleando citometría de flujo (Figura 15). Además, se tomaron microfotografías de las células a las 48 horas de cultivo en cada condición (Figura 16).



**Figura 15. Esquema representativo del análisis de viabilidad de las líneas de carcinoma pulmonar.** Se presenta el análisis de un experimento representativo de cada línea celular cultivada en medio con glucosa a pH 7,2 y normoxia. Se utilizó el método de determinación de apoptosis por marcaje con Anexina V y 7-AAD y se evaluó mediante citometría de flujo. Células viables (Anexina V y 7-AAD negativas), células apoptóticas tempranas (Anexina V positivas y 7-AAD negativas), células apoptóticas tardías o necróticas (Anexina V y 7-AAD positivas).

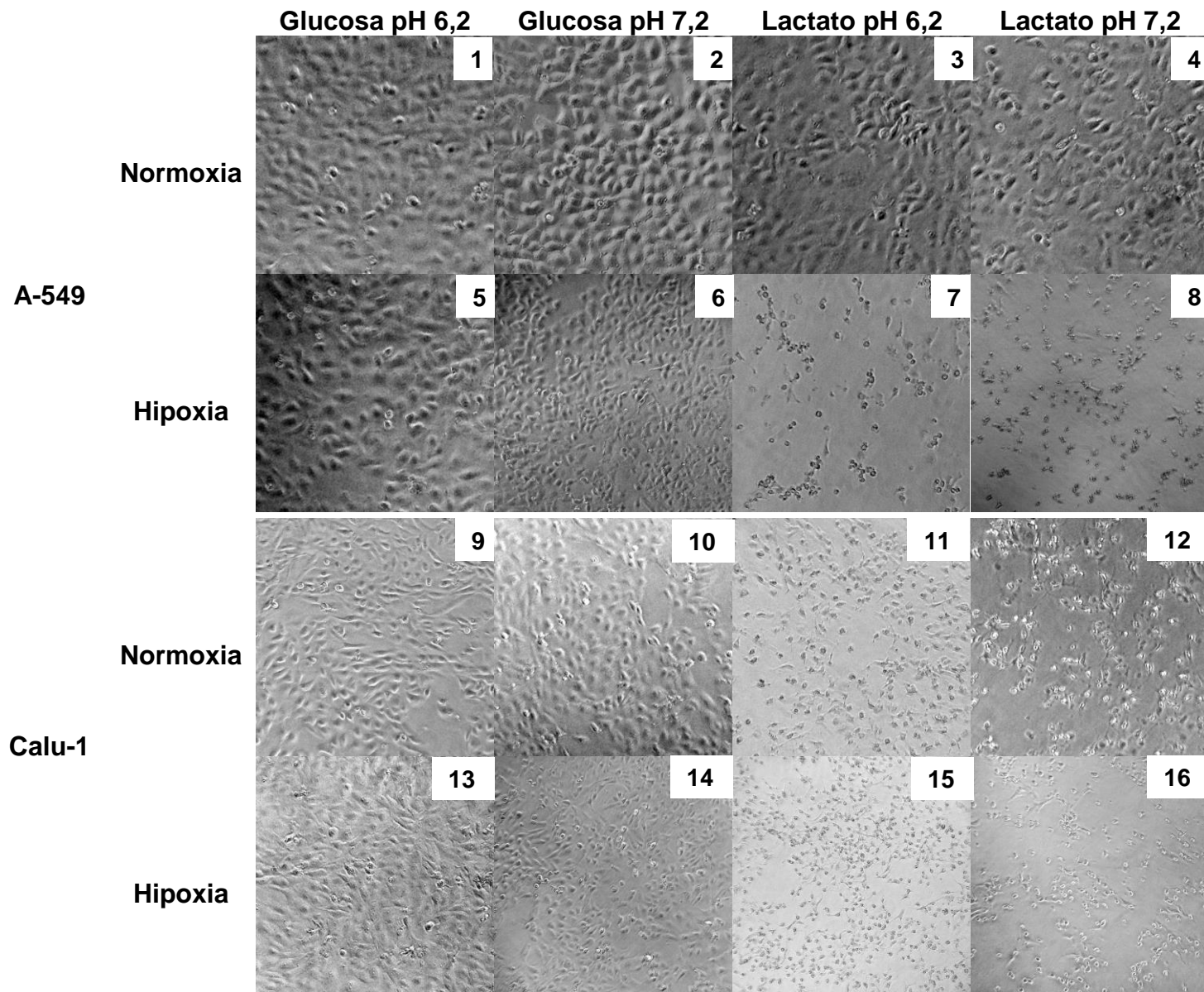


En la línea celular A-549, sólo el lactato (lactosis) en combinación con la baja tensión de oxígeno (hipoxia) produjo alteraciones en la morfología de las células. En estas condiciones se observaron células redondas y algunas ligeramente alargadas, ambas de menor tamaño en comparación con las células del resto de las condiciones de cultivo. Además, la proliferación de las células cultivadas en lactosis hipóxica fue menor que la del resto de las células (Figura 16, microfotografías 7 y 8).

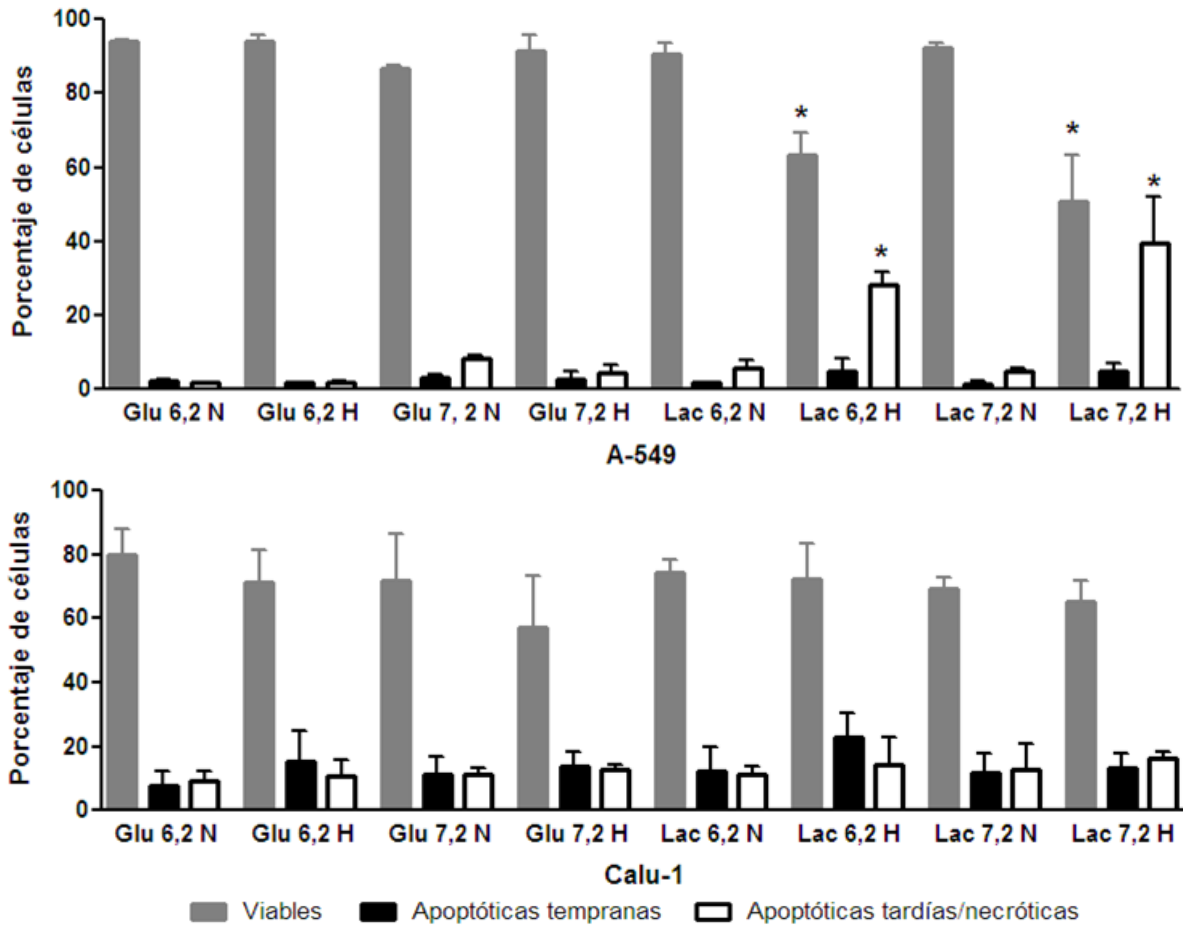
La viabilidad de las células A-549 al cultivarlas en el medio con glucosa, pH 7,2 y normoxia (condiciones control) fue de  $86 \pm 1\%$  (Figura 16, microfotografía 2 y Figura 17). En las células cultivadas en lactosis e hipoxia, la viabilidad disminuyó a  $63 \pm 6\%$  en pH 6,2 y a  $51 \pm 13\%$  en pH 7,2 ( $p < 0,05$ ). El porcentaje de apoptosis tardía o necrosis en las células cultivadas en lactosis hipóxica incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ), siendo de  $28 \pm 4\%$  en pH 6,2 y  $40 \pm 12\%$  en pH 7,2 (Figura 17). En el resto de las condiciones de cultivo el porcentaje de viabilidad se mantuvo alrededor del 90%, sin encontrarse diferencias significativas respecto al control (Figura 17).

En la línea celular Calu-1, cuando el lactato fue la fuente de carbono se observaron células redondas con prolongaciones en los extremos. El tamaño y la proliferación de dichas células fueron menores a los de las células cultivadas en el resto de las condiciones (Figura 16, microfotografías 11, 12, 15 y 16). Además, el análisis por citometría de flujo mostró que las células cultivadas en un pH ácido tenían un menor tamaño pero una mayor granularidad que las células cultivadas en pH neutro (Experimento representativo en la Figura 18).

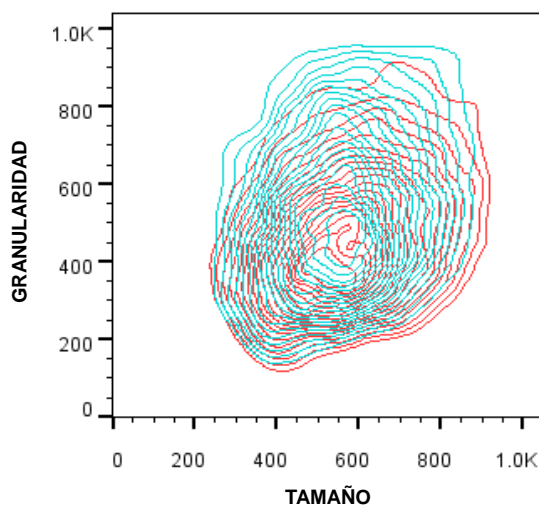
La viabilidad de la línea celular Calu-1 cultivada en medio con glucosa, pH 7,2 y normoxia fue de  $72 \pm 14\%$  (Figura 16, microfotografía 10 y Figura 17). Ninguno de los cambios en fuente de carbono, pH y tensión de oxígeno modificó significativamente la viabilidad celular (Figura 17).



**Figura 16. Microfotografías de las líneas celulares de carcinoma pulmonar en las diferentes condiciones de cultivo.** Las células A-549 y Calu-1 se cultivaron en diferente fuente carbono, pH y tensión de oxígeno durante 48 h. Se muestran las microfotografías de un experimento representativo. Aumento: 10X



**Figura 17. Porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas y apoptóticas tardías/necróticas en las líneas celulares de carcinoma pulmonar cultivadas bajo diferentes condiciones durante 48 horas.** Las barras representan los valores promedio con la desviación estándar de dos cultivos independientes para la línea A-549 y tres para la línea Calu-1 (\*,  $p < 0,05$  vs Glu 7,2 N). Glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 6,2 (6,2), pH 7,2 (7,2), normoxia (N), hipoxia (H).

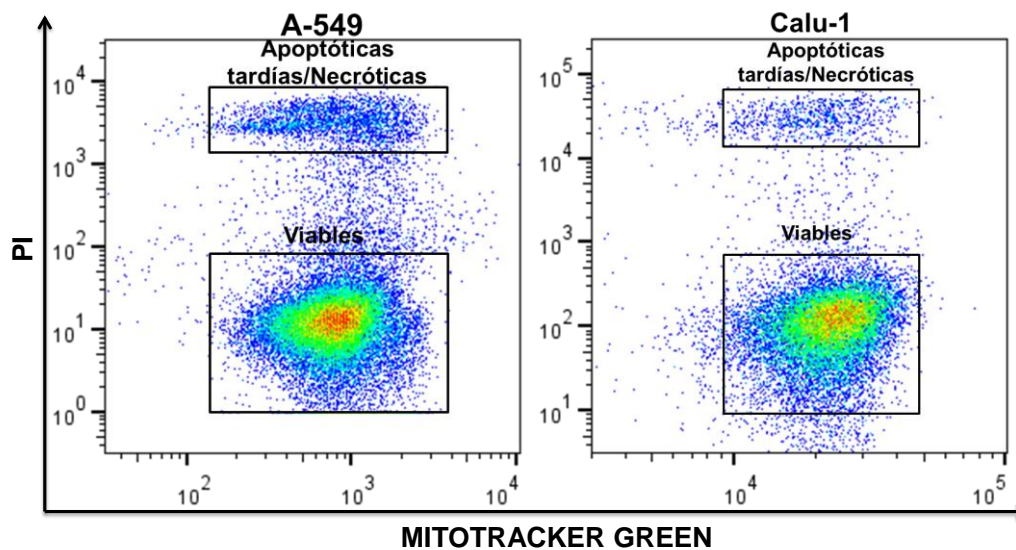


**Figura 18. Efecto del pH sobre el tamaño y la granularidad de la línea celular Calu-1.** Se muestran la gráficas de contornos de las células cultivadas en medio con glucosa en normoxia (pH 6,2 ■ y 7,2 ■) durante 48 horas. Las gráficas representan la distribución de las poblaciones celulares respecto al tamaño y a la granularidad.



## En lactosis neutra se observó una disminución de la masa mitocondrial en las líneas de carcinoma pulmonar

En varios tipos de cáncer se han detectado alteraciones en la masa mitocondrial celular y recientemente, se ha propuesto que de acuerdo a las condiciones microambientales, algunos tipos de células tumorales pueden usar el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. [20, 76, 82, 116] Por lo anterior, se decidió determinar la masa mitocondrial de las líneas A-549 y Calu-1 cultivadas bajo las distintas condiciones de estrés durante 48 horas. Mediante la tinción con yoduro de propidio, las células viables se discriminaron de las células apoptóticas tardías o necróticas (Figura 19) y la masa mitocondrial se determinó mediante la tinción con MitoTracker Green, empleando citometría de flujo.



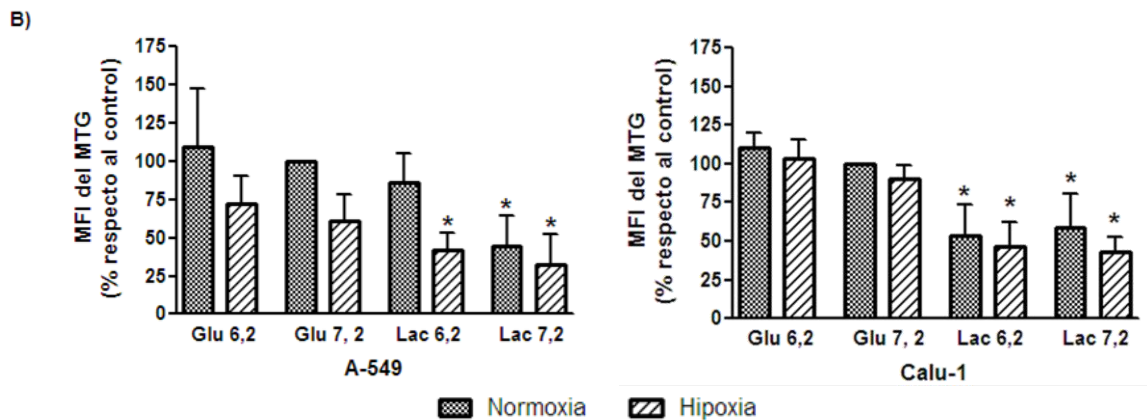
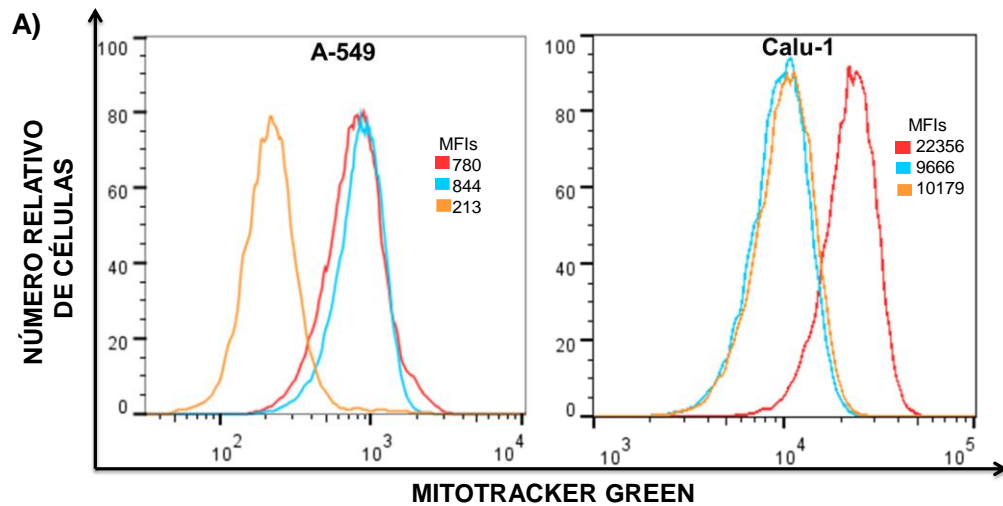
**Figura 19. Esquema representativo de la selección de células viables para la determinación de masa mitocondrial en las líneas de carcinoma pulmonar.** Se presenta el análisis de un experimento representativo de cada línea celular cultivada en medio con glucosa, pH 7,2 y normoxia durante 48 horas. Las células se tiñeron con yoduro de propidio (PI) y MitoTracker Green y se analizaron mediante citometría de flujo. Células viables (PI negativas), células apoptóticas tardías o necróticas (PI positivas).

La masa mitocondrial de la línea celular A-549 disminuyó significativamente ( $p < 0,05$  vs control) en las condiciones en que se cultivó con lactato, excepto cuando se cultivaron en acidosis láctica y normoxia ( $87 \pm 19\%$ ). Las células cultivadas en medio



con lactato a pH 7,2 e hipoxia presentaron la mayor disminución en el porcentaje de masa mitocondrial ( $26 \pm 8\%$ ). Además, las células A-549 mostraron una tendencia a disminuir la masa mitocondrial en hipoxia y en pH 7,2 respecto a sus contrapartes normóxica y ácida, respectivamente (Figura 20).

Las células de la línea celular Calu-1 cultivadas en lactosis disminuyeron su masa mitocondrial respecto al control ( $p < 0,05$ ). La disminución del porcentaje de masa mitocondrial de dichas células varió en un rango del 43% al 58%. Al igual que en la línea celular A-549, las células cultivadas en la condición de lactosis pH 7,2 e hipoxia presentaron la mayor disminución en el porcentaje de masa mitocondrial ( $43 \pm 10\%$ ). En las células Calu-1 también se presentó una tendencia a disminuir la masa mitocondrial en hipoxia; sin embargo, la tendencia fue menos pronunciada que en las células A-549 (Figura 20).



**Figura 20. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la masa mitocondrial de las líneas celulares de carcinoma pulmonar.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. La masa mitocondrial se determinó utilizando Mitotracker Green (MTG). **A)** Histogramas de un experimento representativo de cada línea celular **B)** Intensidad media de fluorescencia (MFI) del MTG representado como porcentaje respecto al control (Glu 7,2 normoxia). Las barras representan los valores promedio con la desviación estándar de tres cultivos independientes para ambas líneas celulares. (\*,  $p < 0,05$  vs Glu 7,2 normoxia). Glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 6,2 (6,2), pH 7,2 (7,2).



## **El potencial de membrana mitocondrial presentó un comportamiento diferente en cada línea celular**

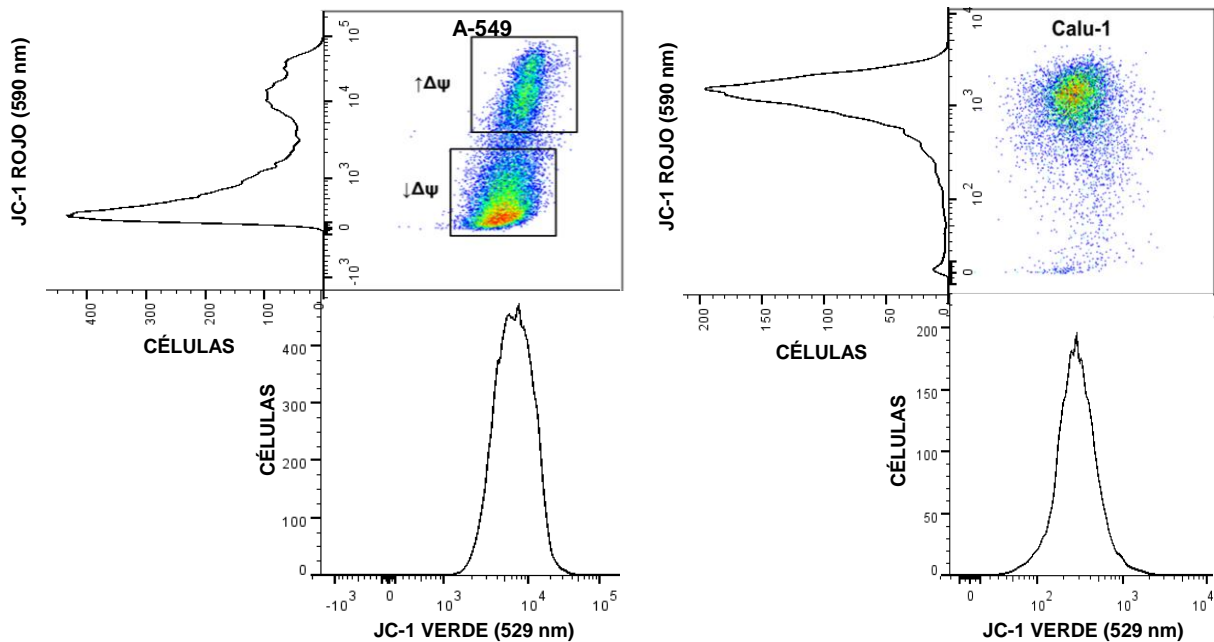
En varios carcinomas se ha observado un potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) elevado en comparación con células epiteliales normales, proponiéndose que este  $\Delta\psi_m$  elevado se debe a una menor actividad de la fosforilación oxidativa. [27, 77, 119]

Sabiendo que la masa mitocondrial de las líneas celulares de carcinoma pulmonar puede ser modificada por las condiciones de cultivo, fue importante saber si el  $\Delta\psi_m$  también se modificaría como respuesta al microambiente. Para descartar que los cambios observados fueran debidos a las células muertas, se empleó la técnica de determinación de apoptosis por marcaje con Anexina V y 7-AAD, descrita anteriormente (página 34). Por lo anterior, el análisis del  $\Delta\psi_m$  se realizó únicamente en las células viables.

El  $\Delta\psi_m$  se determinó mediante tinción con JC-1 y citometría de flujo. El  $\Delta\psi_m$  mitocondrial es directamente proporcional al cociente de la intensidad media de las fluorescencias emitidas por el JC-1 en las longitudes de onda roja (590 nm) y verde (529 nm) (cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$ ).

Una observación interesante fue que mientras en la línea celular Calu-1 el valor del cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  fue homogéneo en toda la población, las células A-549 presentaron dos poblaciones con diferente potencial: una con un cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  bajo ( $\downarrow\Delta\psi_m$ ) y otras con un  $MFI_{590}/MFI_{529}$  alto ( $\uparrow\Delta\psi_m$ ) (Figura 21).



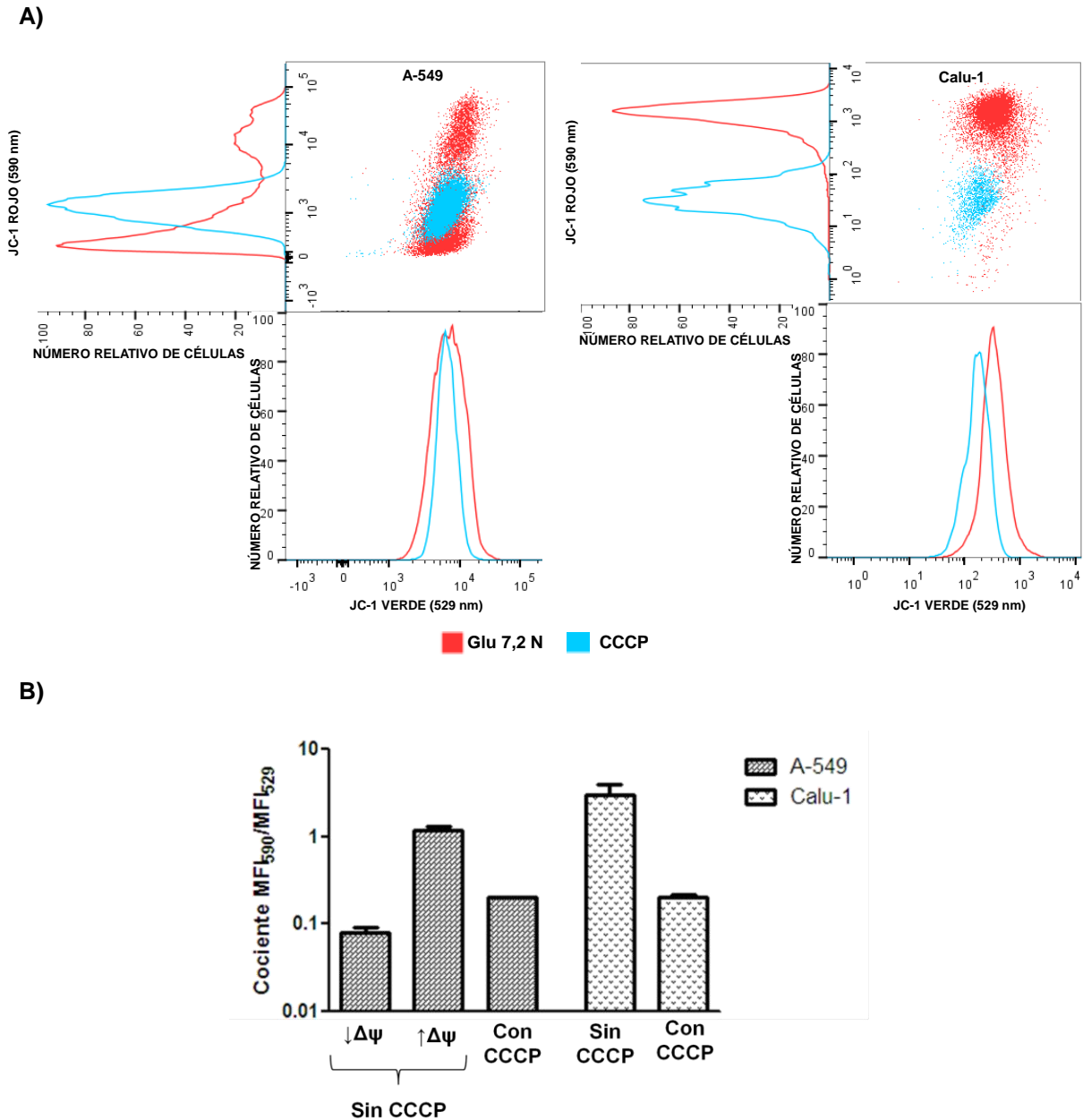


**Figura 21. Potencial de membrana mitocondrial de las líneas celulares de carcinoma pulmonar.**

Se muestra un experimento representativo de cada línea celular cultivada en medio con glucosa a pH 7,2 y normoxia durante 48 horas. El potencial se determinó únicamente en las células viables utilizando JC-1 y citometría de flujo. Se presentan los gráficos de fluorescencia verde (529 nm) vs fluorescencia roja (590 nm), así como los histogramas de las fluorescencias individuales.  $\downarrow\Delta\psi$  = Bajo potencial,  $\uparrow\Delta\psi$  = Alto potencial.

Para comprobar que bajo nuestras condiciones experimentales era posible detectar cambios en el  $\Delta\psi_m$  y que nuestras líneas celulares eran sensibles al tratamiento con disruptores del  $\Delta\psi_m$ , se empleó el carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP). La CCCP es un ácido débil que abate el  $\Delta\psi_m$ .

En la línea celular A-549, el tratamiento con CCCP dio lugar a una sola población (Figura 22 A) con un cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  de 0,200 (Figura 22 B). En la línea celular Calu-1, la CCCP disminuyó el  $\Delta\psi_m$  (Figura 22 A), siendo el cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  similar al de la línea celular A-549 (cociente  $MFI_{590}/MFI_{529} = 0,201$ ) (Figura 22 B).



**Figura 22. Potencial de membrana mitocondrial de las líneas celulares de carcinoma pulmonar tratadas con y sin CCCP.** Las líneas celulares se cultivaron en medio con glucosa a pH 7,2 y en normoxia. Después de 48 horas, las células correspondientes se trataron con CCCP como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. El potencial se determinó solamente en las células viables, utilizando JC-1 y citometría de flujo. Los cocientes  $MFI_{590}/MFI_{529}$  se calcularon dividiendo la intensidad media de la fluorescencia (MFI) emitida por el JC-1 en la longitud de onda roja (590 nm) entre la MFI emitida en la longitud de onda verde (529 nm). **A)** Gráficos representativos de fluorescencia verde (529 nm) vs fluorescencia roja (590 nm) e histogramas de las fluorescencias individuales. **B)** Cocientes  $MFI_{590}/MFI_{529}$  (Escala logarítmica). Las barras representan los valores promedio con la desviación estándar de dos cultivos independientes para la línea A-549 y tres para la línea Calu-1. Glucosa (Glu), pH 7,2 (7,2), normoxia (N),  $\downarrow\Delta\psi$  = Bajo potencial,  $\uparrow\Delta\psi$  = Alto potencial.

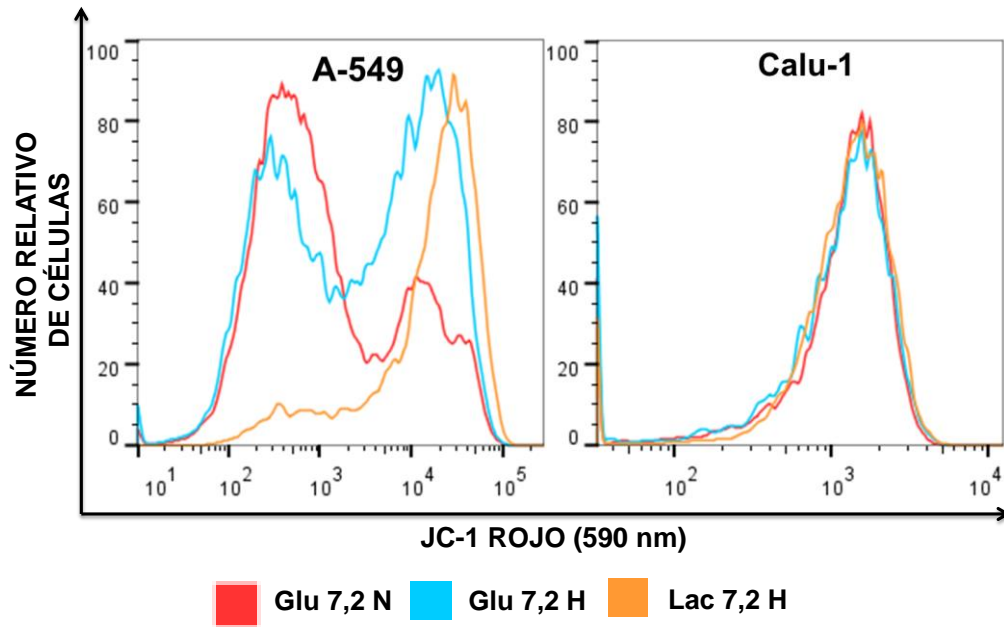


## **El potencial de membrana mitocondrial de la línea celular A-549 presentó una mayor susceptibilidad ante los cambios en el microambiente que la línea celular Calu-1**

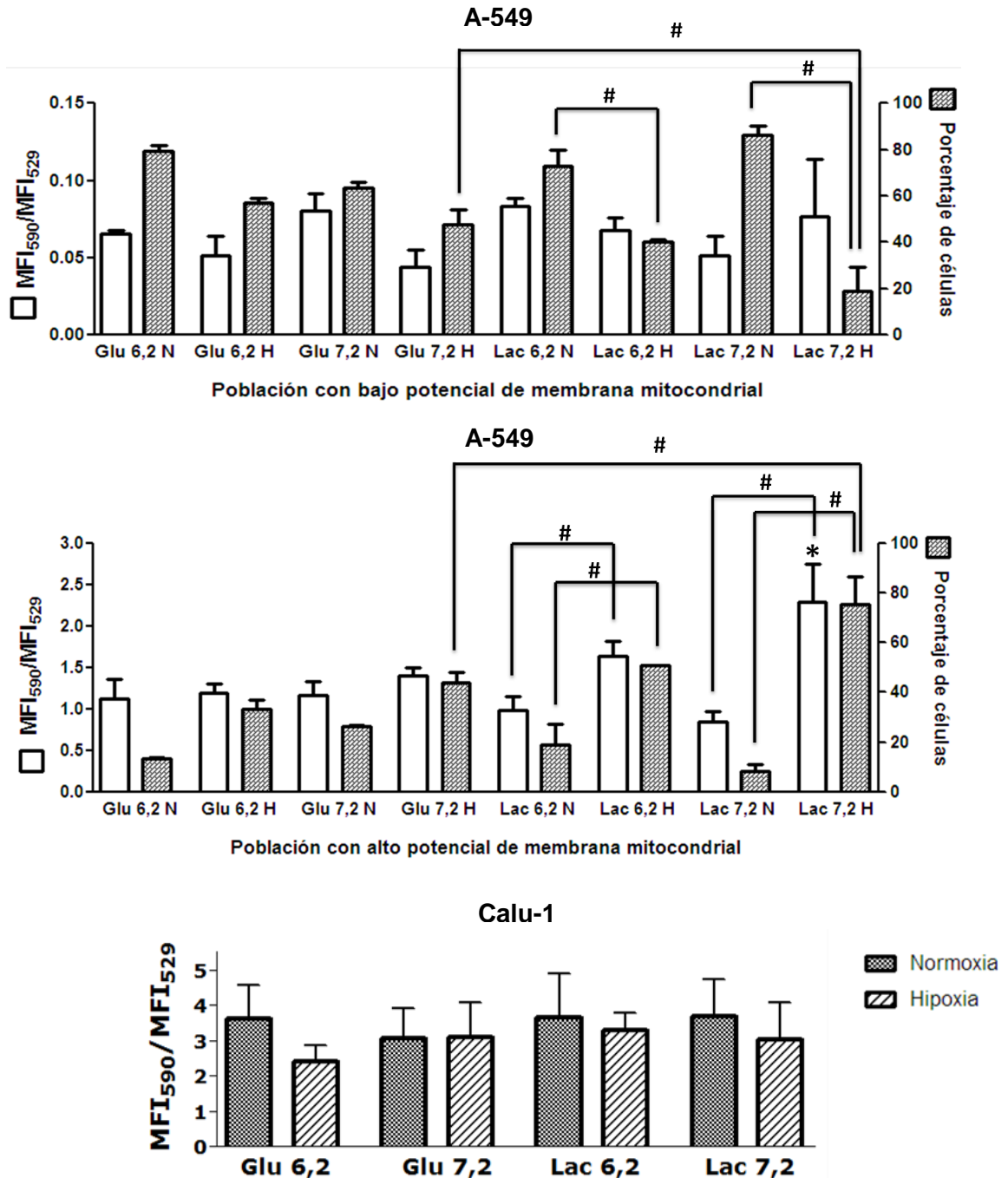
Las células A-549 presentaron dos poblaciones con bajo y alto  $\Delta\psi_m$ , independientemente de la fuente de carbono, el pH o la tensión de oxígeno. En la población con bajo  $\Delta\psi_m$ , el cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  no cambió significativamente al modificar las condiciones de cultivo, lo que indica que el  $\Delta\psi_m$  de esta población se mantuvo constante. En la población con alto  $\Delta\psi_m$ , las células cultivadas con lactato e hipoxia incrementaron su cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  en comparación con sus contrapartes normóxicas ( $p < 0,05$ ). El cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  de las células cultivadas en lactosis normóxica fue de  $0,98 \pm 0,17$  a pH 6,2 y de  $0,84 \pm 0,13$  a pH 7,2; mientras que el de las células cultivadas en lactosis hipóxica fue de  $1,64 \pm 0,18$  a pH 6,2 y de  $2,29 \pm 0,46$  a pH 7,2 (Figuras 23 y 24 A).

La distribución de las células A-549 con bajo y alto cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  ( $\downarrow\Delta\psi_m$  y  $\uparrow\Delta\psi_m$ ) se modificó de acuerdo a las condiciones de cultivo. El porcentaje de células con alto potencial se incrementó en todas las condiciones hipóxicas respecto a sus contrapartes normóxicas; sin embargo, el incremento sólo fue significativo cuando se utilizó lactato como fuente de carbono. El porcentaje de células en lactosis normóxica con  $\uparrow\Delta\psi_m$  fue de  $19 \pm 8\%$  a pH 6,2 y  $8 \pm 3\%$  a pH 7,2; mientras que el porcentaje de células en lactosis hipóxica con  $\uparrow\Delta\psi_m$  fue de  $51 \pm 0,3\%$  a pH 6,2 y  $76 \pm 11\%$  a pH 7,2 (Figura 24 A). En particular, el incremento en el porcentaje de células con alto potencial en la condición lactosis, pH 7,2 e hipoxia fue significativo en comparación con el resto de las condiciones de cultivo, que oscilaron entre el 8% y el 51% de células con  $\uparrow\Delta\psi_m$  (Figura 24 A).

La línea celular Calu-1 no mostró diferencias significativas en el cociente  $MFI_{590}/MFI_{529}$  en ninguna de las condiciones de cultivo, indicando que el  $\Delta\psi_m$  de esta línea celular no fue susceptible ante los cambios en la fuente de carbono, pH o tensión de oxígeno (Figuras 23 y 24 B).



**Figura 23. Histogramas de fluorescencia roja representativos del análisis de potencial de membrana mitocondrial en las líneas celulares de carcinoma pulmonar.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. El potencial de las células viables se determinó mediante tinción con JC-1 y citometría de flujo. Glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 7,2 (7,2), normoxia (N), hipoxia (H)



**Figura 24. Efecto de las condiciones de las condiciones de cultivo sobre el potencial de membrana mitocondrial de las líneas celulares de carcinoma pulmonar.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. El potencial de membrana mitocondrial de la población de células viables se determinó utilizando JC-1. Los cocientes  $MFI_{590}/MFI_{529}$  se calcularon dividiendo la intensidad media de la fluorescencia (MFI) emitida por el JC-1 en la longitud de onda roja (590 nm) entre la MFI emitida en la longitud de onda verde (529 nm). Las barras representan los valores promedio con la desviación estándar de dos cultivos independientes para la línea A-549 y tres para la línea Calu-1. (#,  $p < 0,05$  para la comparación indicada; \*,  $p < 0,05$  vs el resto de las condiciones de cultivo) Glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 6,2 (6,2), pH 7,2 (7,2), normoxia (N), hipoxia (H).



## **Las líneas celulares de carcinoma pulmonar cultivadas con glucosa e hipoxia mostraron una tendencia a incrementar su capacidad reductora celular**

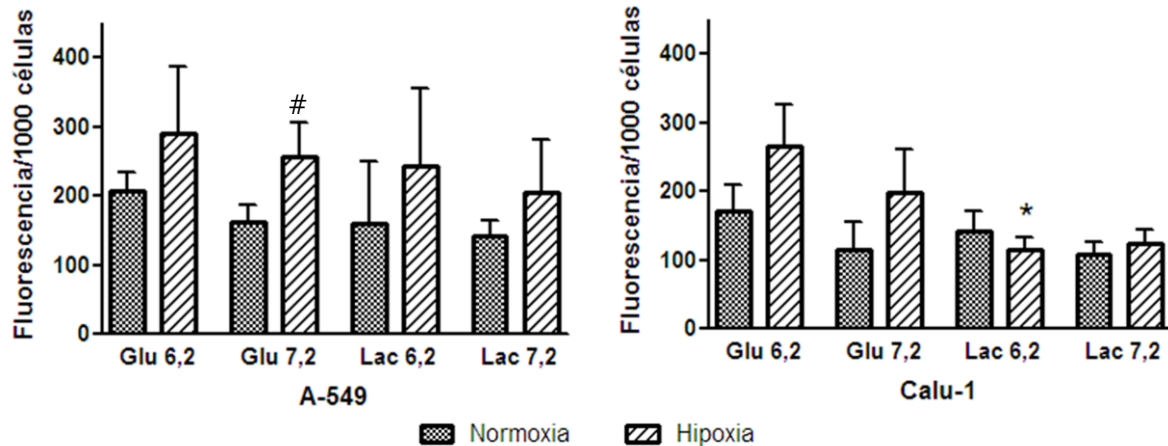
En las células tumorales se ha observado una glicólisis incrementada, baja actividad de la fosforilación oxidativa y alta actividad de la vía de las pentosas fosfato, por lo que se esperaría la acumulación intracelular de NADH y NADPH (aumento de la capacidad reductora celular respecto a células normales). Sin embargo, si las células malignas son capaces de cambiar su metabolismo de acuerdo a las condiciones de cultivo, se esperaría que la capacidad reductora también se modificara en función de las condiciones de cultivo. Por lo anterior, evaluamos la capacidad reductora de las líneas de carcinoma pulmonar al modificar las condiciones de cultivo, la fuente de carbono, el pH y la tensión de oxígeno. A las 48 horas de cultivo se evaluó la capacidad reductora celular mediante el ensayo del alamarBlue y fluorimetría. La fluorescencia del alamarBlue por célula es directamente proporcional a la capacidad reductora celular. Para el análisis estadístico, se utilizó la relación de fluorescencia por 1000 células (F/1000).

En la línea celular A-549, no hubo diferencia significativa en la relación F/1000 entre las diferentes condiciones de cultivo analizadas, lo que indica que la capacidad reductora de las células fue similar en todos los cultivos. Sin embargo, se observa una tendencia en la que la capacidad reductora celular en condiciones hipóxicas aumenta respecto a sus contrapartes normóxicas (Figura 25).

En la línea celular Calu-1, no hubo diferencia significativa en la F/1000 entre las diferentes condiciones de cultivo en normoxia, lo que indica que la capacidad reductora de las células fue similar entre los cultivos en normoxia. Sin embargo, entre los cultivos en hipoxia, la F/1000 de las células cultivadas con lactato fue menor que la de las células cultivadas con glucosa ( $p < 0,05$  entre las células cultivadas con lactato y las células cultivadas con glucosa a pH 6,2) (Figura 25). Lo anterior indica que la capacidad reductora de las células Calu-1 cultivadas con lactato es



independiente de la tensión de oxígeno, mientras que en las células cultivadas con glucosa la capacidad reductora aumenta a bajas tensiones de oxígeno.



**Figura 25. Efecto de las condiciones de las condiciones de cultivo sobre la capacidad reductora de las líneas celulares de carcinoma pulmonar.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. La capacidad reductora se determinó mediante el ensayo del alamarBlue. En el eje y se grafica la fluorescencia emitida por 1000 células viables. Las barras representan los valores promedio con la desviación estándar de cuatro cultivos independientes para la línea A-549 y tres para la línea Calu-1. (#,  $p < 0,05$  vs Glu 7,2 normoxia \*,  $p < 0,05$  vs Glu 6,2 hipoxia) Glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 6,2 (6,2), pH 7,2 (7,2), normoxia (N), hipoxia (H)

## Expresión de los marcadores de membrana involucrados en el metabolismo energético

El metabolismo celular está estrechamente relacionado con la expresión de proteínas de membrana con funciones enzimáticas y de transporte (marcadores de metabolismo). La expresión de estas moléculas da un panorama general del metabolismo que opera en las células. En este estudio se evaluó la expresión de las proteínas CD71 (receptor de transferrina asociado al metabolismo del hierro), CD73 (ecto-5'-nucleotidasa asociada al metabolismo energético), CD98 (transportador de aminoácidos) y CD133 (marcador de células madre asociado a hipoxia tumoral) en las células de carcinoma pulmonar expuestas a las distintas condiciones de cultivo durante 48 horas. La evaluación se realizó mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo. La intensidad media de la fluorescencia (MFI) debida a la marca fluorescente de cada anticuerpo es directamente proporcional a la expresión del marcador correspondiente.



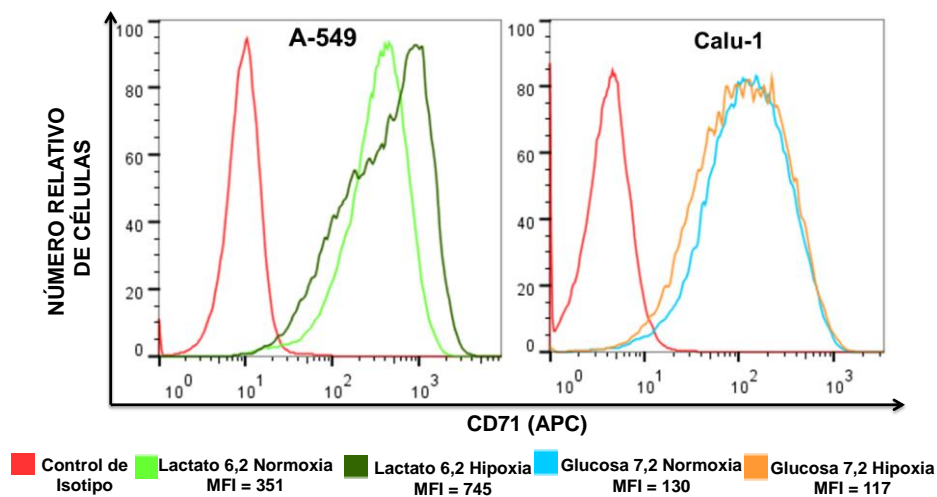
Los resultados de los marcadores CD71, CD73 y CD98 se muestran en los siguientes apartados. Ninguna de las líneas de carcinoma pulmonar expresó la proteína CD133 (Datos no mostrados).

### ***Las células A-549 cultivadas en acidosis láctica e hipoxia incrementaron la expresión del receptor de transferrina CD71***

En los cultivos con glucosa, pH 7,2 y normoxia, el  $97 \pm 0,5\%$  de las células A-549 y el  $90 \pm 9\%$  de las células Calu-1 expresaron el receptor de transferrina CD71 (células CD71+). Al modificar las condiciones de cultivo, el porcentaje de células CD71+ no cambió significativamente en ninguna de las líneas celulares de carcinoma pulmonar (Figura 27).

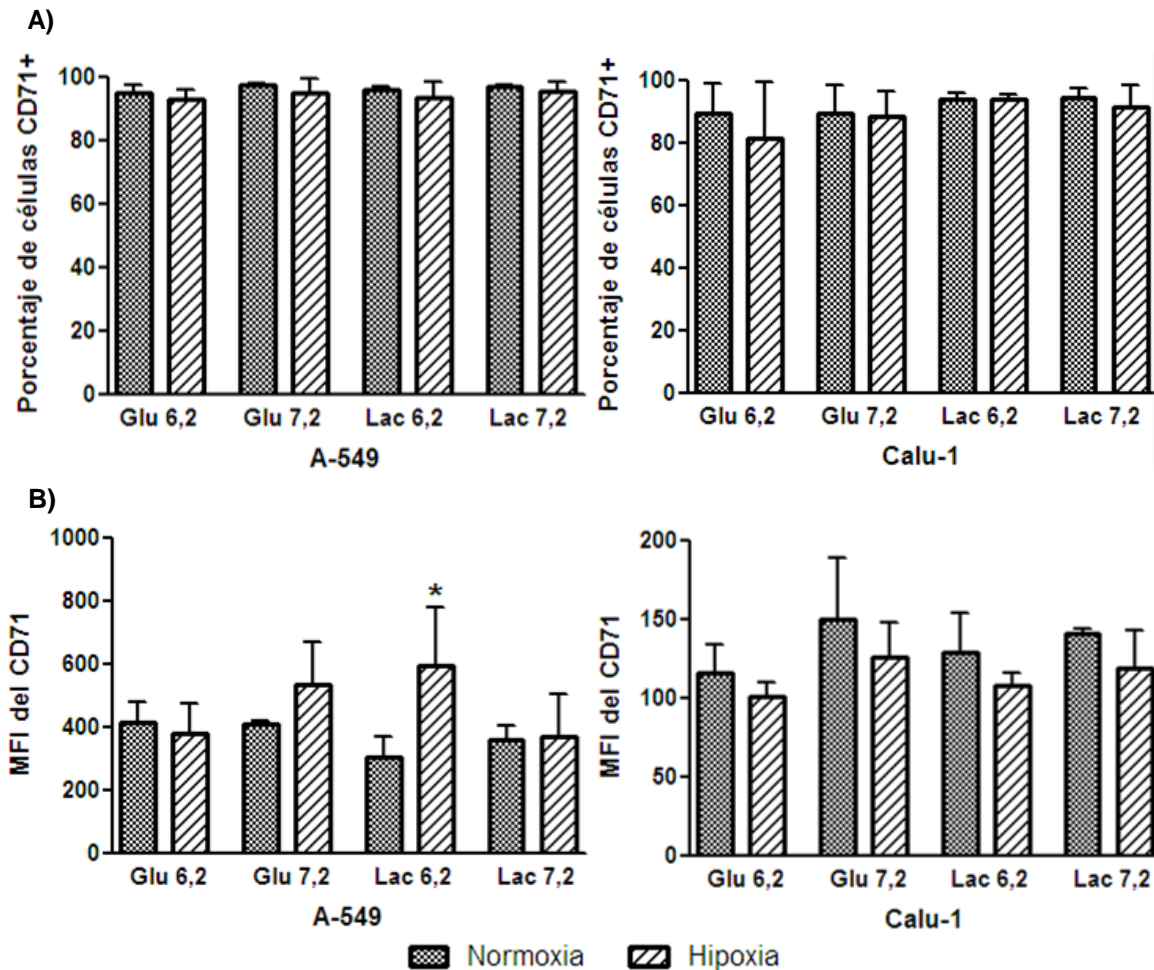
Las células A-549 CD71+ cultivadas en acidosis láctica e hipoxia mostraron una mayor MFI ( $\overline{MFI} = 613 \pm 187$ ) que en normoxia ( $\overline{MFI} = 307 \pm 63$ ) ( $p < 0,05$ ), lo que indica una mayor expresión del receptor de transferrina en las células cultivadas en acidosis láctica e hipoxia (Figuras 26 y 27).

En la línea celular Calu-1, ninguna de las condiciones de cultivo modificó significativamente la MFI, lo que indica que la expresión del receptor CD71 en esta línea celular no fue susceptible a los cambios en las condiciones de cultivo (Figuras 26 y 27).



**Figura 26. Histogramas representativos de la expresión del receptor de transferrina CD71 en las líneas de carcinoma pulmonar bajo las distintas condiciones de cultivo.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. La expresión del receptor de transferrina se evaluó mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-CD71 marcado con APC y citometría de flujo.





**Figura 27. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la expresión del receptor de transferrina CD71 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. **A)** Porcentaje de células que expresaron el receptor CD71 (células CD71+) **B)** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células CD71+. Las barras representan los valores promedio con la desviación estándar de dos cultivos independientes para la línea A-549 y tres para la línea Calu-1. (\*,  $p < 0,05$  vs Lac 6,2 normoxia). Glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 6,2 (6,2), pH 7,2 (7,2)

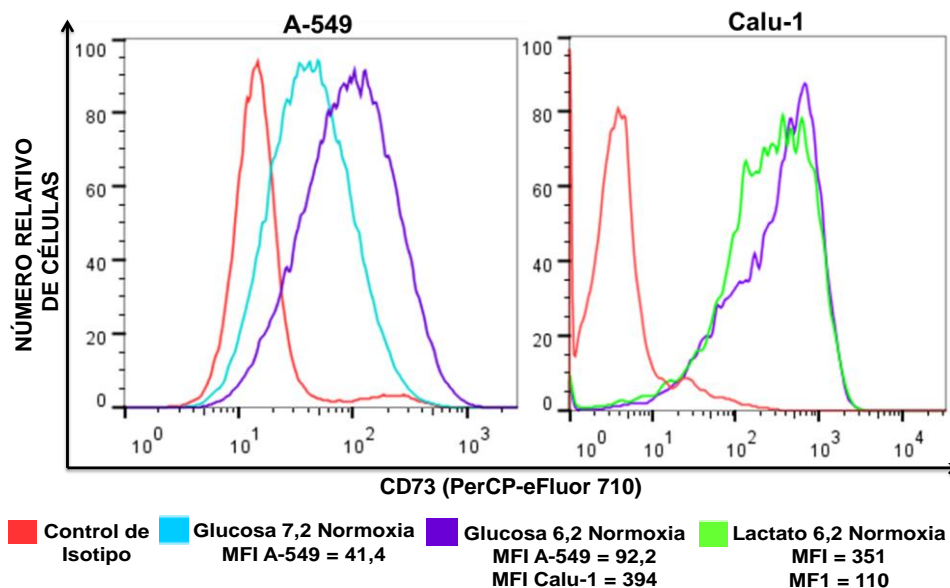
### ***Las células Calu-1 cultivadas con lactato disminuyeron la expresión de la ecto-5'-nucleotidasa CD73***

En el cultivo con glucosa, pH 7,2 y normoxia, el  $53 \pm 13\%$  de las células A-549 expresó la ecto-5'-nucleotidasa CD73. Al modificar las condiciones de cultivo, el porcentaje de células A-549 CD73+ tendió a incrementar con la acidosis; sin embargo, el incremento sólo fue significativo para las células cultivadas en medio con glucosa, pH 6,2 y normoxia ( $70 \pm 13\%$ ), respecto a las células cultivadas con glucosa a pH 7,2 y normoxia ( $p < 0,05$ ) (Figura 29). En las células cultivadas en acidosis,

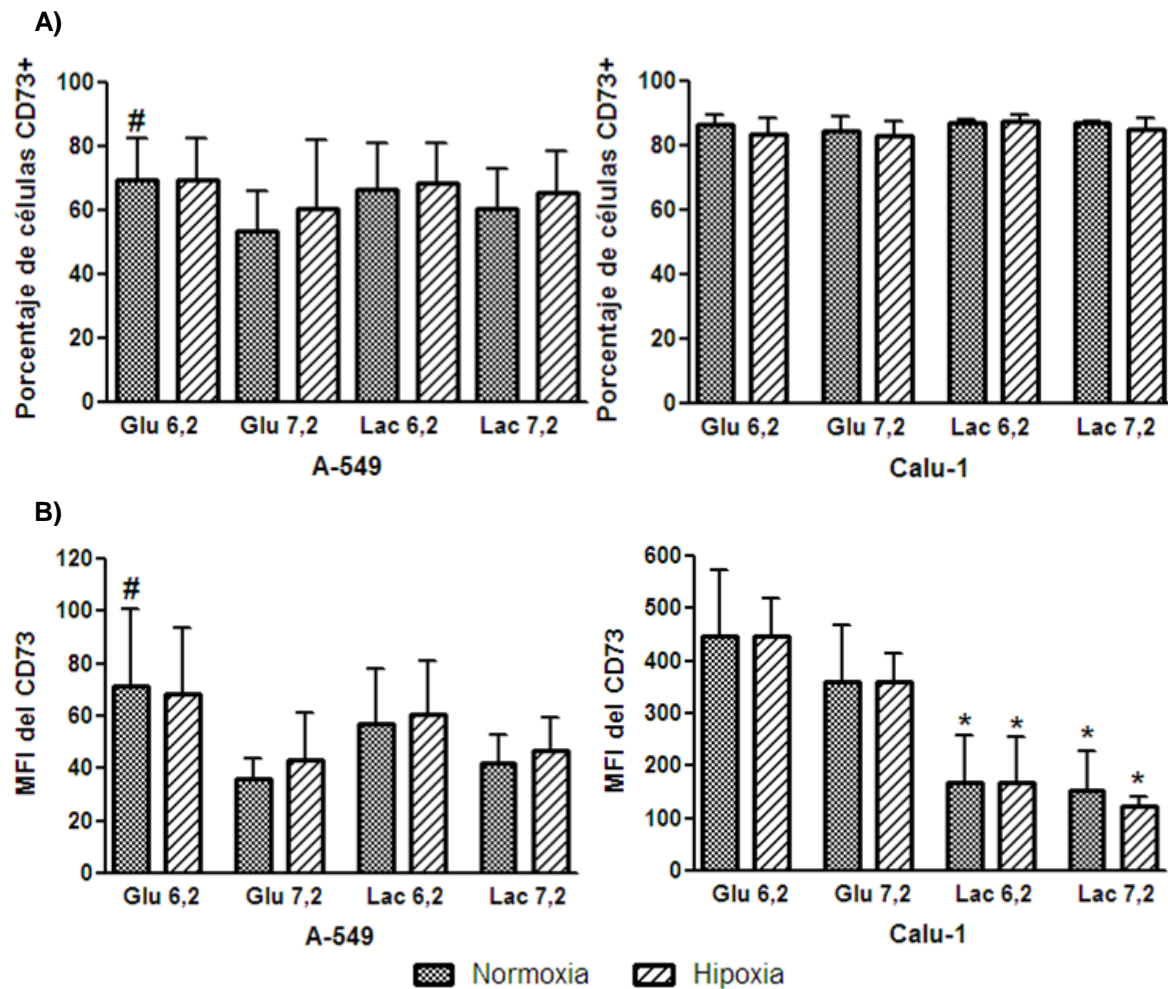


también la MFI aumentó respecto a las células cultivadas en pH neutro. Este incremento sólo fue significativo cuando las células se incubaron en medio con glucosa y normoxia ( $\overline{\text{MFI}}$  en pH 6,2 =  $72 \pm 29$ ,  $\overline{\text{MFI}}$  en pH 7,2 =  $36 \pm 8$ ) (Figuras 28 y 29) El cambio de la fuente de carbono y la tensión de oxígeno no modificaron la expresión de la ecto-5'-nucleotidasa CD73 (Figura 29).

El porcentaje de células Calu-1 que expresaron la ecto-5'-nucleotidasa CD73 se mantuvo entre el 83% y el 88% en todas las condiciones de cultivo (Figura 29). Sin embargo, en las células cultivadas con lactato, la MFI disminuyó respecto a las células cultivadas con glucosa ( $p < 0,05$ ) (Figuras 28 y 29). Estos datos indican que el cultivo con lactato provoca que la cantidad de ecto-5'-nucleotidasa CD73 en la superficie de las células sea menor. La acidosis y la hipoxia no afectaron significativamente la expresión de la proteína CD73 en las células Calu-1 (Figura 29).



**Figura 28. Histogramas representativos de la expresión de la ecto-5'-nucleotidasa CD73 en las líneas de carcinoma pulmonar bajo las distintas condiciones de cultivo.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. La expresión de la ecto-5'-nucleotidasa CD73 se evaluó mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-CD73 marcado con PerCP-eFluor710 y citometría de flujo.



**Figura 29. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la expresión de la ecto-5'-nucleotidasa CD73 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. **A)** Porcentaje de células que expresaron el receptor CD73 (células CD73+) **B)** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células CD73+. Las barras representan la desviación estándar de dos cultivos independientes para la línea A-549 y tres para la línea Calu-1. (#,  $p < 0,05$  vs Glu 7,2 normoxia; \*,  $p < 0,05$  vs las células cultivadas en el mismo pH y la misma tensión de oxígeno pero con glucosa). Glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 6,2 (6,2), pH 7,2 (7,2)

### ***La expresión del transportador de aminoácidos CD98 fue susceptible a la hipoxia en línea celular A-549 y a la lactosis en la línea celular Calu-1***

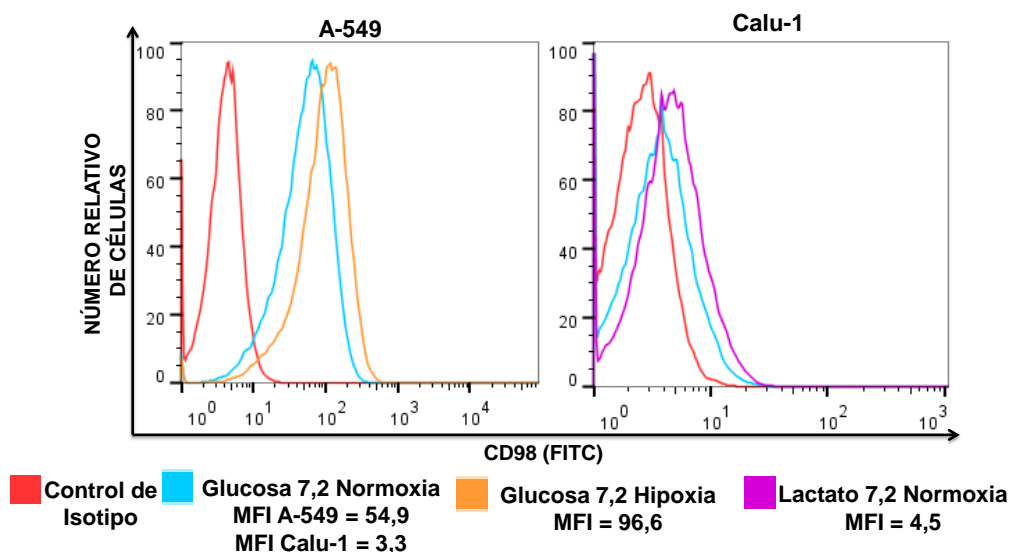
El porcentaje de células A-549 que expresó el transportador de aminoácidos CD98 (células CD98+) fue superior al de las células Calu-1 (Figuras 30 y 31). La línea celular A-549 cultivada en medio con glucosa a pH 7,2 y normoxia expresó la glicoproteína CD98 en el  $88 \pm 7\%$  de sus células, mientras que la línea celular Calu-1 expresó el transportador en el  $25 \pm 2\%$  de sus células, bajo las mismas condiciones. El porcentaje de células A-549 que expresaron el transportador CD98



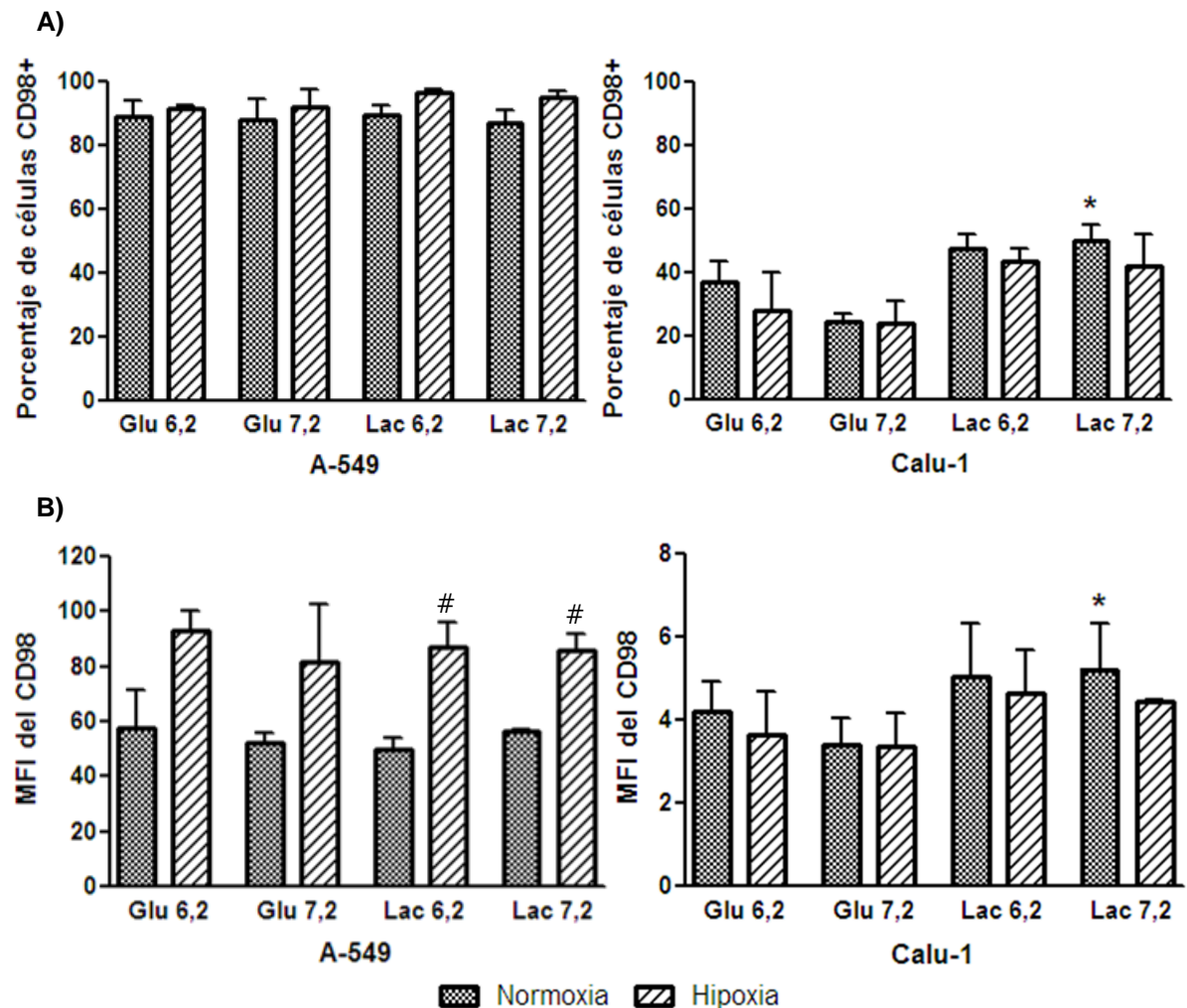
no se modificó significativamente al variar las condiciones de cultivo. El porcentaje de células Calu-1 CD98+ tendió a incrementar en lactosis; sin embargo, el incremento sólo fue significativo para las células cultivadas en lactosis a pH 7,2 y normoxia ( $p < 0,05$  vs glucosa 7,2 normoxia) (Figuras 30 y 31).

En las células de la línea A-549 cultivadas en hipoxia, la MFI tendió a incrementar respecto a las células cultivadas en normoxia, indicando una mayor expresión del transportador CD98 en las condiciones con baja tensión de oxígeno (Figuras 30 y 31). La MFI en normoxia se mantuvo entre 50 y 58, mientras que en hipoxia osciló entre 81 y 93. El pH y la fuente de carbono no alteraron los niveles de expresión del transportador de aminoácidos (Figura 31).

Las células Calu-1 mostraron una tendencia a aumentar la expresión del marcador CD98 cuando se utilizó lactato como fuente de carbono ( $\overline{MFI} = 4,4-5,2$ ) en comparación con las células cultivadas en glucosa ( $\overline{MFI} = 3,4-4,2$ ); sin embargo, este aumento sólo fue significativo en las células cultivadas con lactato, pH 7,2 y normoxia ( $\overline{MFI} = 5,2 \pm 1,0$ ) respecto a las cultivadas con glucosa a pH 7,2 y normoxia ( $\overline{MFI} = 3,4 \pm 0,6$ ). Los cambios en el pH y la tensión de oxígeno no afectaron la expresión del transportador CD98 (Figuras 30 y 31).



**Figura 30. Histogramas representativos de la expresión del transportador de aminoácidos CD98 en las líneas de carcinoma pulmonar bajo las distintas condiciones de cultivo.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. La expresión del transportador CD98 se evaluó mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-CD98 marcado con FITC y citometría de flujo.



**Figura 31. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la expresión del transportador de aminoácidos CD98 en las líneas celulares de carcinoma pulmonar.** Las células se cultivaron durante 48 horas en cada condición. **A)** Porcentaje de células que expresaron la glicoproteína CD98 (células CD98+) **B)** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células CD98+. Las barras representan los valores promedio con la desviación estándar de dos cultivos independientes para la línea A-549 y tres para la línea Calu-1. (#,  $p < 0,05$  vs las células cultivadas en el mismo pH y la misma fuente de carbono pero en normoxia; \*,  $p < 0,05$  vs Glu 7,2 normoxia). Glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 6,2 (6,2), pH 7,2 (7,2)



## Discusión

En el microambiente tumoral de tumores sólidos pueden presentarse gradientes de glucosa, regiones de hipoxia y normoxia, lactosis y acidosis. En este estudio nos preguntamos si las células tumorales de carcinoma pulmonar eran capaces de cambiar su metabolismo energético para sobrevivir a las condiciones cambiantes del microambiente.

La viabilidad promedio de las células de carcinoma pulmonar cultivadas en las diferentes condiciones fue de 83% para A-549 y 70% para Calu-1. La viabilidad celular sólo fue significativamente menor respecto al control (células cultivadas en medio con glucosa, pH 7,2 y normoxia) en las células A-549 cultivadas en lactosis hipóxica, sugiriendo que en esta condición las células A-549 mueren por apoptosis o necrosis, ya que el proceso de apoptosis transcurre en un tiempo estimado de 12 a 24 h y nuestros cultivos fueron de 48 h. <sup>[107]</sup>

Para sobrevivir en los distintos cultivos, las líneas celulares de carcinoma pulmonar modificaron su metabolismo energético de acuerdo a las condiciones en que se encontraban. Nuestros resultados muestran que en hipoxia la línea celular de carcinoma pulmonar A-549 disminuyó su masa mitocondrial, fenómeno que se ha descrito previamente en las células A-549 y en células tumorales de glioma. <sup>[45, 124]</sup> La disminución de la masa mitocondrial a bajas tensiones de oxígeno podría deberse a que una concentración reducida del aceptor final de electrones de la cadena transportadora de electrones hace que la utilización y los requerimientos celulares de sintetizar mitocondrias disminuyan. La disminución de la masa mitocondrial en hipoxia es consistente con el incremento de la capacidad reductora en las mismas condiciones, ya que gran parte del NADH celular se oxida en la mitocondria, por lo que al haber menos mitocondrias disponibles el poder reductor se acumula (Figura 33). Sin embargo, en la línea celular Calu-1 el cultivo con lactato indujo una respuesta metabólica diferente que mantuvo el poder reductor independiente del



metabolismo oxidativo mitocondrial, pero que es suficiente para la supervivencia celular (Figura 37).

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) se comportó diferente en las líneas celulares de carcinoma pulmonar. En la línea celular A-549 se observaron dos poblaciones con diferente  $\Delta\psi_m$ , mientras que en la línea celular Calu-1 sólo se identificó una población. La heterogeneidad del  $\Delta\psi_m$  en las células A-549 podría deberse a una alta actividad de la mitocondria que implica eventos que incrementan el  $\Delta\psi_m$  (como la constante expulsión de protones) y eventos que lo disipan (como la apertura de canales iónicos, síntesis de ATP y “proton leak”), llevando a un potencial sujeto a hiperpolarizaciones y despolarizaciones transitorias que se reflejan a nivel celular.<sup>[84]</sup> Sin embargo, la heterogeneidad del  $\Delta\psi_m$  también podría ser causada por la presencia de subclonas celulares con un  $\Delta\psi_m$  relativamente estable pero diferente entre ellas, fenómeno que se ha observado en líneas celulares de cáncer de colon y de mama<sup>[44, 48]</sup> y que podría ocurrir en las células A-549. Para determinar la causa de la heterogeneidad del  $\Delta\psi_m$  en la línea de adenocarcinoma pulmonar A-549 es necesario realizar estudios sobre la estabilidad del  $\Delta\psi_m$  en cada población.

A pesar de observarse un comportamiento diferente del  $\Delta\psi_m$  de las líneas de carcinoma pulmonar, tanto las células A-549 como las células Calu-1 tendieron a presentar un alto  $\Delta\psi_m$  ( $\uparrow\Delta\psi_m$ ) en hipoxia. En las células A-549 sometidas a hipoxia se observó una tendencia a incrementar el porcentaje de células con  $\uparrow\Delta\psi_m$ , así como el  $\Delta\psi_m$  de dicha población (dado por un incremento del cociente  $MFI_{590/529}$ ) con respecto a sus contrapartes normóxicas. Particularmente, a pesar de que las células cultivadas en lactosis hipóxica tuvieron una menor viabilidad celular, las células que sobrevivieron a dichas condiciones presentaron un alto  $\Delta\psi_m$ . Esto sugiere que el incremento del porcentaje de células con  $\uparrow\Delta\psi_m$  en los cultivos en hipoxia se debe a que las células con bajo  $\Delta\psi_m$  fueron más susceptibles a morir por hipoxia y por lo tanto, esta población disminuyó. Por otro lado, la línea celular Calu-1 presentó un  $\Delta\psi_m$  elevado que, al igual que la viabilidad celular, no se modificó significativamente en ninguna de las condiciones de cultivo. En conjunto, estos resultados llevan a proponer que un  $\Delta\psi_m$  elevado favorece la supervivencia de las células tumorales en



las condiciones adversas del microambiente tumoral, como lo es la hipoxia. Otros reportes han señalado que las células tumorales tienden a incrementar su  $\Delta\psi_m$  en hipoxia <sup>[24, 49, 124]</sup> y que las células tumorales con un  $\Delta\psi_m$  elevado tienen una mayor resistencia a la hipoxia, a la apoptosis y a la quimioterapia, así como una mayor expresión de metaloproteinasas y una menor diferenciación. <sup>[43, 44, 139]</sup> Dichos factores se asocian con un alto potencial maligno.

Nuestros resultados muestran que en la línea celular A-549, las células con alto potencial tienden a incrementar aún más su  $\Delta\psi_m$  en hipoxia, mientras que la línea Calu-1 no modifica su  $\Delta\psi_m$ . En glioma se ha observado que existen líneas celulares que durante la hipoxia incrementan su  $\Delta\psi_m$  y disminuyen su viabilidad (células sensibles a hipoxia), mientras que otras estabilizan su  $\Delta\psi_m$  sin afectar su viabilidad (células tolerantes a hipoxia). <sup>[124]</sup> Esto sugiere que la línea A-549 podría ser sensible a hipoxia, mientras que la línea Calu-1 podría ser tolerante. Sin embargo, nosotros observamos que la viabilidad de las células A-549 (posiblemente sensibles a hipoxia) cultivadas con baja tensión de oxígeno no disminuyó cuando la glucosa fue la fuente de carbono. Wu *et al* demostraron que cuando se afecta la fosforilación oxidativa de las células A-549 cultivadas con glucosa, ocurre un incremento de la actividad glicolítica, por lo que es posible que este mecanismo compensatorio contribuya al mantenimiento de la viabilidad en hipoxia y en presencia de glucosa (Figura 33). <sup>[139]</sup> Además, las condiciones hipóxicas provocaron un aumento en la expresión del transportador de aminoácidos CD98 en las células A-549, lo que significa un aumento en el catabolismo de los aminoácidos, probablemente como un efecto compensatorio a la mayor susceptibilidad de esta línea celular a la hipoxia y a la disminución de la fosforilación oxidativa (Figura 33).

Un  $\Delta\psi_m$  elevado significa una alta expulsión de protones al espacio intermembranal. Se ha observado que en hipoxia, para evitar que el bajo transporte de electrones provoque una disminución del  $\Delta\psi_m$  por debajo del umbral requerido para otras funciones mitocondriales, se inicia una actividad reversa de la ATP sintasa (como ATPasa), la cual se acompaña de la exportación de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal y, por lo tanto, de un incremento en el  $\Delta\psi_m$ .





[16, 116] Algunos autores han propuesto que en las células tumorales este proceso ocurre de forma constitutiva, por lo que la mayoría de las células malignas poseen un  $\Delta\psi_m$  constitutivamente elevado, [110] como ocurre en las células Calu-1 (Figuras 36 y 37).

El cultivo con lactato provocó una disminución de la masa mitocondrial en ambas líneas celulares, con excepción de las células A-549 cultivadas en acidosis láctica y normoxia. La menor masa mitocondrial de la mayoría de las células cultivadas con lactato podría deberse a la degradación de las mitocondrias por mitofagia (Figura 37), un proceso de resistencia a la muerte celular que ocurre cuando la actividad mitocondrial se afecta excesivamente o en condiciones de privación de nutrientes. [61, 76]

En la línea celular Calu-1 cultivada con lactato podría ocurrir un estado de inanición, como se ha reportado en las células MCF-7 y 4T1, [18, 137] ya que dichas células Calu-1 mostraron una mayor expresión del transportador de aminoácidos CD98 y una menor expresión de la ecto-5'-nucleotidasa CD73, indicando un incremento en el consumo de aminoácidos (considerados una fuente de energía alterna) y una menor liberación de AMP posiblemente debida a una menor utilización de ATP (Figura 37). Además, la menor proliferación de la línea celular Calu-1 cultivada con lactato, podría estar relacionada con un arresto en el ciclo celular que las mantiene metabólicamente menos activas y ahorra energía, como se ha observado en la línea celular 4T1. [137]

Por otra parte, el mantenimiento de la masa mitocondrial de las células A-549 cultivadas en acidosis láctica y normoxia indica que para estas células cultivadas en las condiciones mencionadas, el metabolismo mitocondrial es importante para la supervivencia (Figura 34), probablemente debido a lo encontrado en tumores de cáncer de mama, en los cuales la acidosis láctica induce la expresión de genes involucrados en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. [17] Para comprobar la participación del metabolismo oxidativo mitocondrial en esta condición, se podría inhibir la cadena respiratoria de dichas células, midiendo los niveles de ATP antes y después de la inhibición.



Se ha reportado que la expresión del receptor de transferrina CD71 está positivamente regulada por HIF-1; <sup>[71]</sup> sin embargo, nosotros sólo observamos un incremento significativo de la expresión de CD71 en las células A-549 cultivadas en acidosis láctica e hipoxia respecto a su contraparte normóxica, indicando que la expresión de este receptor sólo es susceptible a hipoxia cuando las células se encuentran en acidosis láctica.

A pesar de que algunos antecedentes indican que el estrés metabólico incrementa la expresión de la glicoproteína CD133, <sup>[38, 115]</sup> ninguna de las líneas celulares de carcinoma pulmonar en las diferentes condiciones de cultivo expresó la glicoproteína CD133. Esto, además de indicar la ausencia de células madre cancerosas, sugiere que en carcinoma pulmonar la glicoproteína CD133 no es un marcador que se pueda asociar al estrés metabólico.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que las líneas celulares de carcinoma pulmonar A-549 y Calu-1 modifican su metabolismo energético para sobrevivir en las diversas condiciones analizadas, apoyando la teoría de que las mitocondrias de las células tumorales son funcionales.

En este estudio se incluyeron dos líneas celulares tumorales, lo cual nos permitió hacer comparaciones entre el metabolismo de las células de dos diferentes tipos histológicos de cáncer pulmonar: adenocarcinoma y carcinoma epidermoide. Sin embargo, sería conveniente realizar un estudio comparando los efectos de las condiciones de cultivo sobre el metabolismo de las células no malignas y las células tumorales, con el objetivo de determinar cuáles son los cambios metabólicos exclusivos de las células tumorales que les permiten conseguir su supervivencia en las condiciones adversas del microambiente tumoral.

Además, aún falta dilucidar los mecanismos que median la reprogramación metabólica de las células malignas y corroborar algunas de las hipótesis planteadas en el presente trabajo; sin embargo, hemos logrado vislumbrar un poco de la compleja organización metabólica que opera en las células tumorales y su capacidad de modulación ante las condiciones microambientales.



# Modelos del fenotipo metabólico de las células de carcinoma pulmonar cultivadas en diferentes condiciones

Línea celular A-549

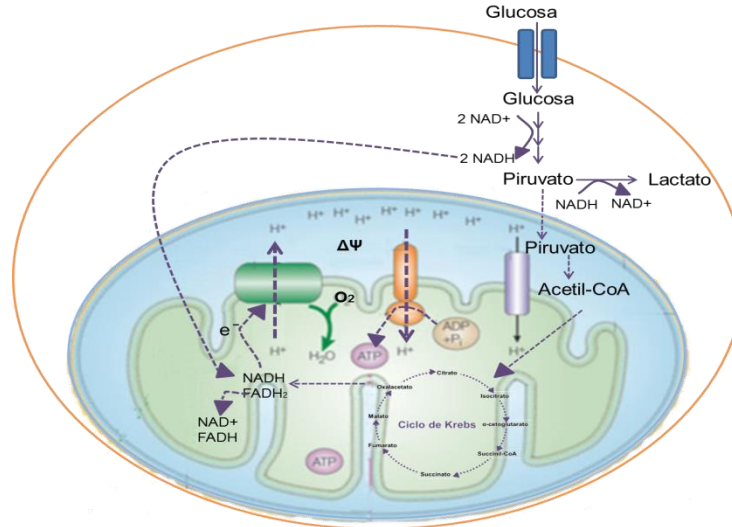


Figura 32. Metabolismo de las células A-549 cultivadas en medio con glucosa y normoxia.

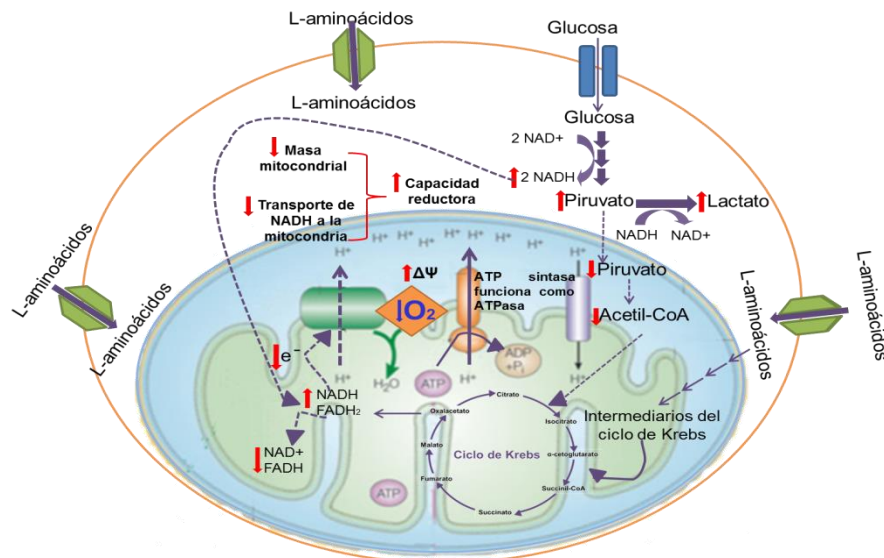


Figura 33. Efecto de la hipoxia sobre el metabolismo de las células A-549 cultivadas en medio con glucosa.



Transportador de aminoácidos CD98



Transportador de glucosa GLUT1



Transportador de lactato MCT1

-----> Vías metabólicas cuya actividad está disminuida

→ Vías metabólicas cuya actividad es moderada

→ Vías metabólicas cuya actividad está incrementada

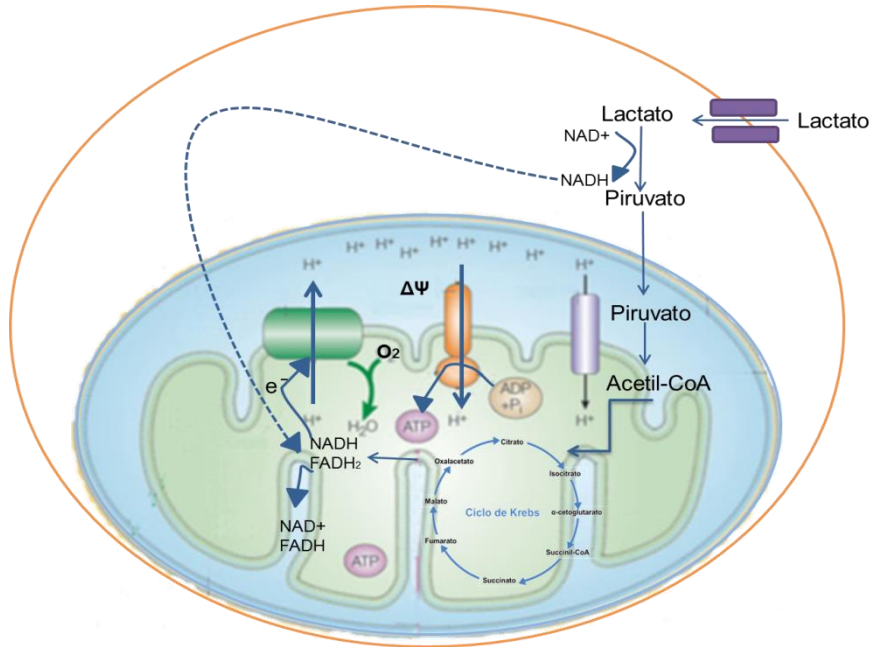


Figura 34. Efecto del lactato sobre el metabolismo de las células A-549 cultivadas en normoxia.

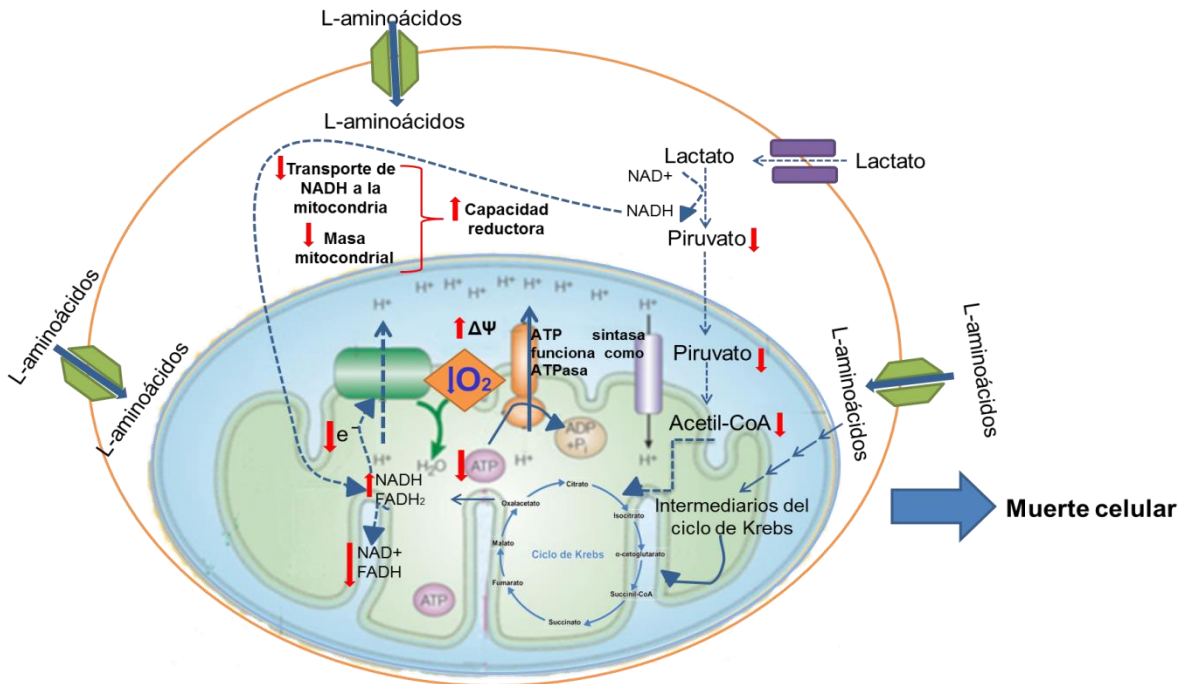





Figura 35. Efecto de la hipoxia sobre el metabolismo de las células A-549 cultivadas en medio con lactato.

-  Transportador de aminoácidos CD98
-  Transportador de glucosa GLUT1
-  Transportador de lactato MCT1
- > Vías metabólicas cuya actividad está disminuida
- Vías metabólicas cuya actividad es moderada
- Vías metabólicas cuya actividad está incrementada



Línea celular Calu-1

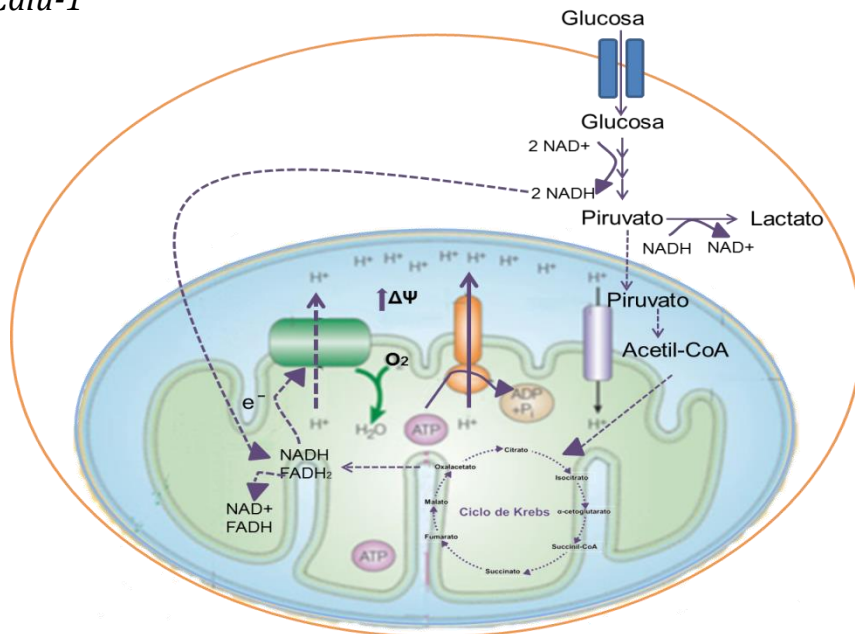


Figura 36. Metabolismo de las células Calu-1 cultivadas en medio con glucosa y normoxia.

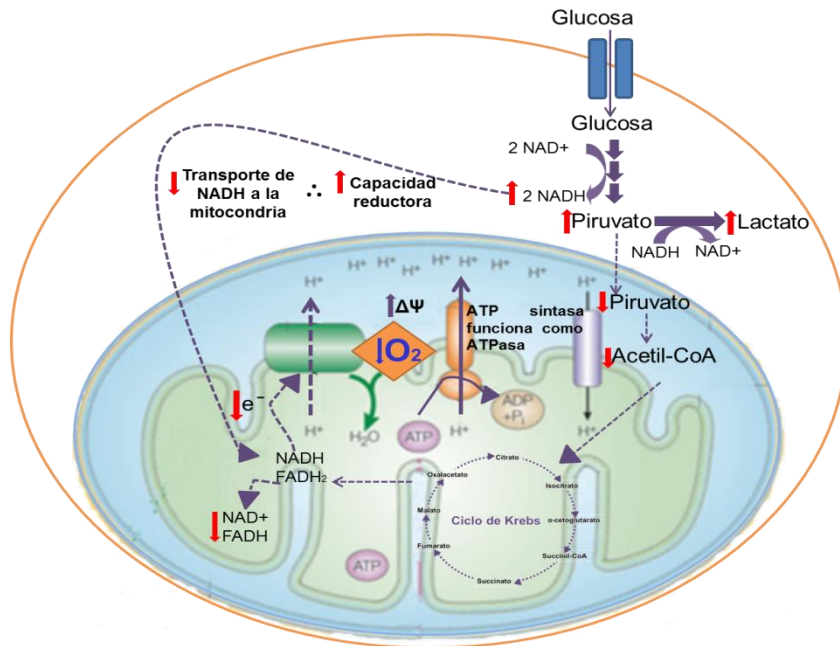
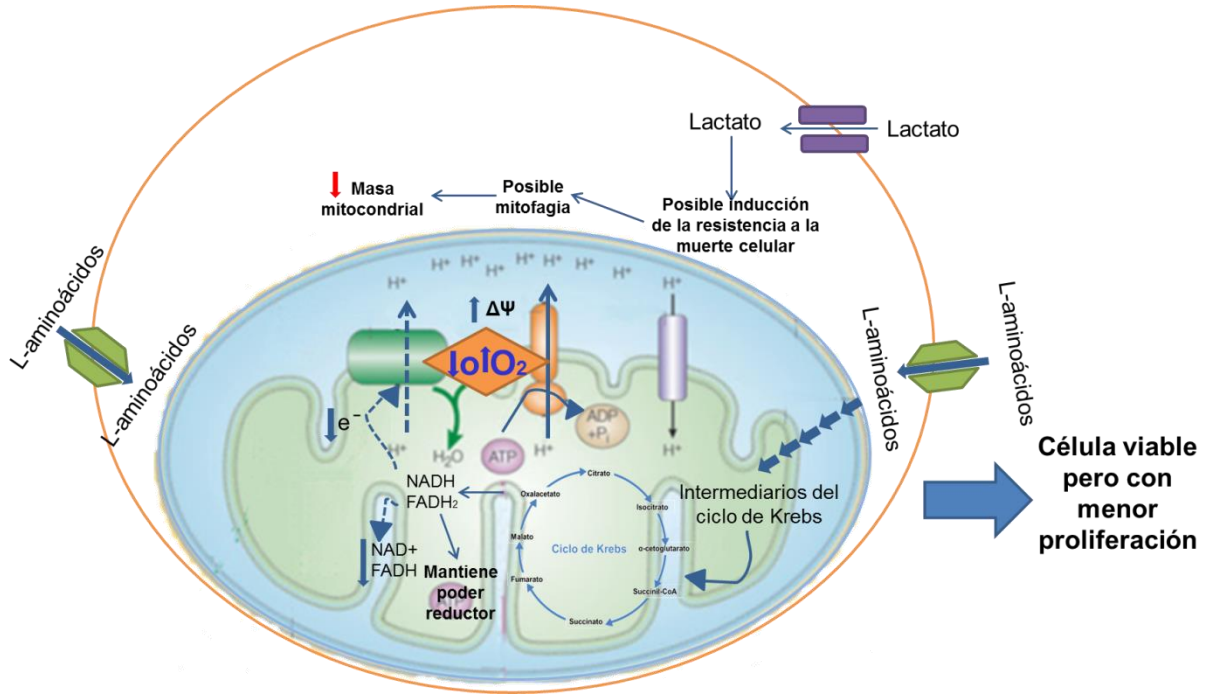







Figura 37. Efecto de la hipoxia sobre el metabolismo de las células Calu-1 cultivadas en medio con glucosa.

- Transportador de aminoácidos CD98
- Transportador de glucosa GLUT1
- Transportador de lactato MCT1
- Vías metabólicas cuya actividad está disminuida
- Vías metabólicas cuya actividad es moderada
- Vías metabólicas cuya actividad está incrementada



**Figura 37. Efecto del lactato sobre el metabolismo de las células Calu-1.**

-  Transportador de aminoácidos CD98
-  Transportador de glucosa GLUT1
-  Transportador de lactato MCT1 -----> Vías metabólicas cuya actividad está disminuida
-  Vías metabólicas cuya actividad es moderada
-  Vías metabólicas cuya actividad está incrementada



## Conclusiones

En la línea celular A-549 la mayoría de las células que sobrevivieron a los cultivos con lactato e hipoxia presentaron un alto potencial, mientras que las células Calu-1 mantuvieron un alto potencial en todas las condiciones de cultivo sin modificar su viabilidad. Lo anterior sugiere que un alto potencial de membrana mitocondrial podría favorecer la resistencia a la muerte por el estrés metabólico. Lo que hace al alto potencial de membrana mitocondrial un posible blanco en la terapia contra el cáncer.

En ambas líneas celulares cultivadas con glucosa, la hipoxia provocó un aumento en la capacidad reductora, lo que sugiere que la baja tensión de oxígeno provoca una menor actividad de las mitocondrias de las células de carcinoma pulmonar cuando se cultivan con glucosa.

Las células de carcinoma pulmonar presentaron un comportamiento diferente. Las células A-549 fueron más susceptibles a la hipoxia y las células Calu-1 a la presencia de lactato; sin embargo, ambos tipos de estrés metabólico correlacionaron con una mayor expresión del transportador de aminoácidos CD98.

Las líneas celulares de carcinoma pulmonar A-549 y Calu-1 modificaron su metabolismo energético para sobrevivir a los cambios en la tensión de oxígeno, la fuente de carbono y el pH.

Las mitocondrias de las líneas celulares de carcinoma pulmonar A-549 y Calu-1 son funcionales y participan en la adaptación de las células tumorales a su entorno.



## Referencias

1. Agnello, M., Morici, G. y Rinaldi, A., 2008. A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*, 56, pp.145-149.
2. Ahmed, N., Williams, J. F. y Weidemann, M. J., 1993. Glycolytic, glutaminolytic and pentose-phosphate pathways in promyelocytic HL60 and DMSO-differentiated HL60 cells. *Biochem Mol Biol Int*, 29, pp. 1055-1067.
3. Al-Nasiry, S., *et al*, 2007. The use of alamarBlue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Oxford University Press*, pp. 1304-1309.
4. Alberts, B., *et al*, 2002. *Molecular biology of the cell* [e-book] New York: Garland Science Disponible en: National Center for Biotechnology Information <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>> [Acceso: 6 de enero de 2013].
5. Alison, M. R., 2001. Cancer. *Encyclopedia of Life Sciences. eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester*. [En línea] Disponible en: <<http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001471.html>> [doi: 10.1038/npg.els.0001471] [Acceso: 2 de enero de 2013].
6. Allard, B., Turcotte, M. y Stagg, J., 2012. CD73-Generated adenosine: Orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *J Biomed Biotechnol*, 2012, pp. 1-9.
7. American Cancer Society, 2012. *Lung cancer (non-small cell)* [En línea] (17 de febrero de 2012) Disponible en: <<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-what-is-non-small-cell-lung-cancer>> [Acceso: 30 de diciembre de 2012].
8. American Cancer Society, 2012. *Lung cancer (small cell)* [En línea] (3 de mayo de 2012) Disponible en: <<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-smallcell/detailedguide/small-cell-lung-cancer-what-is-small-cell-lung-cancer>> [Acceso: 30 de diciembre de 2012].
9. Baggetto, L. G., 1992. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie*, 74, pp. 959-974.
10. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L., 2002. *Biochemistry*. [e-book] New York: W H Freeman Disponible en: National Center for Biotechnology Information <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22593/>> [Acceso: 1 de enero de 2013].
11. Bertolini, G., *et al*, 2009. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *PNAS*, 106, pp. 16281-16286.
12. Bertout, J. A., Patel, S. A., y Simon, M. C., 2008. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, pp. 967-975.
13. Bilello, K. S., Murin, S. y Matthay, R. A., 2002. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin Chest Med*, 23, pp. 1-25.
14. Birkmayer, G. D., 2009. *NADH, the biological hydrogen: the secret of our life energy*. [e-book] Basic Health Publications, Inc. Disponible en: Google Books <[http://books.google.com.mx/books?id=bH0GCr\\_Viv4C&pg=PA14&dq=cell+reduction+potential+NADH&hl=es&sa=X&ei=kgDmUKKGPiGG2wXk1oCYCA&ved=0CFkQ6AEwBQ#v=onepage&q=cell%20reduction%20potential%20NADH&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=bH0GCr_Viv4C&pg=PA14&dq=cell+reduction+potential+NADH&hl=es&sa=X&ei=kgDmUKKGPiGG2wXk1oCYCA&ved=0CFkQ6AEwBQ#v=onepage&q=cell%20reduction%20potential%20NADH&f=false)> [Acceso: 4 de enero de 2013].
15. Busk, M., *et al*, 2008. Aerobic glycolysis in cancers: Implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. *Int J Cancer*, 122, pp. 2726-2734.
16. Campanella, M., *et al*, 2009. IF<sub>1</sub>: setting the pace of the F1Fo-ATP synthase. *Trends Biochem Sci*, 34, pp. 343-350.
17. Chen, J. L., *et al*, 2008. The Genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS Genet*, 4, pp. 1-16.
18. Chen, J. L., *et al*, 2010. Lactic acidosis triggers starvation response with paradoxical induction of TXNIP through MondoA. *PLoS Genet*, 6, pp. 1-18.
19. Cooper, G. M., 2000. *The cell. A molecular approach*. [e-book] Boston University Disponible en: National Center for Biotechnology Information <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>> [Acceso: 31 de diciembre de 2012].





20. Cuezva, J. M., *et al*, 1997. Mitochondrial biogenesis in the liver during development and ontogenesis. *J Bioenerg Biomembr*, 29, pp. 365-377.
21. De Bari, L., Moro, L. y Passarella, S., 2013. Prostate cancer cells metabolize d-lactate inside mitochondria via a d-lactate dehydrogenase which is more active and highly expressed than in normal cells. *FEBS Lett*, 587, pp. 467-473.
22. DeBerardinis, R. J., *et al*, 2007. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *PNAS*, 104, pp. 19345-19350.
23. Devlin, T., 2004. *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones*. [e-book] Barcelona: Editorial Reverté  
Disponibile en: Google Books  
<[http://books.google.com.mx/books?id=p3DCb9ITLx8C&pg=PA538&lpg=PA538&dq=poder+reductor+celular&source=bl&ots=Y\\_\\_LSTNgVR&sig=QRME1anGMJmz755daOTv5ZPpF9c&hl=es&sa=X&ei=tAvmUMpJFcq02gXwtlHwBQ&ved=0CH4Q6AEwCQ#v=onepage&q=poder%20reductor%20celular&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=p3DCb9ITLx8C&pg=PA538&lpg=PA538&dq=poder+reductor+celular&source=bl&ots=Y__LSTNgVR&sig=QRME1anGMJmz755daOTv5ZPpF9c&hl=es&sa=X&ei=tAvmUMpJFcq02gXwtlHwBQ&ved=0CH4Q6AEwCQ#v=onepage&q=poder%20reductor%20celular&f=false)> [Acceso: 4 de enero de 2013].
24. Diaz, G., *et al*, 1999. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells. *J Cell Sci*, 112, pp. 1077-1084.
25. Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M. y Devin, A., 2011. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta*, 1807, pp. 568-576.
26. Eramo, A., *et al*, 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 15, pp. 504-514.
27. Fantin, V. R., St-Pierre, J. y Leder, P., 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9, pp. 425-434.
28. Ferrandina, G., *et al*, 2009. CD133 antigen expression in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 9, pp. 1-9.
29. Fischer, F., Hamann, A. y Osiewacz, H. D., 2012. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci*, 37, pp. 284-292.
30. Frezza, C. y Gottlieb, E., 2009. Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol*, 19, pp. 4-11.
31. Garret, R. H. y Grisham, C. M., 2013. *Biochemistry*. [e-book] USA: Brooks/Cole, Cengage Learning  
Disponibile en: Google Books  
<[http://books.google.com.mx/books?id=liEr5FbGdiiC&pg=PA677&dq=complex+in+the+electron+transport+chain&hl=es-419&sa=X&ei=iPXoUP-TFclQ2AX\\_q4CQDQ&ved=0CFIQ6AEwBQ#v=onepage&q=complex%20in%20the%20electron%20transport%20chain&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=liEr5FbGdiiC&pg=PA677&dq=complex+in+the+electron+transport+chain&hl=es-419&sa=X&ei=iPXoUP-TFclQ2AX_q4CQDQ&ved=0CFIQ6AEwBQ#v=onepage&q=complex%20in%20the%20electron%20transport%20chain&f=false)> [Acceso: 6 de enero de 2013].
32. Gasparre, G., Romeo, G., Rugolo, M., Porcelli, A., 2011. Learning from oncocytic tumors: Why choose inefficient mitochondria?. *Biochim Biophys Acta*, 1807, pp. 633-642.
33. Gatenby, R. A. y Gillies, R. J., 2008. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 8, pp. 56-61.
34. Gillies, R. J., Verduzco, D. y Gatenby, R. A., 2012. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat Rev Cancer*, 12, pp. 487-493.
35. Gleadle, J. y Ratcliffe, P., 2001. Hypoxia. *Encyclopedia of Life Sciences*. eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. [En línea] Disponible en: <<http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0002125.html>> [DOI: 10.1038/npg.els.0002125] [Acceso: 3 de marzo de 2013].
36. Gogvadze, V., Orrenius, S. y Zhivotovsky, B., 2008. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?. *Trends Cell Biol*, 18, pp. 165-173.
37. Griguer, C. E., Oliva, C. R. y Gillespie, G. Y., 2005. Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. *J Neurooncol*, 74, pp. 123-133.
38. Griguer, C. E., *et al*, 2008. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS ONE*, 3, pp. 1-11.
39. Guppy, M., Leedman, P., Zu, X. y Russell, V., 2002. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J*, 364, pp. 309-315.
40. Hanahan, D. y Weinberg, R., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, pp. 646-674.
41. Harris, A. L., 2002. Hypoxia — A key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2, pp. 38-47



42. Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A. y Mueller-Klieser, W., 2011. Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Res*, 71, pp. 6921-6925.
43. Heerdt, B. G., Houston, M. A., Wilson, A. J. y Augenlicht, L. H., 2003. The intrinsic mitochondrial membrane potential is associated with steady-state mitochondrial activity and the extent to which colonic epithelial cells undergo butyrate-mediated growth arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 63, pp. 6311-6319.
44. Heerdt, B. G., Houston, M. A. y Augenlicht, L. H., 2005. The intrinsic mitochondrial membrane potential of colonic carcinoma cells is linked to the probability of tumor progression. *Cancer Res*, 65, pp. 9861-9867.
45. Heerlein, K., *et al*, 2005. Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of A-549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32, pp. 44-51.
46. Helmlinger, G., *et al*, 2002. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new Insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res*, 8, pp. 1284-1291.
47. Höckel, M., Schlenger, K., Höckel, S. y Vaupel, P., 1999. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res*, 59, pp. 4525-4528.
48. Houston, M. A., Augenlicht, L. H. y Heerdt, B. G., 2011. Stable differences in intrinsic mitochondrial membrane potential of tumor cell subpopulations reflect phenotypic heterogeneity. *Int J Cell Biol*, 2011, pp. 1-11.
49. Huang, C-Y, *et al*, 2013. Resistance to hypoxia-induced necroptosis is conferred by glycolytic pyruvate scavenging of mitochondrial superoxide in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*, 4, pp. 1-11.
50. Huang, W., *et al*, 2013. A proposed role for glutamine in cancer cell growth through acid resistance. *Cell Res*, 23, pp. 724-727.
51. International Agency for Research on Cancer, 2010. *Globocan 2008: Lung cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2008 summary*. [En línea] Disponible en: <<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>> [Acceso: 28 de diciembre de 2012].
52. International Agency for Research on Cancer, 2010. *Globocan 2008: Mexico*. [En línea] Disponible en: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=484#MEN>> [Acceso: 28 de diciembre de 2012].
53. International Agency for Research on Cancer, 2010. *Globocan 2008: World*. [En línea] Disponible en: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#MEN>> [Acceso: 28 de diciembre de 2012].
54. Invitrogen MitoProbe, 2004. JC-1 assay kit for flow cytometry (M34152) [pdf].
55. Invitrogen BacLight, 2004. Bacterial membrane potential kit (B34950) [pdf].
56. Kadenbach, B., 2003. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1604, pp. 77-94.
57. Kaira, K., *et al*, 2008. L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci*, 99, pp. 2380-2386.
58. Kaira, K., *et al*, 2011. Expression of 4F2hc (CD98) in pulmonary neuroendocrine tumors. *Oncol Rep*, 26, pp. 931-937.
59. Karp, G., 2009. *Cell and molecular biology*. [e-book] USA: John Wiley & Sons Disponible en: Google Books <[http://books.google.com.mx/books?id=arRGYE0GxRQC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=arRGYE0GxRQC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)> [Acceso: 6 de enero de 2013].
60. Kennedy, K. M. y Dewhirst, M. W., 2010. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future oncol*, 6, pp. 1-32.
61. Kim, I. y Lemasters, J. J., 2011. Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300, pp. C308-C317.
62. Klaassen, C. D. y Watkins, J. B. eds, 2010. *Casarett & Doull's Essentials of toxicology*. 2º ed., USA: McGraw-Hill.
63. Kondo, K., *et al*, 1990. Transferrin receptor expression in adenocarcinoma of the lung as a histopathologic indicator of prognosis. *Chest*, 97, pp. 1367-1371.
64. Koolman, J. y Röhm, K., 2004. *Bioquímica. Texto y atlas*. 3º ed., Madrid: Editorial Médica Panamericana.
65. Koppenol, W. H., Bounds, P. L. y Dang, C. V., 2011. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11, pp. 325-337.
66. Kroemer, G., 2006. Mitochondria in cancer. *Oncogene*, 25, pp. 4630-4632.
67. Laconi, E., 2007. The evolving concept of tumor microenvironments. *Bioessays*, 29, pp. 738-744.



68. LaNoue, K. F., 2001. Citric Acid Cycle. *Encyclopedia of Life Sciences.eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester*. [En línea] Disponible en: <<http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001369.html>> [DOI: 10.1038/npg.els.0001369] [Acceso: 10 de febrero de 2013].
69. Lesfnesky, E. J. y Hoppel, C. L., 2006. Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing Res Rev*, 5, pp. 402-433.
70. Levine, T. B. y Levine, A. B., 2013. *Metabolic syndrome and cardiovascular disease*. [e-book] Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Disponible en: Wiley Online Library <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118480045>> [Acceso: 3 de marzo de 2013].
71. Lok, C. N. y Ponka, P., 1999. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem*, 274, pp. 24147–24152.
72. Lu, X., *et al*, 2013. Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*, 19, pp. 1912-1918.
73. Martinez-Outschoorn, U.E., *et al*, 2010. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution. A new paradigm for understanding tumor metabolism the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell cycle*, 9, pp. 3256-3276.
74. Matsuno, T. y Goto, I., 1992. Glutaminase and glutamine synthetase activities in human cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 52, pp. 1192-1194.
75. McLaughlin, S. G. A. y Dilger, J. P., 1980. Transport of protons across membranes by weak acids. *Physiol Rev*, 60, pp. 825-857.
76. Michel, S., *et al*, 2012. Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. *J Cell Physiol*, pp. 2297-2309.
77. Nadakavukaren, K. K., Nadakavukaren, J. J. y Chen, L. B., 1985. Increased rhodamine 123 uptake by carcinoma cells. *Cancer Res*, 45, pp. 6093-6099.
78. Nagaraj, N. S., Vigneswaran, N. y Zacharias, W., 2004. Hypoxia-mediated apoptosis in oral carcinoma cells occurs via two independent pathways. *Mol Cancer*, 3, pp. 1-14.
79. National Cancer Institute, 2012. *General information about non-small cell lung cancer (NSCLC)* [En línea] (11 de mayo de 2012) Disponible en: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/healthprofessional/page1>> [Acceso: 30 de diciembre de 2012].
80. National Cancer Institute, 2012. *What is cancer?* [En línea] (2 de junio de 2012) Disponible en: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>> [Acceso: 27 de diciembre de 2012].
81. National Institutes of Health, 2012. *Lung cancer-non small cell* [En línea] (24 de agosto de 2011) Disponible en: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/007194.htm>> [Acceso: 30 de diciembre de 2012].
82. Nedege, B., Patrick, L. y Rodrigue, R., 2009. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogénesis. *Front Biosci*, 14, pp. 4015-4034.
83. Nelson, D. L. y Cox, M. M., 2009. *Lehninger. Principios de bioquímica*. 5<sup>o</sup> ed., Barcelona: Ediciones Omega.
84. Nivala, M. *et al*, 2011. Linking flickering to waves and whole-cell oscillations in a mitochondrial network model. *Biophys J*, 101, pp. 2102–2111.
85. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the AlamarBlue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 267, pp. 5421-5426.
86. Oh, H. K., *et al*, 2012. Overexpression of CD73 in epithelial ovarian carcinoma is associated with better prognosis, lower stage, better differentiation and lower regulatory T cell infiltration. *J Gynecol Oncol*, 23, pp. 274-281.
87. Ohno, H., *et al*, 2011. 4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300, pp. 1047-1054.
88. Oka, S., Hsu, C. y Sadoshima, J., 2012. Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides. *Circ Res*, 111, pp. 604-610.
89. Organización Mundial de la Salud, 2013. *Cáncer* [En línea] (febrero de 2012) Disponible en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>> [Acceso: 12 de enero de 2013].
90. Pagliarini, D. J. y Dixon, J. E., 2006. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci*, 31, pp. 26-34.
91. Paniagua, R., *et al*, 2007. *Biología celular*. 3<sup>o</sup> ed., Madrid: McGraw-Hill.



92. Papa, S., 1996. Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochim Biophys Acta*, 1276, pp. 87-105.
93. Park, K. S., *et al*, 2011. Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell Cycle*, 10, pp. 2806-2815.
94. Parlo, R. A. y Coleman, P. S., 1984. Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. *J Biol Chem*, 259, pp. 9997-10003.
95. Perrot, S., *et al.*, 2003. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. *Toxicol Sci*, 72, pp. 122-129.
96. Phypers, B. y Pierce, T., 2006. Lactate physiology in health and disease. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*, 6, pp. 128-132.
97. Płoszyńska, A., *et al*, 2012. Cytometric evaluation of transferrin receptor 1 (CD71) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Folia Histochem Cytobiol*, 50, pp. 304–311.
98. Pollak, N., Dölle, C. y Ziegler, M., 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochem J*, 402, pp. 205-218.
99. Ponder, B. A. J., 2001. Cancer genetics. *Nature*, 411, pp. 336-341.
100. Ponka, P. y Lok, C. N., 1999. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, pp. 1111-1137.
101. Prutki, M., *et al*, 2005. Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett*, 238, pp. 188–196.
102. Recht, L., *et al*, 1990. Transferrin receptor in normal and neoplastic brain tissue: implications for brain-tumor immunotherapy. *J Neurosurg*, 72, pp. 941-945.
103. Reitzer, L. J., Wice, B. M. y Kennell, D., 1979. Evidence that glutamine, not Sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*, 254, pp. 2669-2676.
104. Rodríguez, E. S., *et al*, 2006. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 215, pp. 208–217.
105. Romero-García, S., *et al*, 2011. Tumor cell metabolism. An integral view. *Cancer Biol Ther*, 12, pp. 939-948.
106. Sadej, R., Spychala, J. y Skladanowski, A. C., 2006. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Res*, 16, pp. 213-222.
107. Saraste, A., 1999. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*, 24, pp. 189-195.
108. Schwickert, G., *et al*, 1995. Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res*, 55, pp. 4757-4759.
109. Seimiya, H., *et al*, 1999. Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 260, pp. 365-370.
110. Seyfried, T. N., 2012. *Cancer as a metabolic disease: On the origin, management and prevention of cancer*. [e-book] Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken Disponible en: Wiley Online Library <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118310311.ch4/summary>> [Acceso: 3 de marzo de 2013].
111. Seymour, G. J., *et al*, 1987. Transferrin receptor expression by human bladder transitional cell carcinomas. *Urol Res*, 15, pp. 341-344.
112. Sharma, D., *et al*, 2012. Effective flow cytometric phenotyping of cells using minimal amounts of antibody. *Biotechniques*, 53, pp. 57-60.
113. Simonnet, H., *et al*, 2003. Mitochondrial complex I is deficient in renal oncocyomas. *Carcinogenesis*, 24, pp. 1461-1466.
114. Singh, S., *et al*, 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63, pp. 5821-5828.
115. Soeda, A., *et al*, 2009. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 $\alpha$ . *Oncogene*, 28, pp. 3949-3959.
116. Solaini, G., Sgarbi, G. y Baracca, A., 2010. Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1807, pp. 534–542.
117. Sonveaux, P., *et al*, 2011. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*, 118, pp. 3930-3942.
118. Staub, F., *et al*, 1990. Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J Cereb Blood Flow Metab*, 10, pp. 866-876.



119. Summerhayes, I. C., *et al*, 1982. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *PNAS*, 79, pp. 5292-5296.
120. Synnestvedt, K., *et al*, 2002. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*, 110, pp. 993-1002.
121. Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A. y Cairo, G., 1999. Transferrin receptor induction by hypoxia. *J Biol Chem*, 274, pp. 24142-24146.
122. Terada, H., 1981. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 639, pp. 225-242.
123. Tran, S., Puhar, A., Camus, M., Ramarao, N., 2011. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 6, pp. 1-5.
124. Travis, W. D., 2011. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med*, 32, pp. 669-692.
125. Turcotte, M. L., Parliament, M., Franko, A. y Allalunis-Turner, J., 2002. Variation in mitochondrial function in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant human glioma cells. *Br J Cancer*, 86, pp. 619-624.
126. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. y Thompson, C. B., 2009. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, pp. 1029-1033.
127. Voet, D. y Voet, J. G., 2006. *Bioquímica*. [e-book] Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana Disponible en: Google Books <[http://books.google.com.mx/books?id=r5bedH\\_aST0C&pg=PA897&dq=poder+reductor+celular&hl=es&sa=X&ei=RQLmUKbIIISE2QXFjYHQDQ&ved=0CFYQ6AEwBQ#v=onepage&q=poder%20reductor%20celular&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=r5bedH_aST0C&pg=PA897&dq=poder+reductor+celular&hl=es&sa=X&ei=RQLmUKbIIISE2QXFjYHQDQ&ved=0CFYQ6AEwBQ#v=onepage&q=poder%20reductor%20celular&f=false)> [Acceso: 3 de enero de 2013].
128. Vogelstein, B. y Kinzler, K. W., 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10 (8), pp. 789-799.
129. Vollmer, E., *et al*, 2010. Tumors in the lung – morphologic features and the challenge of integrating biomarker signatures into diagnostics. *Rom J Morphol Embryol*, 51, pp. 607-614.
130. Walenta, S., *et al*, 1997 Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol*, 150, pp. 409-415.
131. Warburg, O., Wind, F. y Negelein, E., 1926. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*, pp. 519-530.
132. Webb, B., Chimenti, M., Jacobson, M. P. y Barber, D. L., 2011. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 11, pp. 671-677.
133. Weber, J., 2007. ATP Synthase - The structure of the stator stalk. *Trends Biochem Sci*, 32, pp. 53-56.
134. Weinberg, F. y Chandel, N., 2009. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1177, pp. 66-73.
135. Weizmann Institute of Science, 2013. *Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), Member 2* [En línea] Disponible en: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC3A2>> [Acceso: 21 de junio de 2013].
136. Weizmann Institute of Science, 2013. *Transferrin receptor (p90, CD71)* [En línea] Disponible en: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TFRC&search=TFRC>> [Acceso: 23 de agosto de 2013].
137. Wilson, W. R. y Hay, M. P., 2011. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 11, pp. 393-410.
138. Wu, H., *et al*, 2012. Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J Pathol*, 227, pp. 189-199.
139. Wu, M., *et al*, 2007. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, pp. 125-136.
140. Ye, X-Q., *et al*, 2011. Heterogeneity of mitochondrial membrane potential: A novel tool to isolate and identify cancer stem cells from a tumor mass?. *Stem Cell Rev*, 7, pp. 153-160.
141. Yuan, J., Narayanan, L., Rockwell, S. y Glazer, P. M., 2000. Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer Res*, 60, pp. 4372-4376.
142. Zborovskaya, I., *et al*, 1996. Simultaneous detection of genetic and immunological markers in non-small cell lung cancer: prediction of metastatic potential of tumor. *Clin Exp Metastasis*, 14, pp. 490-500.
143. Zhou, P., *et al*, 2007. Overexpression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol Ther*, 6, pp. 426-431.