



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS
PRINCIPALES REGULADORES DE LA
BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN CÁNCER Y SU
ASOCIACIÓN CON EL MICROAMBIENTE
TUMORAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

ABRAHAM ALVAREZ PULIDO

ASESORA: DRA. AIDA SUSANA ROMERO GARCÍA

CO-ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2016



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

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Análisis transcripcional de los principales reguladores de la biogénesis mitocondrial en cáncer y su asociación con el microambiente tumoral.

Que presenta el pasante: **Abraham Alvarez Pulido**
Con número de cuenta: 309112866 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Agosto de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Andrea Larisa González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cáncer Pulmonar de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" bajo la dirección de la Dra. Aida Susana Romero García.

Dedicatorias

A mi familia, porque cuando estoy triste o molesto, siempre cuento con mi madre para consolarme, con mi padre para darme fuerzas, con mi hermanos para hacerme sonreír, y así no hay forma de estar triste o molesto por mucho tiempo. Los amo.

A mi abuela, la persona más valiente que he conocido. Te amo y te extraño mucho.

Agradecimientos

A mi segunda casa la UNAM FES Cuautitlán, por enseñarme tantas cosas. Porque el camino no es fácil, pero las experiencias y conocimientos que he ganado son invaluable

A mis amigos Allan, Julio, Alejandro y Jair. A mis amigas Paola, Larissa (Lo mejor de la FESC) y Vaneesa. Estoy agradecido con Dios por haber puesto en mi camino a personas tan especiales como ustedes.

A los Dres. Heriberto y Susana por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes y a mis compañeros de laboratorio Aldo, Rosa y Osvaldo, que hicieron mi estancia en el laboratorio muy agradable.

Les agradezco a mis Tíos Guillermo y Juana por nunca dejarme solo y siempre apoyarme cuando más lo he necesitado.

A mis sinodales, la Dra. María Esther Revuelta Miranda, Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, M. en C. Maritere Domínguez Rojas, QFB. Alejandro Gutiérrez García, LBD. Andrea Larisa González Salcedo, por su tiempo y apoyo en la revisión de este trabajo.

Y le agradezco a Dios por todo las bendiciones que me ha dado. Porque con él lo puedo todo.

ÍNDICE

RESUMEN	I
1. GENERALIDADES DEL CÁNCER	1
1.1. MARCAS DE CLASE DEL CÁNCER	1
1.1.1. Señales de crecimiento autosuficiente	1
1.1.2. Evasión a la muerte celular	1
1.1.3. Replicación ilimitada	2
1.1.4. Angiogénesis	2
1.1.5. Invasión de tejidos y metástasis.....	3
1.1.6. Evasión de la respuesta inmune.....	3
1.1.7. Teoría de la Reprogramación metabólica	4
1.2. CÁNCER PULMONAR	4
1.2.1. Tipos histológicos del cáncer pulmonar.....	4
1.2.2. Incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón en México	5
2. GENERALIDADES DEL METABOLISMO DE CÉLULAS NO MALIGNAS	7
2.1. CÉLULA NO MALIGNA	7
2.1.1. Citosol y glicólisis	7
2.1.2 Mitocondria	8
3. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL	14
3.1. PRINCIPALES FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL	14
3.1.1. AMPK: Proteína cinasa activada por AMP	14
3.1.2. PGC-1 α : Coactivador-1alfa del Receptor-gamma activado por el proliferador de peroxisoma.....	16
3.1.3. NRF-1: Factor Respiratorio Nuclear 1	16
3.1.4. NRF-2: Factor Respiratorio Nuclear 2	16
3.1.5. TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A.....	17
3.1.6. HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 α	18
3.1.7. CS: Citrato sintasa	18
4. ANTECEDENTES METABOLICOS EN CÉLULAS TUMORALES	19
4.1. METABOLISMO DE CÉLULAS TUMORALES	19

4.1.1. Reprogramación metabólica	19
4.1.2. Efecto Warburg	19
4.2. MICROAMBIENTE TUMORAL	21
4.2.1. Hipoxia	21
4.2.2. Acidosis	22
4.2.3. Lactosis	22
4.3. MITOCONDRIA Y CÁNCER	23
4.3.2. Modificaciones encontradas en la biogénesis mitocondrial de las células tumorales	23
5. JUSTIFICACIÓN	29
6. OBJETIVOS	30
6.1. OBJETIVO GENERAL	30
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES	30
7. HIPÓTESIS	31
8. MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1. ESQUEMA DE TRABAJO	32
8.2. LÍNEAS CELULARES	32
8.3. REACTIVOS	33
8.4. EQUIPOS	33
8.5. CULTIVO CELULAR	33
8.6. CONDICIONES DE CULTIVO	34
8.7. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL	34
8.8. RETROTRANSCRIPCIÓN	36
8.9. ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE qPCR	36
8.9.1. Matriz de Oligos para: 18S, AMPK, PGC-1 α , NRF-1, NRF-2, TFAM, HIF-1 α y CS	37
8.9.2. Curva de disociación para los genes: 18S, AMPK, PGC-1 α , NRF-1, NRF-2, TFAM, HIF-1 α y CS	39
8.9.3. Curvas estándar	39
8.10. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR) ..	39
.....	39
8.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
9. RESULTADOS	42

9.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL	42
9.1.1. Matriz de oligonucleótidos	42
9.1.2. Curva de disociación	43
9.1.3. Curvas Estándar	44
9.2. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES AMPK, PGC-1A, NRF-1, NRF-2, TFAM, HIF-1A Y CS	46
9.2.1. Expresión relativa de la AMPK	46
9.2.2. Expresión relativa de PGC-1α	47
9.2.3. Expresión relativa de NRF-1	48
9.2.4. Expresión relativa de TFAM	49
9.2.5. Expresión relativa de NRF-2	50
9.2.6. Expresión relativa de HIF-1α	51
9.2.7. Expresión relativa de la citrato sintasa (CS)	52
10. DISCUSIÓN	54
11. CONCLUSIONES	59
12. REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figuras

Figura 1. Glicólisis.....	8
Figura 2. Mitocondria.....	10
Figura 3.Ciclo de Krebs.....	11
Figura 4. Fosforilación oxidativa.....	13
Figura 5. Regulación del proceso de Biogénesis mitocondrial.....	15
Figura 6. TFAM.....	17
Figura 7. Efecto Warburg y el metabolismo de la glucosa.....	20
Figura 8. Hipoxia en un tumor sólido.....	21
Figura 9. Curva de disociación.....	42
Figura 10. Curvas de disociación correspondientes a cada gen de estudio.....	43
Figura 11. Curvas estándares correspondientes a cada gen.....	45
Figura 12. Cuantificación relativa de mRNA del gen AMPK.....	47
Figura 13. Cuantificación relativa de mRNA del gen PGC-1 α	48
Figura 14. Cuantificación relativa de mRNA del gen NRF-1.....	49
Figura 15. Cuantificación relativa de mRNA del gen TFAM.....	50
Figura 16. Cuantificación relativa de mRNA del gen NRF-2.....	51
Figura 17. Cuantificación relativa de mRNA del gen HIF-1 α	52
Figura 18. Cuantificación relativa de mRNA del gen citrato sintasa.....	53

ÍNDICE DE TABLAS.

Tablas

Tabla 1. Concentración de los oligos utilizados en la matriz.....	37
Tabla 2. Características de los oligos empleados.....	37

ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
CS	Citrato sintasa
cDNA	DNA complementario
Glu	Glucosa
H	Hipoxia
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 subunidad alfa
Lac	Lactato
mtDNA	DNA mitocondrial
N	Normoxia
NRF-1	Factor Respiratorio Nuclear 1
NRF-2	Factor Respiratorio Nuclear 2
PGC-1α	Coactivador-1alfa del Receptor-gamma activado por el proliferador de peroxisoma
qPCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real
RT	Retrotranscripción
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A

RESUMEN

La mitocondria es un organelo en el que se llevan a cabo funciones importantes como el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa proporcionando la energía celular necesaria en forma de ATP. Al proceso de generación de nuevas mitocondrias a partir de las ya existentes se le conoce como biogénesis mitocondrial. Este proceso intervienen diferentes reguladores de la transcripción siendo los más importantes: AMPK, PGC-1 α , NRF-1, NRF-2, TFAM, además incluyó a la CS y HIF-1 α . En este trabajo se llevó a cabo la determinación de los niveles de expresión de los reguladores arriba mencionados por medio de la técnica de PCR en tiempo real, en dos líneas de adenocarcinoma pulmonar (A-549 y A-427), una línea de cáncer de mamá (MCF-7) y células de fibroblastos pulmonares (MRC-5), las cuales fueron cultivadas bajo diferentes condiciones variando la fuente de carbono (glucosa y lactato), pH (7.2 y 6.2) y tensión de oxígeno (normoxia e hipoxia).

Los resultados indican que la variación en las condiciones de cultivo afecta la expresión de los reguladores arriba mencionados de diferente manera en cada línea tumoral incluida en este estudio, en relación a los niveles de expresión de dichos reguladores en las células no transformadas MRC-5.

1. GENERALIDADES DEL CÁNCER

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por una descontrolada proliferación celular (Pierce, 2009). Se caracteriza por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división celular. Las células cancerosas se dividen rápida y continuamente, por lo que desplazan a las células normales y finalmente privan a los tejidos sanos de sus nutrientes (Pierce, 2009).

1.1. MARCAS DE CLASE DEL CÁNCER

Las marcas de clase del cáncer se conocen como las capacidades funcionales adquiridas por las células neoplásicas que les permite sobrevivir, proliferar y diseminarse. Se han reportado 8 características distintivas que adquiere una célula durante su progresión a célula maligna (Hanahan y Weinberg, 2011):

1.1.1. Señales de crecimiento autosuficiente

En los tejidos normales se encuentra controlada cuidadosamente la producción y liberación de las señales de crecimiento, las cuales instruyen la entrada y progresión de la célula en la división y crecimiento, asegurando así la homeostasis celular, el número de células, y manteniendo una arquitectura normal del tejido, así como una correcta función. Las células cancerosas presentan una desregulación en estas señales. Las señales que permiten esta desregulación son transmitidas por factores de crecimiento que se unen a la membrana de la célula, desencadenando vías de señalización intracelulares que se encuentran relacionadas con el ciclo celular, así como con el crecimiento.

1.1.2. Evasión a la muerte celular

La apoptosis es la muerte celular programada que conduce a la eliminación de células que presentan un daño (Alberts et al, 2006). Dentro de las características

morfológicas de la apoptosis se encuentran la formación de cuerpos apoptóticos, encogimiento del núcleo, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA. La célula apoptótica será fagocitada por macrófagos y otras células fagocíticas (Koolman, 2005). En el caso de las células tumorales, éstas presentan una variedad de estrategias para poder burlar la muerte programada. Una de las más comunes es la pérdida de la función tumoral supresora de P53, eliminando así el sensor crítico de daño al DNA, que induce la apoptosis. También se ha visto que en algunos tumores se encuentran elevados los niveles de expresión de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2-BclXL) o la desregulación de factores proapoptóticos (Bax, Bim, PUMA) (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.3. Replicación ilimitada

En los tejidos, las células normales tienen la capacidad de pasar por un número limitado de ciclos de crecimiento y división. Se ha encontrado que en condiciones normales, los telómeros, que protegen las terminaciones de los cromosomas, se van acortando progresivamente durante los ciclos de división, perdiendo así su capacidad protectora (Hanahan y Weinberg, 2011). La telomerasa, una DNA polimerasa encargada de añadir repetidos teloméricos a las terminaciones de los cromosomas, está casi ausente en células normales, pero se ha observado una expresión en niveles significativos en la mayoría de las células tumorales. Esta enzima, al evitar la erosión de los telómeros, va a generar una resistencia a la inducción de la senescencia y apoptosis, lo que conlleva a una continua división celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.4. Angiogénesis

Una vez que la masa del tumor ha alcanzado un tamaño crítico, las células tumorales que se localizan a una mayor distancia de los vasos sanguíneos, pueden carecer de un suministro adecuado de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, las células tumorales pueden llevar a cabo la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos, a partir de los vasos sanguíneos preexistentes, un proceso

conocido como angiogénesis (Baeriswyl y Christofori, 2009). Este proceso, no sólo proporciona oxígeno y nutrientes para al tumor, sino también ofrece una ruta a las células tumorales, para diseminarse a través del torrente sanguíneo a órganos distantes y formar metástasis. En este proceso de formación de redes vasculares, participan moléculas que favorecen la angiogénesis (pro-angiogénicas) y moléculas que la inhiben (anti-angiogénicas) (Hanahan y Weinberg, 2011). Entre las principales moléculas pro-angiogénicas involucradas, se encuentran: el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF1/2).

1.1.5. Invasión de tejidos y metástasis

Las células tumorales que han desarrollado la capacidad de invadir tejidos normales adyacentes, y la capacidad de diseminarse en el cuerpo a través de la circulación sanguínea o el sistema linfático (metástasis) son las más letales (Cooper y Hausman, 2007). Este desprendimiento es debido a que la célula tumoral desarrolla alteraciones morfológicas y alteraciones en la adhesión a la matriz extracelular de otras células. Una de las alteraciones mejor caracterizada involucrada en el proceso de metástasis, es la pérdida de la molécula de adhesión E-cadherina, una molécula clave en la unión célula-célula, y se ha observado que la disminución de la expresión de esta molécula favorece el proceso de invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.6. Evasión de la respuesta inmune

Esta marca de clase propone que las células y los tejidos son constantemente monitoreados por un sistema inmune que se encuentra siempre alerta. Esta supervisión es la responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de las células tumorales incipientes de aquellos tumores nacientes (Hanahan y Weinberg, 2011).

Sin embargo, a medida que el tumor progresa, estas células crean mecanismos de evasión de la respuesta inmune que les permite crecer y proliferar sin restricción inmune (Teoría de la inmunoedición) (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.7. Teoría de la Reprogramación metabólica

En 1920, Otto Warburg observó que las células tumorales incrementaban su consumo y metabolismo de la glucosa con la producción de ácido láctico aún en presencia de oxígeno, fenómeno también conocido como glicólisis aeróbica (Hanahan y Weinberg, 2011). Estudios más recientes han reportado el aumento en la expresión de transportadores de glucosa, GLUT1 y GLUT4. (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2. CÁNCER PULMONAR

Se denomina cáncer de pulmón a todo el conjunto de neoplasias malignas con origen en las células que componen a las vías aéreas y el parénquima pulmonar, excluyendo así a las metástasis pulmonares de otros tumores (Arias, 2000).

1.2.1. Tipos histológicos del cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón se divide en cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Carcinoma pulmonar de células pequeñas. Corresponde a un tipo de tumor muy agresivo, de origen neuroendócrino el cual tiende a diseminarse con facilidad. Usualmente tiene localización peribronquial con infiltración hacia la submucosa bronquial y el tejido peribronquial. Con frecuencia estos tumores muestran necrosis extensa y se diseminan rápidamente, incluso antes de presentar síntomas (Ricard, 2008).

Carcinoma pulmonar de células no pequeñas. Se origina a partir de células epiteliales. Este tipo se subclasifica en adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma de células grandes (Gridelli et al, 2015). El carcinoma tipo adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente, se deriva del epitelio que integra a los alveolos y las glándulas mucosas bronquiales, es de localización periférica, afectando incluso a la pleura o pared torácica.

El carcinoma de células epidermoide o de células escamosas se deriva del epitelio bronquial o bronquios proximales, por tanto son de localización central. Al crecer puede obstruir el bronquio.

Por último el carcinoma de células grandes es la variedad menos frecuente y de pobre pronóstico, se presenta habitualmente como una masa de tejido de localización periférica, con afectación del hilio pulmonar. Tiene dos variantes: el carcinoma de células claras y el carcinoma de células gigantes (Ricard, 2008).

1.2.2. Incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón en México

A nivel mundial el cáncer de pulmón reporta una incidencia de 1,241,601 casos (16.8.0%) y una mortalidad 1,098,702 de casos (23.6%) del total de casos diagnosticados. De estos casos, el carcinoma de pulmón de células no pequeñas, representa aproximadamente el 85% de los casos de cáncer pulmonar, mientras que el carcinoma de células pequeñas representa el 15% (Gridelli et al, 2015).

El cáncer de pulmón en México reporta una incidencia del 5,471 casos (8.3%) y una mortalidad 4,945 casos (12.8%) (Globocan, 2012) siendo este tipo la tercera causa de muerte, sólo por debajo del cáncer de mama y del cáncer de próstata.

En el desarrollo del cáncer pulmonar se encuentran involucrados múltiples factores, entre los cuales se encuentra el tabaquismo, la predisposición hereditaria y los factores ambientales. Mundialmente, el cáncer pulmonar es asociado con el tabaquismo en el 80% de los hombres y el 50% de las mujeres, aunque el

tabaquismo pasivo también es asociado con el incremento del riesgo de desarrollo de este padecimiento (Gridelli et al, 2015).

2. GENERALIDADES DEL METABOLISMO DE CÉLULAS NO MALIGNAS

2.1. CÉLULA NO MALIGNA

Una célula es la unidad estructural básica de los organismos, rodeada por una membrana, compuesta por citoplasma y en el caso de las eucariontes este tipo de células posee un núcleo (Curtis y Schnek, 2008), en este caso, se hace referencia a una célula eucariota animal.

2.1.1. Citosol y glicólisis

En el citoplasma se pueden distinguir el citosol, la fracción citoplasmática rica en proteínas y lugar donde se lleva a cabo el proceso de la glicólisis (Curtis y Schnek, 2008).

La glicólisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas es una secuencia de 10 reacciones enzimáticas en las que una molécula de glucosa se convierte en dos moléculas de piruvato con la generación de 2 ATP (Fig. 1) (Curtis y Schnek, 2008).

La glucosa ingresa a las células por medio de transportadores específicos (Voet et al, 2009).

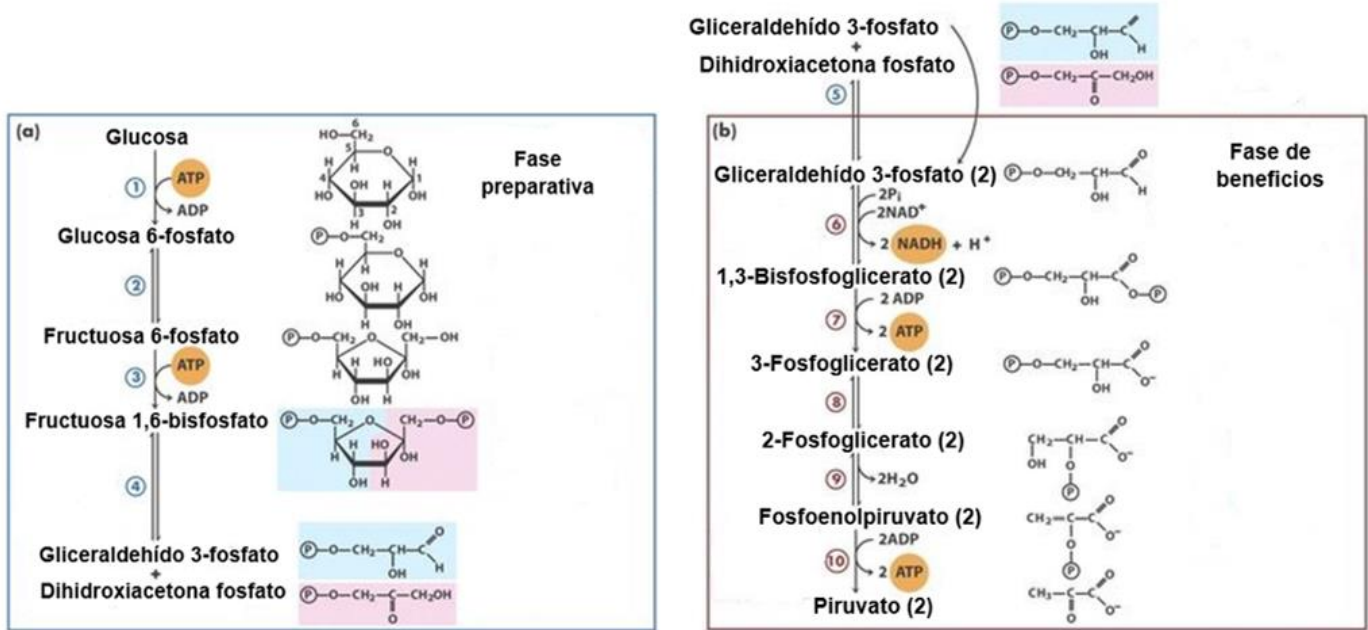


Figura 1. Glicólisis. Esta ruta metabólica se divide en dos: a) la fase preparativa en donde se realiza la fosforilación de la glucosa y su conversión a gliceraldehído 3-fosfato y b) la fase de beneficios en donde se lleva a cabo la conversión oxidativa del gliceraldehído 3-fosfato a piruvato, acompañado de la formación de ATP y NADH. Las enzimas que catalizan las reacciones de esta vía son: 1. Hexocinasa. 2. Fosfoglucosa isomerasa. 3. Fosfofructocinasa. 4. Aldolasa. 5. Triosa fosfato isomerasa. 6. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. 7. Fosfoglicerato cinasa. 8. Fosfoglicerato mutasa. 9. Enolasa. 10. Piruvato cinasa
Modificado de Nelson y Cox, 2005.

2.1.2 Mitocondria

La mitocondria es un organelo en el que se lleva a cabo funciones importantes, incluyendo la oxidación del piruvato y los ácidos grasos, el metabolismo del nitrógeno y la biosíntesis del grupo hemo, entre otros. Además, la mitocondria es el sitio de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa que proporciona la mayor parte de la energía celular en forma de ATP (Scarpulla, 2008).

2.1.2.1. Estructura y funciones

El tamaño y la forma de las mitocondrias varían en función del origen celular y su estado metabólico. En los casos típicos son elipsoides de $\sim 0.5\mu\text{m}$ de diámetro y $1\mu\text{m}$ de largo (Voet et al, 2009).

Estructuralmente, la mitocondria posee una doble membrana que delimitan al espacio intermembranal y a la matriz mitocondrial. La membrana interna se encuentra plegada, formando crestas, las cuales albergan los complejos enzimáticos usados para llevar a cabo la fosforilación oxidativa (Fig. 2) (Aravamudan et al, 2013).

La matriz mitocondrial presenta una sustancia tipo gel constituida aproximadamente de 50% agua, en donde se encuentran gran cantidad de enzimas solubles del metabolismo oxidativo (por ejemplo, enzimas del ciclo de Krebs, así como sustratos, cofactores e iones inorgánicos). También se encuentra la maquinaria genética mitocondrial (DNA, RNA y ribosomas) (Voet et al, 2009).

La membrana exterior se encuentra compuesta aproximadamente el 50% por lípidos y 50% por proteínas, entre las cuales se encuentra la porina que la hace permeable a ciertas moléculas. En comparación, la membrana mitocondrial interna es menos permeable, contiene un 80% de su masa en proteínas y 20% en lípidos (Lodish, 2006), siendo permeable al O₂, CO₂, H₂O. Además de las proteínas de la cadena respiratoria contiene numerosas proteínas transportadoras que controlan el pasaje de metabolitos como ATP, ADP, piruvato, Ca²⁺ y fosfato (Voet et al, 2009).

La mitocondria posee su propio material genético, heredado maternalmente, además de la maquinaria transcripcional, que le concede la capacidad de auto-replicarse (Aravamudan et al, 2013). El genoma mitocondrial consiste en una molécula de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 16.5kb, que se pueden encontrar en pequeños grupos llamados nucleoides o condrocitos, que varían de tamaño y número en respuesta a las condiciones fisiológicas (Nosek y Tomáška, 2003).

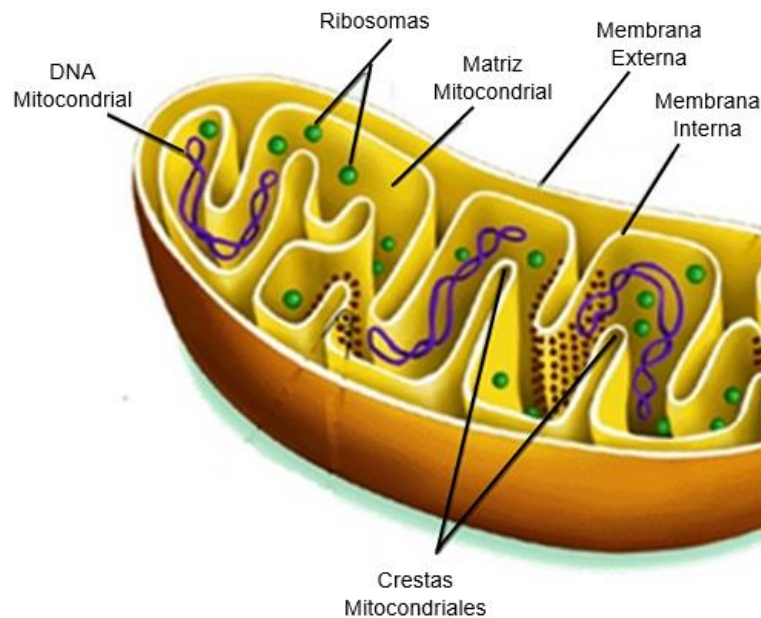


Figura 2. Mitocondria. Las células eucariotas contienen un gran número de mitocondrias, las cuales son esenciales para el metabolismo celular. En este organelo lleva a cabo la deshidrogenación del piruvato, ciclo de Krebs, y fosforilación oxidativa, proceso mediante el cual se sintetiza casi todo el ATP celular (Cannino et al, 2007).

2.1.2.2. Rutas metabólicas mitocondriales de interés

En la mitocondria se lleva a cabo la respiración, que consiste en dos etapas: el ciclo de Krebs y el transporte de electrones (Curtis y Schnek, 2008).

2.1.2.2.1. Ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs, también llamado ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o ciclo del ácido cítrico, consiste en una serie de reacciones bioquímicas en las que la gran cantidad de energía química potencial almacenada en la acetil-CoA se libera en forma gradual (Fig. 3). El ciclo de Krebs es la ruta de oxidación de todos los combustibles metabólicos en condiciones aeróbicas (Tortora, 2007).

El piruvato obtenido de la glicólisis sufre una oxidación para dar lugar al acetil-coenzima A (acetil-CoA). Los grupos acetilo se incorporan al ciclo de Krebs, donde

son oxidados enzimáticamente, produciendo un GTP y donando electrones a varias moléculas portadoras de electrones como el NAD^+ y el FAD^+ (Nelson y Cox, 2005).

El ciclo de Krebs también produce precursores de rutas anabólicas. Los productos intermedios del ciclo pueden ser transformados en aminoácidos, ácidos grasos e isoprenoides, porfirinas o inclusive en glucosa a través de la gluconeogénesis.

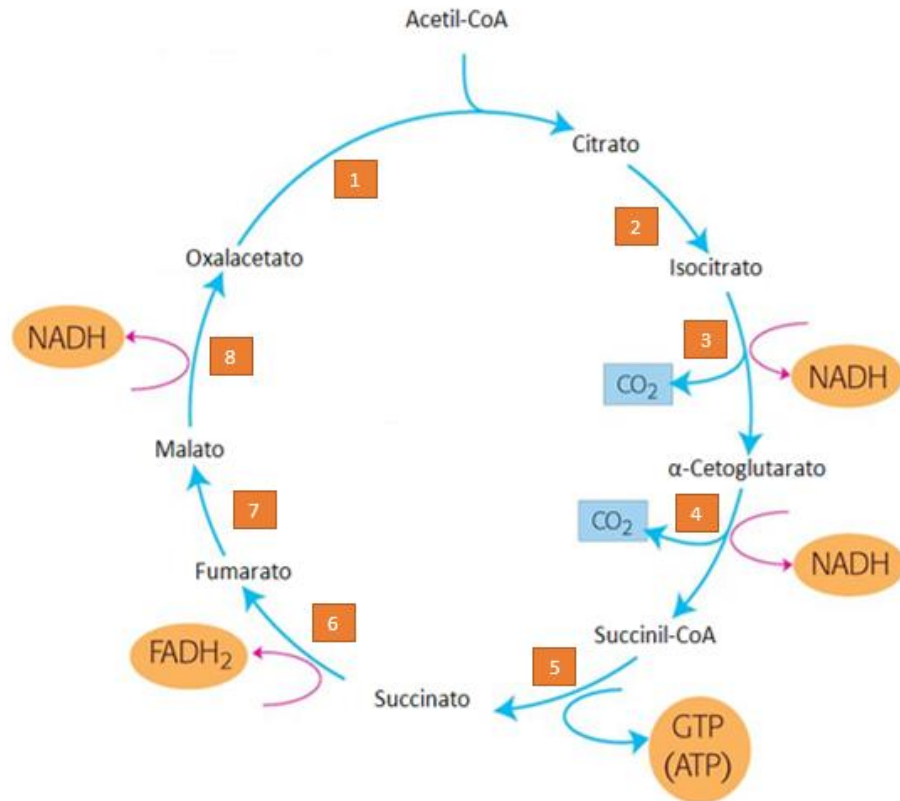


Figura 3. Reacciones que conforman al ciclo de Krebs. 1) Citrato sintasa, 2) Aconitasa, 3) Isocitrato deshidrogenasa, 4) Complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa, 5) La succinil-CoA sintetasa, 6) Succinato deshidrogenasa, 7) Fumarasa, 8) Malato deshidrogenasa (Nelson y Cox, 2005).

2.1.2.2 Fosforilación Oxidativa

En la fosforilación oxidativa, la cadena de transporte de electrones acepta los electrones cedidos por el NADH y el FADH_2 produciendo la reducción del O_2 en H_2O . La energía liberada en cada paso de la cadena se almacena en una forma de gradiente electroquímico que la mitocondria puede emplear para sintetizar ATP. La

fosforilación oxidativa es responsable de casi el 90% del ATP generado por la célula (Campbell, 2007).

La cadena transportadora de electrones contiene tres complejos protéicos (complejos I, II y IV) integrados en la membrana mitocondrial interna y dos moléculas transportadoras móviles, la ubiquinona (coenzima Q) y el citocromo C (Fig. 4). Se considera que la enzima succinato deshidrogenasa, que participa en el ciclo de Krebs, también forma parte de la cadena respiratoria como complejo II. El complejo V es la ATP-sintasa, aunque esta enzima no interviene en el transporte de electrones. Todos los complejos de la cadena respiratoria están formados por numerosos polipéptidos que contienen una serie de cofactores redox unidos a las proteínas. Estos complejos son: el complejo NADH-deshidrogenasa, el complejo II Succinato-deshidrogenasa, el complejo III Ubiquinol-citocromo C, el complejo IV Citocromo-oxidasa C y el complejo V: ATP-sintetasa transportadora de H⁺ (Koolman, 2005).

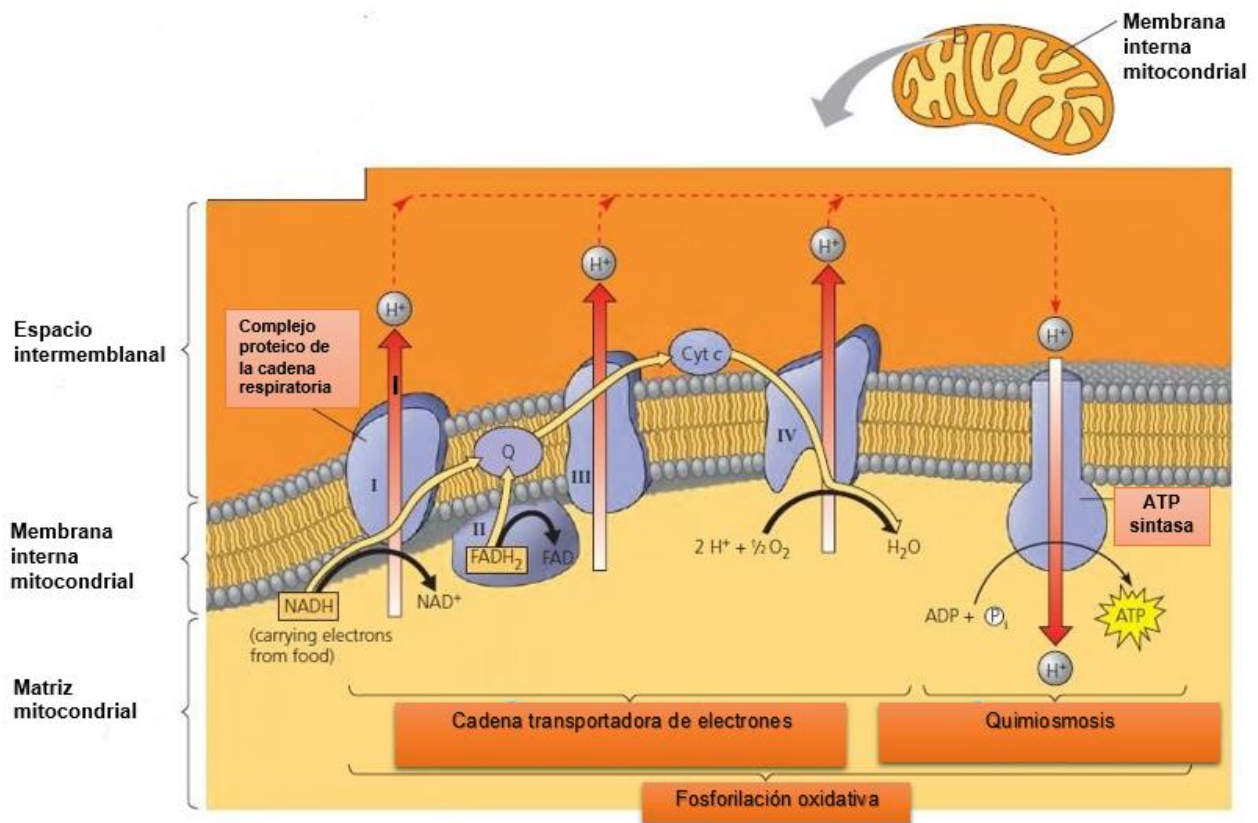


Figura 4. Fosforilación oxidativa. El primer paso corresponde a la pérdida de un ion hidruro del NADH, obteniendo un protón y dos electrones. Estos electrones son captados por el complejo I, quien los transfiere a la coenzima Q (o ubiquinona). Durante este proceso el complejo I bombea 4 protones al espacio intermembranal. Los electrones provenientes del FADH₂, al interactuar con el complejo dos, entran directamente por la coenzima Q. Posteriormente se transfieren los electrones de la ubiquinona al citocromo C, por acción del complejo III, lo que genera el bombeo de 4 protones más al espacio intermembranal. Por último, el complejo IV transfiere los electrones del citocromo C al oxígeno, reduciéndolo a agua y bombeando en el proceso dos protones al espacio intermembranal. En la ATP sintetasa, mediante el flujo de protones a favor del gradiente (quimiosmosis), se generan cambios conformacionales en el sitio catalítico de la enzima, lo que conlleva a la síntesis y liberación de ATP (Koolman, 2005).

3. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

La biogénesis mitocondrial puede ser definida como la división de las mitocondrias preexistentes (Jornayvaz y Shulman, 2010). Para llevar a cabo una correcta biogénesis mitocondrial se requiere de la síntesis coordinada de aproximadamente 1000-1500 proteínas codificadas por el genoma nuclear y sintetizadas en los ribosomas del citosol (Jornayvaz y Shulman, 2010).

En los seres humanos, sólo 13 proteínas son codificadas por el DNA mitocondrial. Por lo tanto, existen mecanismos en la mitocondria que aseguran la correcta importación y translocación de las distintas proteínas mitocondriales que son sintetizadas en los ribosomas citosólicos (Baker et al, 2007).

3.1. PRINCIPALES FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

La biogénesis mitocondrial requiere de la expresión de un gran número de genes codificados tanto en el núcleo como en el genoma de la mitocondria (Cannino et al, 2007). Siendo los principales factores de transcripción involucrados en biogénesis mitocondrial los siguientes:

3.1.1. AMPK: Proteína cinasa activada por AMP

AMPK es una cinasa sensora de la energía. AMPK está compuesto por una subunidad α catalítica, una subunidad β y una γ . Las subunidades α contienen un dominio típico de serina / treonina cinasa en el extremo N-terminal, seguido por un dominio auto inhibitorio que parece mantener a la cinasa en una conformación inactiva en ausencia de AMP, y un dominio C-terminal que hace contacto con las subunidades β y γ (Hardie^a, 2011).

En mamíferos, la AMPK es activada por el aumento en la relación AMP:ATP, éste puede ser causado por un estrés metabólico que interfiere con la producción de ATP

(por ejemplo, en hipoxia) o por un acelerado consumo de ATP (por ejemplo en la contracción muscular). Y debido a que la privación de glucosa puede incrementar la relación AMP:ATP, AMPK podría considerarse como sensor de glucosa (Hardie^b, 2011).

También se ha observado que esta proteína, es un regulador importante involucrado en la biogénesis mitocondrial, la cual fosforila directamente a PGC-1 α (Fig. 5) (Scarpulla, 2008, Jornayvaz y Shulman, 2010).

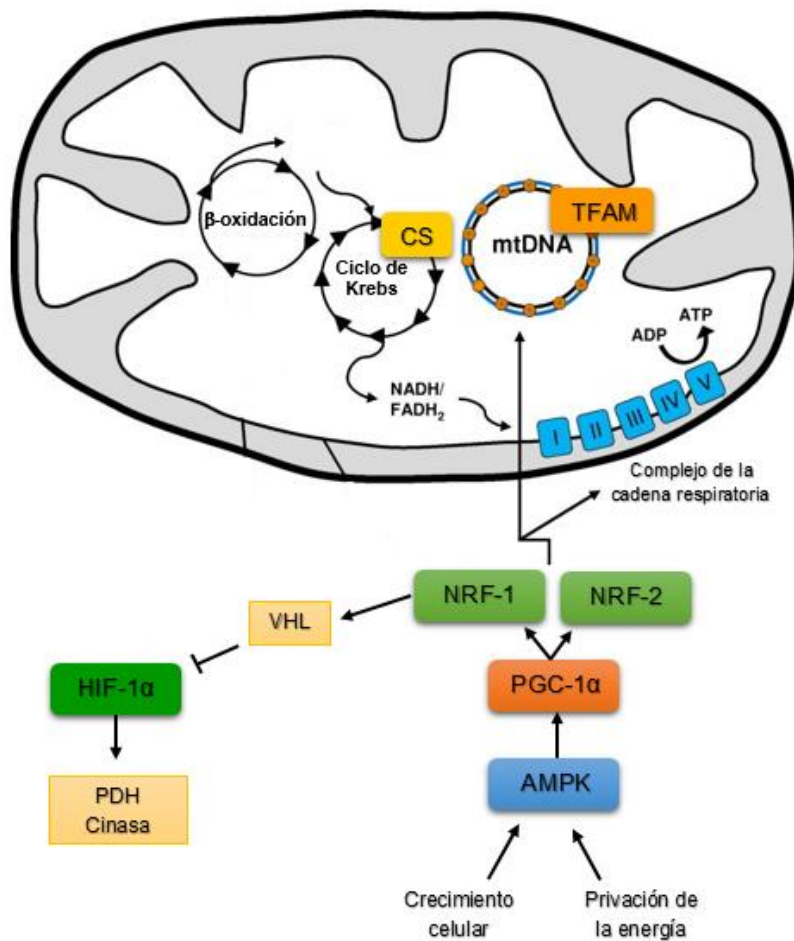


Figura 5. Regulación del proceso de biogénesis mitocondrial. Interacción entre PGC-1 α y los principales factores de transcripción (NRF-1, NRF-2 y TFAM) involucrados en la replicación y mantenimiento del mtDNA, transcripción de subunidades del complejo de la cadena respiratoria así como del proceso de la biogénesis del organelo. NRF-1 además actúa regulando la expresión de HIF-1 α al colaborar con la expresión de la proteína VHL, favoreciendo el marcaje y degradación HIF-1 α . Modificado de Scarpulla, 2008.

3.1.2. PGC-1 α : Coactivador-1alfa del Receptor-gamma activado por el proliferador de peroxisoma

PGC-1 α es miembro de una familia de coactivadores transcripcionales y está caracterizado por un dominio N-terminal con motivos ricos en leucina, que median la interacción con receptores nucleares y dominios de reconocimiento al RNA (Scarpulla, 2008).

PGC-1 α es un factor de regulación co-transcripcional que induce la biogénesis mitocondrial al activar la transcripción de diferentes factores transcripcionales, en los que se encuentran NRF-1 y NRF-2, que a su vez promueven la expresión TFAM (Fig. 5) (Jornayvaz y Shulman, 2010).

3.1.3. NRF-1: Factor Respiratorio Nuclear 1

NRF-1 es a un factor de transcripción que funciona como un homodímero, que activa la expresión de genes clave, como TFAM, requeridos para la respiración celular, biosíntesis del grupo hemo, y la replicación y transcripción del DNA mitocondrial (Scarpulla, 2008).

Inicialmente fue identificado por su unión al promotor del citocromo C, funcionando como un regulador transcripcional positivo (Fig. 5) (Scarpulla, 2008)

3.1.4. NRF-2: Factor Respiratorio Nuclear 2

Este gen corresponde a un factor de transcripción multisubunitario que está involucrado en la expresión de la citocromo oxidasa y el control nuclear de la función mitocondrial. La proteína está compuesta por 5 subunidades. Una subunidad α de unión al DNA, y 4 subunidades más (β_1 , β_2 , γ_1 y γ_2), que en unión con la subunidad α , proporciona un dominio de activación y modulación de afinidad de unión al

genoma. Fue identificado como un activador transcripcional del promotor del citocromo oxidasa subunidad IV (COXIV) (Scarpulla, 2008).

Se ha reportado que tanto NRF-1 como NRF-2, tienen un papel directo en la expresión de las 10 subunidades de la citocromo oxidasa codificadas en el núcleo (Fig. 5) (Scarpulla, 2008).

3.1.5. TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A

El factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), también denominado mtTFA, es un factor de transcripción mitocondrial clave para realizar la replicación y transcripción del genoma mitocondrial (Scarpulla, 2008). TFAM corresponde a una proteína codificada en el núcleo, que se une y promueve la transcripción del mtDNA. TFAM no sólo regula la replicación y transcripción del mtDNA, también es esencial para el mantenimiento de éste, la biogénesis mitocondrial, así como para la función del organelo (Fig. 5) (Balliet et al, 2011, Campbell et al, 2012).

Existen aproximadamente 1000 moléculas de TFAM por cada molécula de mtDNA, siendo suficientes para poder cubrir una molécula de mtDNA, ya que TFAM ocupa aproximadamente un espacio de 25 nucleótidos (Fig. 6) (Kang et al, 2007).

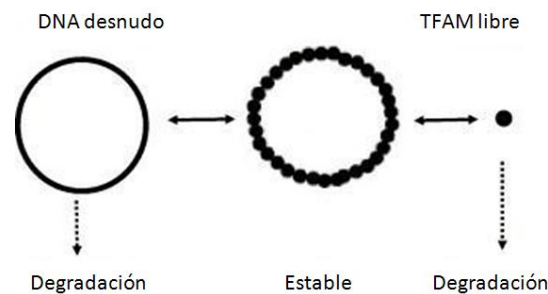


Figura 6. TFAM. TFAM, es representado por un círculo de color negro. Tanto el mtDNA desnudo, como TFAM libre son inestables en la mitocondria y son rápidamente degradados. La cantidad de mtDNA existe en relación que tanto puede TFAM cubrir, lo que significa que TFAM cubre la masa de mtDNA, más no el número de copias (Kang et al, 2007).

3.1.6. HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 α

En respuesta a la hipoxia tumoral, se activan múltiples genes que lideran la angiogénesis, metástasis, resistencia a fármacos y la invasión, esto es debido a la estabilización de HIF. HIF existe como un heterodímero formado por dos subunidades la α y la β (Nagaraju et al, 2015). Aunque se han encontrado 3 formas de la subunidad α , HIF-1 α , 2 α , 3 α , la mayoría de la actividad transcripcional se debe a las primeras 2 formas (Ranasinghe et al, 2015).

Bajo condiciones de normoxia, la proteína prolihidroxilasa (PHD), hidroxila a HIF-1 α en dos residuos de prolina (Pro 402/564) (Kim et al, 2007), lo que conlleva a la ubiquitinación de HIF-1 α por acción de una proteína ligasa E3 llamada Von Hippel-Lindau (pVHL) y su posterior degradación vía proteosoma (Nagaraju et al, 2015). Por otra parte, en condiciones en hipoxia, HIF-1 α se estabiliza y dimeriza con HIF-1 β . Una vez unidos, el dímero se une a los elementos de respuesta de hipoxia (HRE) del DNA, para comenzar la transcripción de múltiples factores de transcripción (Fig. 5).

3.1.7. CS: Citrato sintasa

La citrato sintasa (CS), es una enzima clave que participa en el ciclo de Krebs, ya que cataliza la condensación de la acetil-CoA y el oxaloacetato. Esta corresponde a la reacción inicial del ciclo de Krebs (Voet et al, 2009). Esta enzima, en células eucariotas, es codificada por el genoma nuclear, sintetizada en el ribosoma citoplasmático y ejerce su función en la matriz mitocondrial (Chen et al, 2014).

4. ANTECEDENTES METABOLICOS EN CÉLULAS TUMORALES

4.1. METABOLISMO DE CÉLULAS TUMORALES

Se ha observado que en células tumorales, las vías de señalización intracelulares que promueven la proliferación celular pueden estar constantemente encendidas, lo que conlleva a una división celular descontrolada. Para soportar esta continua proliferación, la capacidad biosintética de la célula se ve incrementada (síntesis de ácidos grasos y ácidos nucleicos). En contraste, la β -oxidación de los ácidos grasos está suprimida o minimizada al igual que los ciclos fútiles. Estos cambios incrementan la autonomía metabólica de la célula transformada, lo que les permite adquirir un fenotipo anabólico mejorado (Romero-García et al, 2011).

4.1.1. Reprogramación metabólica

La proliferación desregulada de células tumorales se asocia generalmente con la alteración del metabolismo energético. Las células tumorales obtienen energía principalmente de la glucosa a través de la glicólisis, pero obteniendo ácido láctico, incluso en condiciones aeróbicas (Choi et al, 2013). Esta reprogramación se puede resumir como la modificación en los flujos metabólicos en respuesta a las grandes demandas de energía debido a la continua proliferación celular, adoptando un metabolismo predominantemente glicolítico.

4.1.2. Efecto Warburg

A principios del siglo XX, Otto Warburg observó que los tumores consumían grandes cantidades de glucosa y que la glucosa se fermentaba para producir lactato incluso en presencia de oxígeno, de aquí el término de "glucólisis aeróbica". Este fenómeno también es conocido como el "efecto de Warburg" (Liberti y Locasale, 2016).

Warburg originalmente propuso que las células tumorales desarrollaban un defecto en las mitocondrias que conducía a la alteración de la respiración aeróbica y una posterior dependencia del metabolismo glicolítico (Vander Heiden et al, 2009), especulando que para tener una alteración metabólica era necesario un defecto mitocondrial (Fig. 7) (Choi et al, 2013).

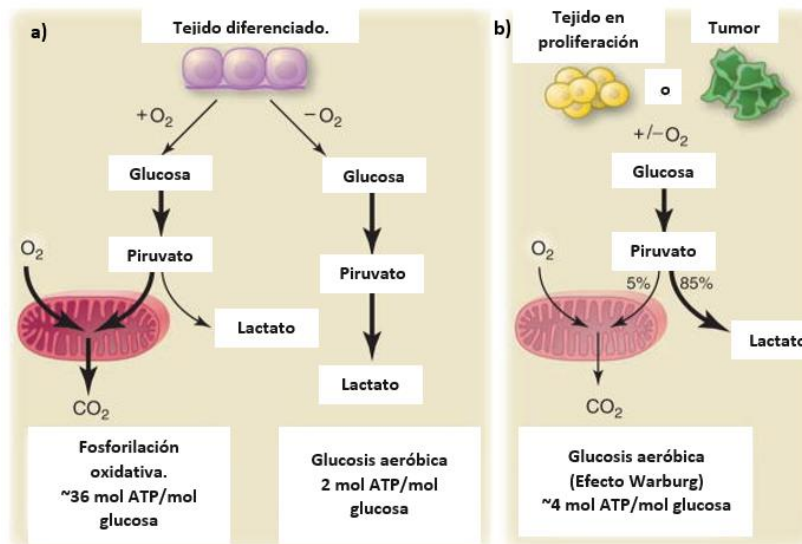


Figura 7. Efecto Warburg y el metabolismo de la glucosa. a) En presencia de oxígeno, una célula normal lleva a cabo la degradación de la glucosa (Glicólisis) hasta la obtención de piruvato, el cual después es convertido a Acetil-CoA, en la mitocondria, para ser oxidado. En condiciones bajas de oxígeno, el piruvato generado en la glicólisis, es fermentado a lactato. b) Se observa el metabolismo de la glucosa en tejido en proliferación y en células tumorales obteniendo como producto al piruvato que después es convertido a lactato tanto en condiciones normales o bajas de oxígeno. Modificado de Vander Heiden et al, 2009.

En contraste, el “efecto Warburg”, parece estar presente también en tejidos embrionarios normales que se dividen rápidamente, lo que sugiere un cambio metabólico en apoyo a los programas de biosíntesis a gran escala que se requieren para la proliferación celular activa, adaptando el metabolismo para facilitar el consumo e incorporación de nutrientes para la fabricación de biomasa (nucleótidos, aminoácidos, lípidos entre otros) requeridos para la división celular (Fig. 7) (Vander et al, 2009, Hanahan et al, 2011).

4.2. MICROAMBIENTE TUMORAL

Se ha observado que el microambiente tumoral inevitablemente desarrolla hipoxia y acidosis. Estas condiciones sirven como fuerzas selectivas que rigen la adaptación celular durante la etapa tardía de la evolución del tumor, lo que explica la extrema variabilidad en la expresión de genes, por ejemplo aquellos involucrados en el metabolismo de la glucosa (Romero-García et al, 2011).

4.2.1. Hipoxia

La hipoxia se refiere a la baja concentración de oxígeno en los tumores como resultado de una anormal formación de vasos sanguíneos, defectos en la irrigación sanguínea y a la ilimitada proliferación celular. A medida que el tumor crece, la vascularización se hace cada vez más insuficiente, por lo tanto la oxigenación y el transporte de nutrientes es insuficiente (Fig. 8) (Justus et al, 2015).

En un tumor sólido se presentan diferentes concentraciones de oxígeno, lo que da como resultado el desarrollo de una población celular heterogénea, formada por aquellas células que se encuentran en regiones con una tensión de oxígeno adecuada y aquellas que se localizan en una región con una tensión de oxígeno baja. Esta condición permite la selección de aquellas células metabólicamente adaptadas, en las cuales se presenta una glicólisis desacoplada de la cadena respiratoria, convirtiéndose la glicólisis incrementada en la principal fuente de ATP (Romero-García et al, 2011).

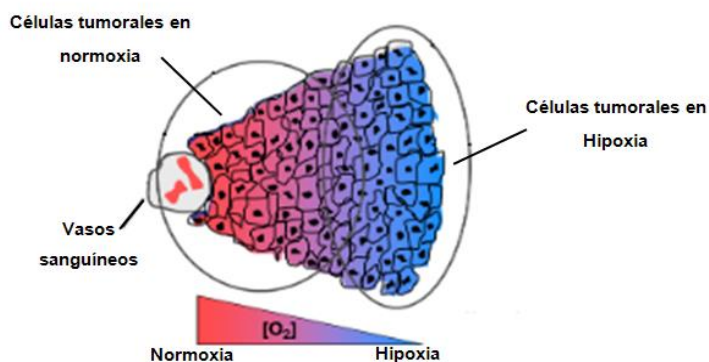


Figura 8. Hipoxia en un tumor sólido. Poblaciones heterogéneas presentes en un tumor sólido, en donde la diferencia radica en el suministro de oxígeno debido al distanciamiento de las células con respecto a la irrigación sanguínea (Romero-García et al, 2011).

4.2.2. Acidosis

Una de las características reconocida de los tumores desde hace tiempo, es su bajo pH intersticial. El pH normal de los tejidos oscila entre 7.0 y 7.4; alternativamente el pH del microambiente tumoral se encuentra en un rango entre 5.5 a 6.8 (Justus et al, 2015). Al disminuir el pH, el microambiente se vuelve tóxico para aquellas células adyacentes pero no para las células tumorales, ya que éstas han desarrollado mecanismos de supervivencia (Romero-García et al, 2011). La hipoxia usualmente está asociada con la acidosis, pero la acidosis también puede presentarse en el microambiente tumoral aún en condiciones de normoxia; esto, como ya se mencionó, al efecto Warburg.

4.2.3. Lactosis

La acidosis se obtiene como resultado del aumento de la glicólisis, con la concomitante producción de altas cantidades de piruvato y su reducción a ácido láctico. Por lo tanto los niveles de ácido láctico aumentan, fenómeno conocido como lactosis, generando una disminución en el pH (Choi et al, 2013).

El lactato producido se secreta vía el transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) mediante simporte con protones, provocando la acidificación del medio extracelular, lo que favorece la invasión, debido a la degradación de la matriz extracelular (Chiche et al, 2010).

Interesantemente, se ha encontrado que en algunos tumores se presentan dos subpoblaciones de células tumorales, las cuales difieren en las vías de señalización metabólica que utiliza para producir energía. La primera corresponde a células dependientes de glucosa, que secretan lactato, y el segundo tipo de células, importan y utilizan el lactato producido por las primeras (Hanahan y Weinberg, 2011).

Se piensa que la producción de lactato se debe a que los tumores comúnmente se encuentran con niveles fluctuantes de oxígeno, alternando periódicamente entre normoxia e hipoxia, planteando la posibilidad de que la glicólisis aeróbica surgió como una adaptación a las condiciones de hipoxia. El uso de la glicólisis independiente del oxígeno podría conferir una ventaja proliferativa a las células tumorales, haciéndolas menos susceptibles al estrés hipóxico durante los episodios de hipoxia espontánea, aunque se presentaría un costo de ineficiencia energética en tiempos de oxigenación adecuada (Choi et al, 2013).

4.3. MITOCONDRIA Y CÁNCER

Si bien el cáncer comienza con un cambio genético en una sola célula que pasa a su progenie, generando de este modo un clon de células malignas, lo que se conoce como la teoría de la mutación somática (Vaux, 2011), también se ha encontrado evidencia que sugiere que el cáncer es resultado de una enfermedad metabólica mitocondrial debido a una insuficiencia respiratoria (Seyfried, 2015). Estudios han demostrado que mutaciones en el mtDNA y un mal funcionamiento en la fosforilación oxidativa pueden incrementar la tumorigénesis y promover la invasión celular (Srivastava et al, 2007).

Sin embargo otros recientes han observado que para el desarrollo de la tumorigénesis se necesitan mitocondrias funcionales, debido a que se ha visto un aumento en el metabolismo oxidativo de compuestos diferentes a la glucosa, para poder mantener los niveles energéticos bajo condiciones de estrés como la hipoxia (Chaube et al, 2016).

4.3.2. Modificaciones encontradas en la biogénesis mitocondrial de las células tumorales

Existe evidencia que indica que las células tumorales responden a cambios en la concentración de glucosa y otros nutrientes mediante la modificación del

metabolismo y biogénesis mitocondrial (Chaube et al, 2015), lo que indica una posible modificación en los niveles de expresión de los principales reguladores de la generación de nuevas mitocondrias.

4.3.2.1. Proteín Cinasa Activada por AMP (AMPK)

Ratones genéticamente modificados con un dominio negativo en AMPK (DN-AMPK) fueron tratados con ácido β -guanidinopropiónico, un análogo de creatina que induce una reducción en los niveles de ATP, estimulando la activación de este factor; encontrando que en los ratones DN-AMPK no se observó la activación de AMPK ni aumento en la densidad mitocondrial (biogénesis mitocondrial) en comparación con ratones no modificados, por lo que sugieren que AMPK es crucial para la iniciación de este proceso en respuesta a una privación energética (Zong et al, 2002).

En ratas no modificadas sometidas a una dieta con ácido β -guanidinopropiónico se activó AMPK, también se observaron niveles elevados de NRF-1 y de citocromo C, así como de la densidad mitocondrial en el músculo, fenómeno que no se observó en ratas que no se sometieron a esta dieta. Esto sugiere que AMPK es importante en la adaptación al estrés energético lo que promueve la biogénesis mitocondrial, así como la expresión de proteínas respiratorias mediadas por NRF-1 (Bergeron et al, 2001).

En un estudio en donde se emplearon ratas jóvenes (3 meses) y ratas viejas (28 meses), tratados ambos con ácido β -guanidinopropiónico, se observó que la biogénesis mitocondrial en respuesta a la activación de AMPK se encontraba disminuida en ratas viejas, lo que sugiere que la reducción en la actividad debido al envejecimiento puede ser un factor importante en la reducción de la función mitocondrial y la desregulación en el metabolismo lipídico asociado con el envejecimiento (Reznick et al, 2007).

Usando la línea celular de cáncer de pulmón H1299 modificada genéticamente con un dominio negativo en la subunidad alfa de AMPK (H1299-DN), cultivadas bajo

condiciones limitadas de glucosa y tratadas con AICAR (ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida), un análogo de adenosín monofosfato capaz de estimular la activación de a AMPK al simular una privación energética. Se observó que las células no sobrevivían, en comparación con la misma línea celular que no presenta modificaciones. Esto sugiere que AMPK actúa en el mantenimiento de los niveles energéticos mediante el metabolismo de sustratos diferentes a la glucosa, como aminoácidos, ácidos grasos e incluso el lactato producido. Para corroborar esta acción protectora, se cultivaron las mismas líneas, sustituyendo la glucosa por glutamina, y se observó de igual forma una inhibición en el crecimiento de las H1299-DN (Chaube et al, 2016).

4.3.2.2. Coactivador-1alfa del Receptor-gamma Activado por el Proliferador de Peroxisoma (PGC-1 α)

Se ha observado que al sobre-expresar PGC-1 α en mioblastos se elevan los niveles de mRNA de las subunidades respiratorias II y IV de la citocromo oxidasa, así como niveles proteicos elevados de la citocromo C. Lo que indica una relación directa entre la sobre-expresión de PGC-1 α y la inducción de NRF-1 y 2, y TFAM (Scarpulla, 2008, Wu et al, 1999). Lo anterior se encuentra en concordancia con un estudio en biopsias de pacientes con cáncer de colon, de mama y de ovario que han observado niveles disminuidos en la expresión de PGC-1 α (Watkins et al, 2004, Villena, 2015). A estos elementos se suman los datos de modelos de roedores que apoyan la idea de que la reducción en la expresión de PGC-1 α contribuye al crecimiento y carcinogénesis de tumores (D'Errico et al, 2011). Por el contrario, en líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa) y carcinoma de hígado (HepG2) se reportó que los niveles de expresión de PGC-1 α están elevados (Jones et al, 2012). Se ha relacionado a PGC-1 α con la regulación de la síntesis de *ново* de ácidos grasos, y el aumento en la biogénesis mitocondrial, sugiriendo que PGC-1 α tiene la capacidad de promover el crecimiento del tumor (Jones et al, 2012). Además, en estudios realizados en células tumorales metastásicas de humano y ratón, se ha

reportado una mayor biogénesis mitocondrial asociado a niveles altos de PGC-1 α en contraste con los tumores primarios. Sugiriendo que la biogénesis mitocondrial y su función respiratoria dependiente de PGC-1 α son esenciales para facilitar la migración e invasión de las células tumorales (LeBleu et al, 2014).

4.3.2.3. Factores Respiratorio Nuclear 1 y 2 (NRF-1, 2) y Factor de Transcripción Mitocondrial a (TFAM)

En biopsias de oncocitoma de tiroides (tumor compuesto por células epiteliales que se caracterizan por una cantidad excesiva de las mitocondrias, dando al citoplasma una apariencia acidófila y granular (Finsterer y Stöllberger, 2016) y la línea celular de cáncer de hígado H4IIE se observaron niveles elevados de mRNA de NRF-1, NRF-2 y TFAM, cuando se compararon con tejido normal (Piantadosi y Suliman, 2006, Savagner et al, 2003). Los autores relacionaron el aumento de TFAM, con el aumento que presenta NRF-1, el cual se ha observado que interactúa directamente sobre TFAM. Niveles elevados de TFAM y NRF-1,2 se relacionaron con niveles incrementados de subunidades nucleares y mitocondriales del complejo IV respiratorio, así como incremento en el mtDNA (Piantadosi y Suliman, 2006, Savagner et al, 2003). También, usando biopsias de pacientes con cáncer de endometrio tipo I han observado niveles aumentados en la expresión de TFAM y NRF-1 en comparación con tejido endometrial normal. Cabe mencionar que también se observó un aumento en PGC-1 α y la citrato sintasa. Por lo que los autores concluyen que en este tipo de cáncer hay un aumento en la biogénesis mitocondrial con base en el aumento en la expresión de estos genes y en el número de copias de DNA mitocondrial (Cormio et al, 2009). De forma interesante, en muestras de pacientes con astrocitoma (neoplasia intracraneal) se ha estudiado el número de copias de DNA mitocondrial en función a los niveles de expresión de reguladores como TFAM, encontrando que el número de copias de mtDNA en este tipo de cáncer disminuye conforme aumenta el grado de malignidad y que, por el contrario, los niveles de expresión de TFAM están aumentados; por lo que sugieren que este aumento puede interpretarse como un efecto compensatorio a la reducción en el

material genético mitocondrial, sugiriendo que la elevación en la expresión de estos reguladores está asociado a un mejor pronóstico (Correia et al, 2011).

Por el contrario, en otro estudio evaluando en biopsias de carcinoma hepatocelular los niveles de NRF-1 y TFAM, observaron que éstos no se modificaron significativamente, aunque sí se presentan niveles disminuidos de subunidades proteicas del complejo respiratorio II y III, en comparación con tejido hepático no transformado (Yin et al, 2004).

4.3.2.4. Factor Inducible por Hipoxia subunidad alfa (HIF-1 α)

En biopsias de cáncer de estómago, de mama, de próstata y de ovario se reportó una mayor expresión de HIF-1 α (Wang et al, 2014, Kimbro y Simons, 2006, Shimogai et al ,2008). Este aumento se ha relacionado con un pobre diagnóstico y resistencia a la quimioterapia y radioterapia. También se ha observado una sobre-expresión de HIF-1 α en biopsias de cáncer de cerebro, cáncer cervicouterino, de esófago y de orofaringe, lo cual también se ha correlacionado con la angiogénesis y la progresión del tumor, el fracaso del tratamiento y la mortalidad (Semenza, 2002).

Al inducir la sobreexpresión de HIF-1 α empleando una solución de cloruro de cobalto (II) en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar (A-549), se observó una relación con el desarrollo de células madre cancerosas (CMC). Lo anterior sugiere que este aumento en la sobreexpresión de HIF-1 α en las CMC puede contribuir a la resistencia a los fármacos en tratamientos de cáncer de pulmón, ya que se ha reportado que este tipo de células son altamente quimioresistentes (Wu y Yotnda, 2011, Zhao et al, 2015, Crea et al, 2009).

Estudios realizados en biopsias de cáncer de colón, mama, estómago, pulmón, piel, ovario, páncreas y próstata han reportado una sobre-expresión de HIF-1 α , comparados con sus respectivos tejidos normales. También se han observado niveles proteicos elevados de HIF-1 α en lesiones preneoplásicas y premalignas

tales como adenoma de colon, carcinoma ductal de mama *in situ* y neoplasia intraepitelial de próstata. Estos hallazgos sugieren que la sobre-expresión de HIF-1 α puede ocurrir de manera temprana en la carcinogénesis, antes de que haya una evidencia histológica de angiogénesis o invasión (Zhong et al, 1999).

4.3.2.5. Citrato sintasa (CS)

En biopsias de cáncer de ovario se encontró un aumento en los niveles de mRNA y de la proteína de la CS, en comparación con epitelio ovárico normal. Complementando este estudio, usando líneas celulares de carcinoma de ovario (SKOV3 y A2780) y mediante el silenciamiento del gen CS utilizando RNA de interferencia, se observó una reducción en la invasión y proliferación de las células tumorales, así como un mayor índice apoptótico al tratarlas con fármacos quimioterapéuticos. Lo que sugiere que la CS es importante en el proceso de metástasis y en la resistencia a la quimioterapia (Chen et al, 2015). En otro estudio utilizando epitelio de ovario de ratón estudiaron los cambios metabólicos en distintos estadios del desarrollo del cáncer, siguiendo así la transición de tipo epitelio-mesenquimal, reportando un incremento en la actividad de la CS durante la progresión del cáncer de ovario (Anderson et al, 2013, Roberts et al, 2005, Kalluri y Weinberg, 2010). Por otro lado, en biopsias de cáncer de páncreas, la elevación en los niveles de expresión de la CS, en comparación con tejido pancreático adyacente no transformado, se han correlacionado con la participación del ciclo de Krebs en la síntesis de lípidos para la síntesis de membranas (Schlichtholz et al, 2005).

5. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el cáncer de pulmón es uno de los principales tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad. En México, este tipo de cáncer se encuentra entre las principales causas de muerte por tumores malignos, siendo el adenocarcinoma pulmonar el tipo histológico más frecuente.

Así mismo, se ha observado que el fenotipo metabólico de las células tumorales presenta modificaciones en función del microambiente en que se desarrollan, siendo la mitocondria uno de los organelos involucrado en este cambio. Por lo cual en este estudio nos enfocamos en la evaluación de la expresión de los principales reguladores la biogénesis mitocondrial en células tumorales considerando el microambiente tumoral, permitiendo comprender si existe alguna modificación en este proceso relacionado con el desarrollo de este padecimiento.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de expresión relativa de los genes: HIF-1 α , PGC-1 α , TFAM, NRF-1, NRF-2, CS y AMPK al someter a líneas celulares de cáncer pulmonar a diferentes condiciones durante su crecimiento, variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y el pH.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

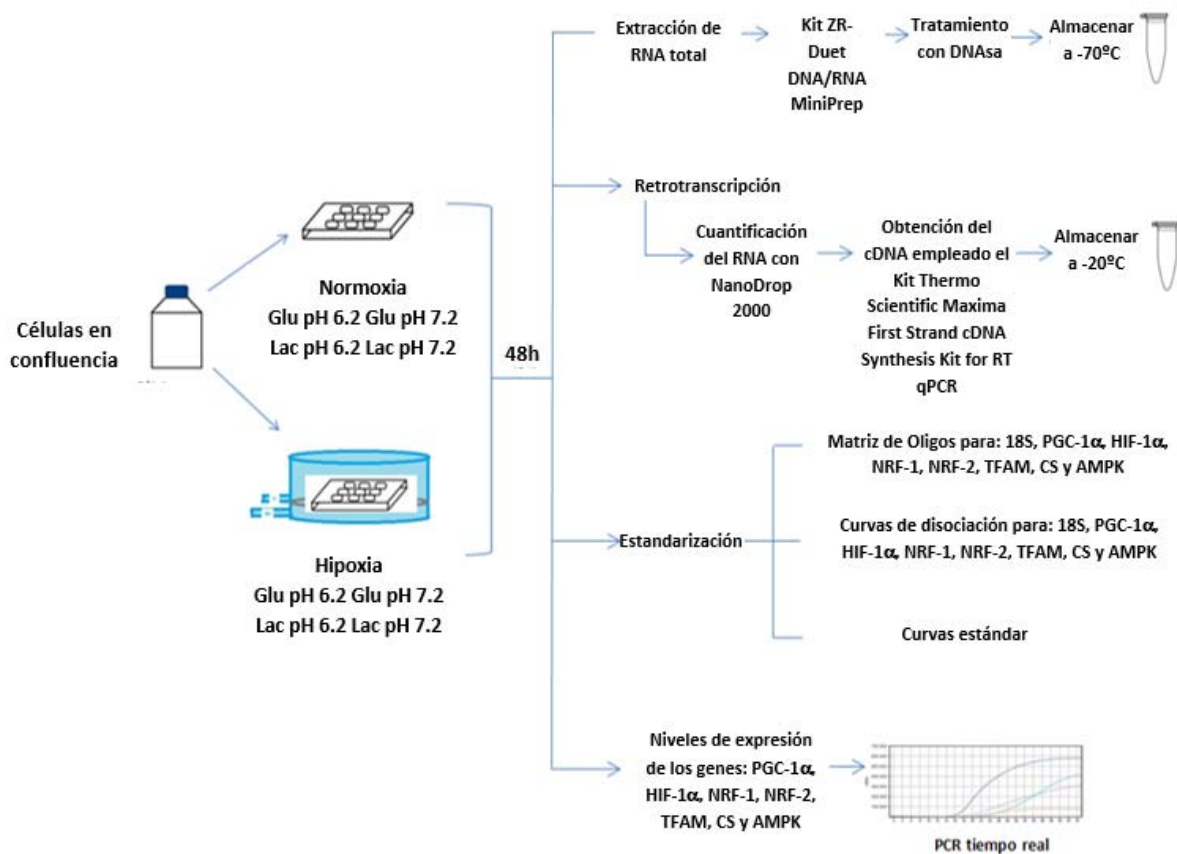
- Cultivar las líneas celulares A-427, A-549, MCF-7 así como las células de fibroblastos MRC-5 en diferentes condiciones de crecimiento variando la fuente de carbono (glucosa y lactato), el pH (acidosis y condiciones neutras) y la tensión de oxígeno (hipoxia y normoxia).
- Realizar la estandarización de la técnica de PCR en tiempo real, así como la evaluación de los niveles de expresión relativa de los principales reguladores de la biogénesis mitocondrial en las líneas celulares y células de fibroblastos incubadas en las condiciones de crecimiento antes mencionadas mediante el método de $\Delta\Delta Ct$.

7. HIPÓTESIS

Si las líneas celulares A-427, A-549 son cultivadas bajo diferentes condiciones variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y el pH, se modificarán los niveles de expresión de los principales genes reguladores de la biogénesis mitocondrial favoreciendo la supervivencia celular.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. ESQUEMA DE TRABAJO



8.2. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares incluidas en este estudio fueron: dos líneas de adenocarcinoma pulmonar A-549, A-427, una de carcinoma de mama MCF-7 y por último células de fibroblastos MRC-5. Todas las líneas celulares fueron obtenidas de la ATCC, Rockville, MD.

8.3. REACTIVOS

El medio de cultivo RPMI-1640 (con y sin glucosa), el L-lactato de sodio que se agregó a los medios sin glucosa y la solución antibiótica (10 000U/mL de penicilina y 10mg/mL de estreptomycin) se adquirieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, U.S.A. El suero fetal bovino (SFB) se adquirió de Thermo Scientific, Logan, Utha, U.S.A. La solución de tripsina (0.05%)-verseno (0.05%) libre de calcio y magnesio se compró a In vitro, D.F., México. El Kit ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep fue adquirido de Zymo Research, Irvine, CA, U.S.A. El kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR se compró a Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A. El SYBR Select Master Mix se adquirió de Applied Biosystem, Foster City, CA, U.S.A. Los oligonucleotidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Mor., México.

8.4. EQUIPOS

La incubación de las células en normoxia se realizó en la incubadora Panasonic MCO-19AIC de Panasonic Healthcare. En el caso de las células sometidas a hipoxia, se utilizó una cámara de incubación modular Billups-Rothenberg. La campana de flujo laminar usada durante la experimentación fue la Class II Type A2 de ESCO. Para la obtención del cDNA se empleó el termociclador Eppendorf Mastercycler ep gradient S de Eppendorf. Para la cuantificación tanto del RNA total, como del cDNA, se empleó el espectrofotometro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific. Para llevar a cabo los ensayos de PCR tiempo real, se utilizó el termociclador 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems.

8.5. CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar A-549 y A-427, de carcinoma de mama MCF-7 y los fibroblastos MRC-5 fueron cultivados en cajas T25 en medio

RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, así como con solución antibiótica al 1%. Las líneas celulares se incubaron a 37 °C con 21% de O₂ y 5% de CO₂. Al llegar a confluencia las células fueron tratadas con tripsina para desprenderlas y transferirlas a una nueva caja con medio fresco.

8.6. CONDICIONES DE CULTIVO (TRATAMIENTOS)

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

En cajas de 12 pozos se sembraron 4 pozos con 200,000 células en 2 mL con un medio de cultivo diferente: medio RPMI-1620 con glucosa y pH 7.2, medio RPMI-1620 con glucosa y pH 6.2, medio RPMI-1620 con lactato-libre de glucosa y pH 7.2 y medio RPMI-1620 con lactato –libre de glucosa y pH 6.2. Otra caja de 12 pozos se sembró exactamente igual a la anterior. Ambas cajas se incubaron durante 48 h a 37°C pero una en una atmósfera de 21% O₂ y 5% CO₂ (normoxia) y otra en una atmósfera de 2% O₂, 93% N₂ y 5% CO₂ (hipoxia). Los cultivos se realizaron por duplicado.

8.7. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL.

Para realizar la extracción del RNA se utilizó el kit ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep. Cuya metodología se describe a continuación: Primero se retiró el medio de cultivo utilizando vacío de cada uno de los pozos de las placas. Posteriormente se le agregó a cada pozo 1mL del buffer de lisis DNA/RNA, directo en la monocapa, dejando reposar 5 minutos. Las células se removieron con ayuda del pipeteo. La muestra se transfirió a una columna Zymo-Spin IIIC colocada dentro de un tubo colector. Se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm, obteniendo así el RNA en el sobrenadante que se encuentra en el tubo colector. Se repitió este paso, debido a que el volumen de la muestra sobrepasaba la capacidad de la columna.

Se agregaron 800 µL de etanol absoluto al sobrenadante del tubo colector mezclando por pipeteo. Se transfirió la muestra a una columna Zymo-Spin IIC colocada dentro de un tubo colector vacío y se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm. Se repitió este paso ya que el volumen de la muestra sobrepasaba la capacidad de la columna.

A las muestras se les realizó tratamiento con DNasa, para esto se preparó un coctel de DNasa I que incluyó: 85uL de DNasa libre de RNasa, 85uL de Buffer de reacción 10X y 680uL de Buffer RNA de lavado, siendo estos volúmenes para tratar 8 muestras. Después de la incubación se adicionaron 400uL de Buffer de lavado de RNA a la columna Zymo-Spin IIC colocada en un tubo colector vacío y se centrifugaron por 1 minuto a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante del tubo colector y se les agregó 100 uL del coctel de DNasa I directo en la matriz de la columna Zymo-Spin IIC. Se incubaron las muestras a 37° C por 30 minutos. Una vez cumplido el tiempo, las muestras se centrifugaron por 30 segundos a 12,000 rpm, descartando el sobrenadante.

Después del tratamiento con DNasa se agregaron 400 uL de Buffer RNA Prep a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 600 uL de Buffer RNA de lavado a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 12,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado con 300 uL de Buffer de lavado de RNA.

Se centrifugó la columna Zymo-Spin IIC colocada en un tubo colector vacío a 12,000 rpm por 2 minutos. Se transfirió la columna Zymo-Spin IIC a un tubo libre de RNAsas y se agregaron 25 uL de Agua libre de DNasa/RNasa previamente calentada, directamente en la matriz y se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente. Por último se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos. El RNA obtenido se almacenó a -70 C.

8.8. RETROTRANSCRIPCIÓN

Una vez obtenidas las muestras de RNA se determinó la concentración de cada una de ellas, empleando el equipo NanoDrop 2000. Ya obtenidas las concentraciones, se realizaron los cálculos para agregar el volumen correspondiente a 5ug de RNA para cada muestra.

Para la realización de la retrotranscripción y obtención del cDNA, se utilizó el kit Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR.

Primero se agregó en tubos eppendorf para PCR el mix de reacción RT 5X, después el Mix Maxima Enzyme, posteriormente el RNA (correspondiente a 5 ug de RNA) y por último se completó con agua libre de nucleasas, para obtener un volumen final de 30 uL. En algunas muestras se modificó el volumen final a 35 debido a que la concentración de RNA fue baja y por lo tanto se aumentó el volumen del mix de reacción y el volumen de templado.

Para llevar a cabo la reacción se empleó un termociclador Eppendorf, en el cual se utilizó el siguiente programa:

- 1 ciclo de 10 minutos a 25°C
- 1 ciclo de 30 minutos a 50°C
- 1 ciclo de 5 minutos a 85°C

El cDNA obtenido se almacenó en congelación a -20°C.

8.9. ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE qPCR

Para la estandarización de la reacción de qPCR para este estudio, se realizaron los siguientes pasos:

8.9.1. Matriz de Oligos para: 18S, AMPK, PGC-1 α , NRF-1, NRF-2, TFAM, HIF-1 α y CS

Para obtener la concentración adecuada de oligos para los ensayos, se probaron cuatro diferentes concentraciones para cada par de oligos por medio de una matriz 2 X 2, que a continuación se presenta:

Tabla No.1 Concentraciones de oligos utilizados en la matriz.

Primer Forward	Primer Reverse		
	Concen-tración	200nM	300nM
	200nM	200nM/200nM	300nM/200nM
	300nM	300nM/200nM	300nM/300nM

Las secuencias y las características de los primers empleados (diseñados por la Dra. Aida Susana Romero García) se presentan en la siguiente tabla:

Tabla No.2 Características de los oligos empleados.

Gen	Oligo Forward	Oligo Reverse
18S	Longitud: 21 Secuencia: TAC CGC AGC TAG GAA TAA TGG Tm 1: 64.8 Tm 2: 62 PM: 6819.20	Longitud: 20 Secuencia: CGT CTT CGA ACC TCC GAC TT Tm 1: 66.45 Tm 2: 62.62 PM: 6327
AMPK	Longitud: 21 Secuencia: CAG GCC ATA CCC TTG ATG AAT Tm 1: 64.88 Tm 2: 62 PM: 6690.20	Longitud: 22 Secuencia: TTC TTC CTT CGT ACA CGC AAA T Tm 1: 63.45 Tm 2: 62 PM: 6977.40
PGC-1 α	Longitud: 20 Secuencia: CCA GGC AGT AGA TCC TCT TC Tm 1: 66.45	Longitud: 20 Secuencia: CTC AGA CTC TCG CTT CTC AT Tm 1: 64.75

	Tm 2: 62 PM: 6376	Tm 2: 60 PM: 6302
NRF-1	Longitud: 21 Secuencia: ATG AAG ACT CGC CTT CTT CTC Tm 1: 64.88 Tm 2: 62 PM: 6672	Longitud: 21 Secuencia: TTG TTG CCT CTT CCG GAT AGA Tm 1: 64.88 Tm 2: 62 PM: 6743.20
NRF-2	Longitud: 21 Secuencia: AGT GCA ATC TGC TAC ACC TAC Tm 1: 64.88 Tm 2: 62 PM: 6690.20	Longitud: 20 Secuencia: ATG CAG TCT CGA GCG TCC TT Tm 1: 66.45 Tm 2: 62 PM: 6407
TFAM	Longitud: 20 Secuencia: TGT GCA CCG GCT GTG GAA GT Tm 1: 68.15 Tm 2: 64 PM: 6512	Longitud: 20 Secuencia: TCC CTC CAA CGC TGG GCA AT Tm 1: 68.15 Tm 2: 64 PM: 6361
HIF-1 α	Longitud: 19 Secuencia: CAG TCG ACA CAG CCT GGA T Tm 1: 66.39 Tm 2: 60 PM: 6103.80	Longitud: 20 Secuencia: TGG CAA GCA TCC TGT ACT GT Tm 1: 64.75 Tm 2: 60 PM: 64.31
CS	Longitud: 20 Secuencia: ACC TGT CAG CGA GAG TTT GC Tm 1: 66.45 Tm 2: 62 PM: 6456	Longitud: 20 Secuencia: CCC AAA CAG GAC CGT GTA GT Tm 1: 66.45 Tm 2: 62 PM: 6434

Para llevar a cabo estos ensayos se utilizó SYBR Select Master Mix, los oligos correspondientes, agua libre de RNAsas y el templado que fue cDNA de la línea celular MRC-5. El ensayo se realizó por triplicado con un volumen final de 13 μ L por pozo. Se utilizó un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem). La mayor intensidad de fluorescencia determinó la concentración óptima de los primers para usarse en el ensayo.

8.9.2. Curva de disociación para los genes: 18S, AMPK, PGC-1 α , NRF-1, NRF-2, TFAM, HIF-1 α y CS

Para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos, se incluyó una curva de disociación en el programa de PCR en tiempo real para cada par de primers. La curva de disociación consiste en aumentar gradualmente la temperatura hasta los 95°C, con la finalidad de desnaturalizar la doble cadena de los productos obtenidos durante el PCR; posteriormente, se baja drásticamente la temperatura hasta 60°C lo que renaturaliza las cadenas de DNA con la finalidad de ver cuantos picos de disociación hubo en esa reacción. Para un par de oligos específicos para un gen, idealmente se observa un pico de disociación, asegurando la especificidad de la reacción.

8.9.3. Curvas estándar

A partir del stock de cDNA de MRC-5 se hicieron 5 diluciones seriadas, partiendo de una dilución 1:10 (usando 1 uL de cDNA en 9 uL de agua libre de RNasas y DNasas), de ésta se realizaron otras 4 diluciones seriales 1:3. De cada una de las diluciones, se tomó una alícuota de 7.5uL, que fue utilizada como templado en cada una de las reacciones de la curva estándar para evaluar la eficiencia de la reacción del qPCR (rango dinámico) y reproducibilidad de las reacciones. Con base en estas curvas estándar se determinó el gen endógeno óptimo que fue 18S para los genes de interés (*PGC-1 α* , *HIF-1 α* , *NRF-1*, *NRF-2*, *TFAM*, *CS* y *AMPK*).

8.10. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Una vez validados los ensayos de eficiencia, el rango dinámico y la elección del gen endógeno, se llevó a cabo la cuantificación relativa de los genes de interés (*AMPK*, *PGC-1 α* , *NRF-1*, *NRF-2*, *TFAM*, *HIF-1 α* y *CS*) por medio de la técnica de PCR tiempo real. Cuya técnica se describe a continuación brevemente: cada línea celular

fue incubada en las 8 diferentes condiciones de cultivo antes descritas. Después de 48h de incubación, se lisaron las células y se obtuvo el RNA total de acuerdo al procedimiento antes descrito. Los cultivos se llevaron a cabo por duplicado. Después de llevar a cabo la cuantificación del RNA total, se llevó a cabo la retrotranscripción a partir de 5ug de RNA. Posteriormente se cuantificó el cDNA obtenido para utilizar una concentración de 3.94ng/uL de DNA para cada reacción de PCR en tiempo real.

Para correr un ensayo, se etiquetaron 9 tubos para cada gen que corresponden a 4 para el cultivo número 1, y 4 tubos para el número 2, más un tubo para NTC. Esta nomenclatura se utilizó tanto para normoxia tubos como para hipoxia.

Para llevar a cabo el ensayo, se realizaron tres cocteles: uno para 18S, y otros dos para genes de interés. Los cocteles estaban compuestos por: SYBR Select Master Mix (195uL), los oligos específicos para los genes de estudio (23.4uL para cada oligo), agua libre de RNAsas (73.2uL), obteniendo un volumen final de 315uL que corresponde a 8 reacciones (incluye 3 réplicas experimentales por muestra) más 1 reacción de NTC (incluye dos réplicas experimentales).

Cada reacción para cada condición se formó de 35.18uL del coctel de cada uno de los genes y 7.5 uL de la dilución del templado o cDNA (3.94ng/ μ L), obteniendo un volumen de 40.2uL (volumen suficiente para cargar cada reacción por triplicado en la placa). A cada tubo de NTC se le agregaron 23uL del coctel de cada uno de los genes y 5uL agua libre de RNasa obteniendo un volumen final de 28uL (volumen suficiente para cargar cada reacción por duplicado en la placa).

En una placa de 96 pozos se cargaron triplicados de 13uL por reacción En el caso de los NTC, se cargaron duplicados de 13 uL por reacción.

A continuación se muestra el programa que se usó:

- 1 ciclo de 5 minutos a 94°C
- 25 ciclos

{	1 minuto a 94°C
	1. 30 minutos a 60°C
	1.30 minutos a 72°C

- 1 ciclo de 10 minutos a 72°C

8.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de la cuantificación fueron exportados en una hoja de cálculo.

Los datos fueron analizados de acuerdo al método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

La expresión de los genes de interés fueron normalizados respecto al gene 18S. La expresión relativa de los genes de interés se llevó a cabo comparando su expresión en las diferentes condiciones de crecimiento respecto a la condición con glucosa y pH 7.2 en normoxia (Glu7.2N). Dichas comparaciones se llevaron a cabo utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ [1]:

$$\Delta\Delta Ct = (CT_{\text{problema}} - CT_{18S})_{\text{tratada}} - (CT_{\text{calibrador}} - CT_{18S})_{\text{control}}.$$

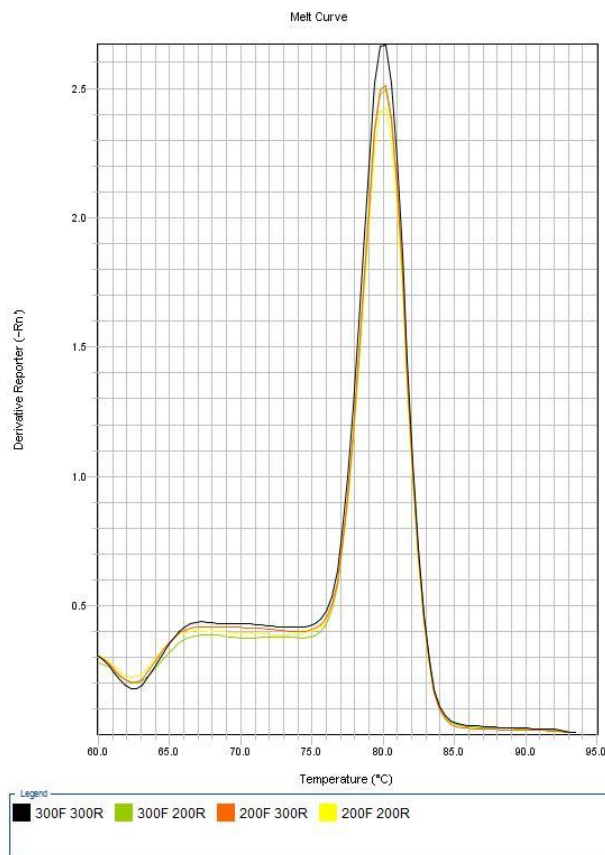
El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6.0. Para determinar si había diferencias significativas entre las diferentes condiciones de cultivo se utilizó la prueba ANOVA de una vía y como prueba post hoc, se empleó la prueba de Bonferroni. Se consideró como valor de significancia estadística $P \leq 0.05$.

9. RESULTADOS

Para evaluar si las células de fibroblastos MRC-5 y las líneas celulares A-427, A-549 y MCF-7 modifican los niveles de expresión de los principales genes reguladores de la biogénesis mitocondrial cuando son cultivadas bajo diferentes condiciones variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y el pH, se realizó la cuantificación relativa de los niveles de expresión del mRNA de los genes AMPK, PGC-1 α , NRF-1, TFAM, NRF-2, HIF-1 α y CS, empleando la técnica de PCR en tiempo real.

9.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL.

9.1.1. Matriz de oligonucleótidos



La concentración óptima para cada par de oligonucleótidos se definió analizando las curvas de disociación de la reacción de qPCR correspondiente a la matriz de oligos (Figura 9). Se escogieron aquellas combinaciones de oligonucleótidos sentido y antisentido en las que se presentaba una mayor eficiencia de amplificación, visto a través de un mayor producto de amplificación en las curvas de disociación. En este estudio, se eligió la concentración de 300 nM para el oligo sentido y 300 nM para el oligo anti sentido. Estas mismas concentraciones de oligos se emplearon para cada uno de los genes analizados.

Figura 9. Curva de disociación. Se presenta una gráfica de disociación en la que se observa 4 picos de disociación correspondientes a las 4 concentraciones de oligonucleótidos empeladas.

9.1.2. Curva de disociación

Se corroboró la especificidad de cada par de oligos utilizados al observar un solo pico de disociación en las curvas de disociación para cada gen estudiado (Figura 10). La curva de disociación se produce cuando por el incremento en la temperatura, el DNA de doble cadena se disocia en cadenas sencillas, favoreciendo la liberación del agente intercalante (SYBER Green) generando una señal de fluorescencia.

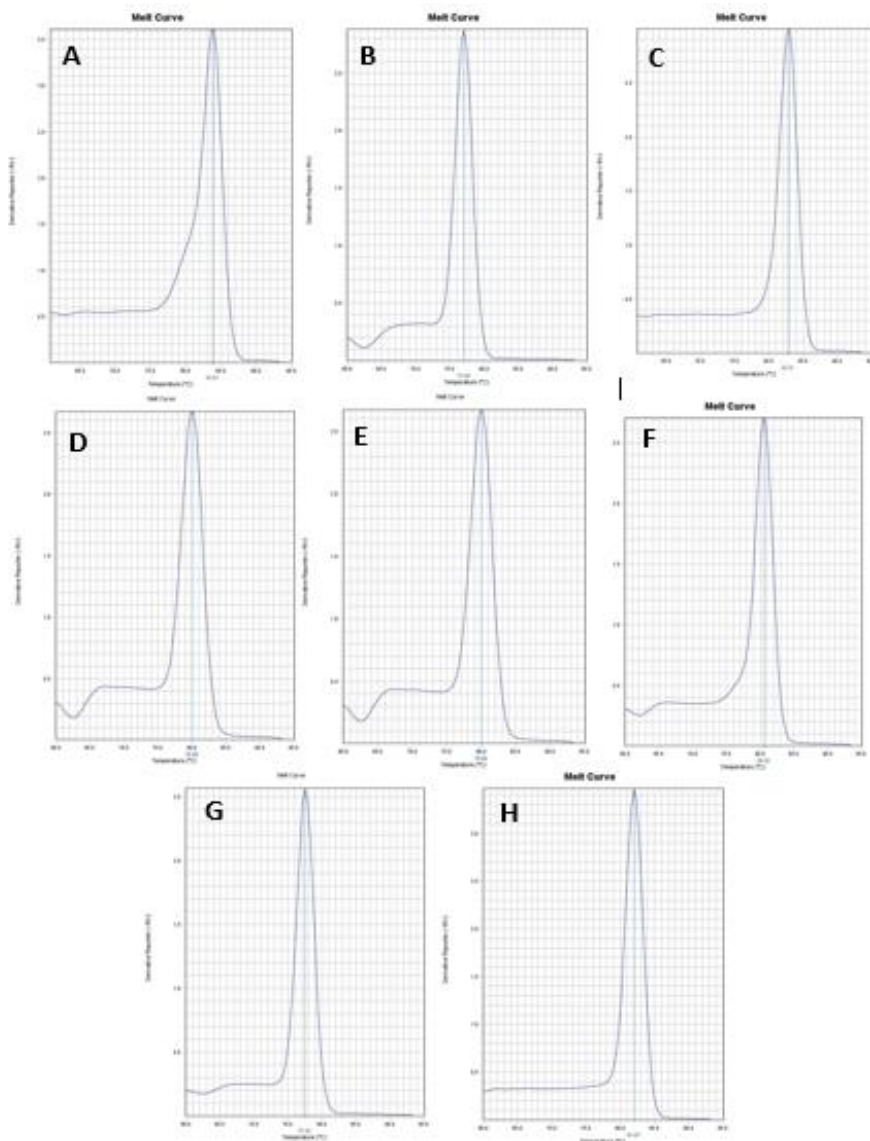
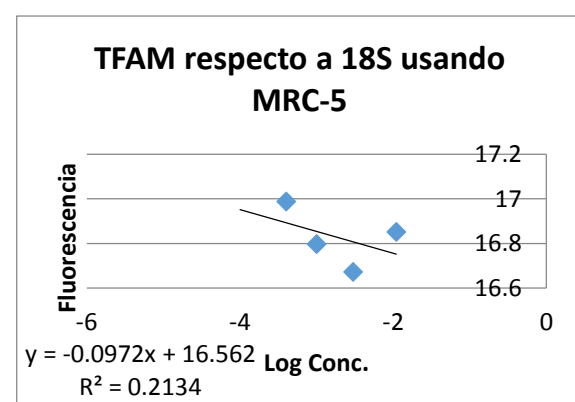
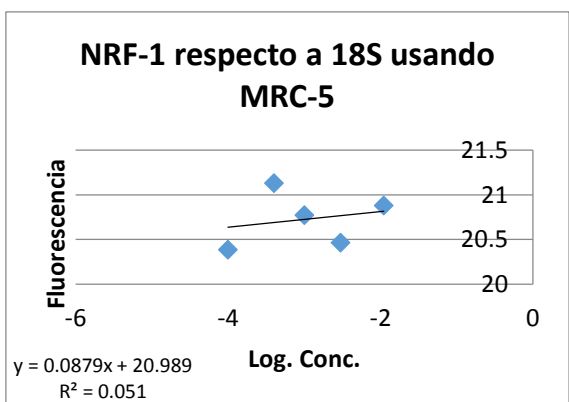
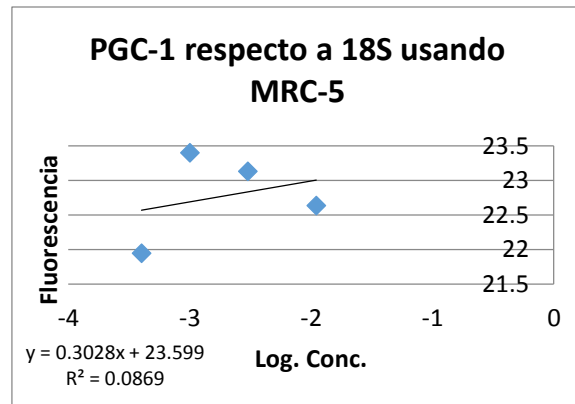
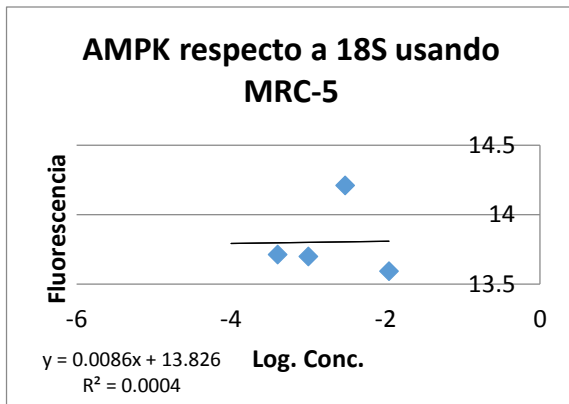


Figura 10. Curvas de disociación correspondientes a cada gen de estudio. Se midió la intensidad de fluorescencia en función del incremento de temperatura. A. 18S, B. AMPK, C. PGC-1 α , D. NRF-1, E. TFAM, F. NRF-2, G. HIF-1 α , H. CS.

9.1.3. Curvas Estándar

Para la obtención de la curva estándar se realizaron diluciones consecutivas del templado (cDNA) obtenido de las células MRC-5; y empleando los oligos correspondientes para cada gen de estudio. Tras llevar a cabo el ensayo se obtienen los valores del ciclo umbral o Ct (Ct: threshold cycle) para cada dilución.

Para la obtención de la representación gráfica de las curvas estándar de cada gen, se graficó el ΔCt (valor obtenido al restar del valor de Ct del gen endógeno al valor del Ct del gen estudiado) contra el logaritmo de la concentración del cDNA presente en las diluciones (Fig. 11).



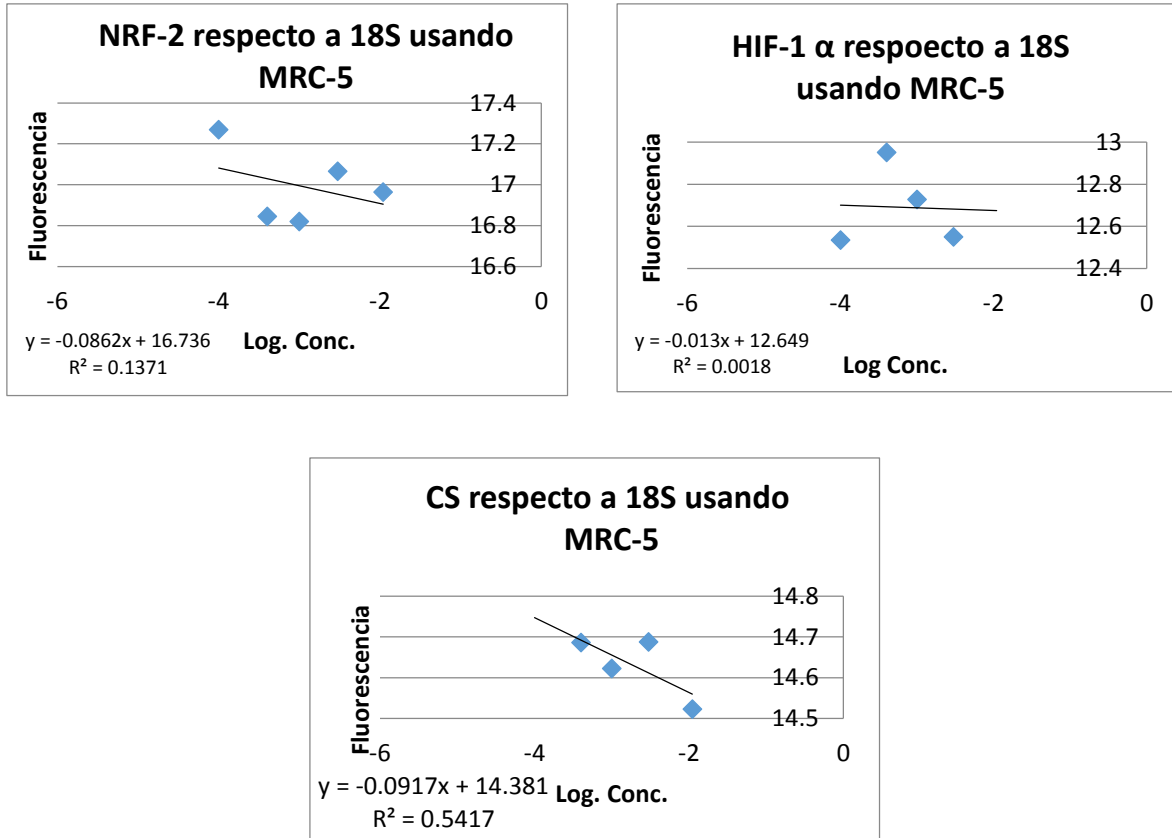


Figura 11. Curvas estándares correspondientes a cada gen. Las gráficas representan las diferentes diluciones empleadas en la reacción, que al ser analizadas utilizando al gen endógeno en cada una de ellas, permitió conocer la eficiencia de la reacción.

A partir de las gráficas de las curvas estándar se dedujo la ecuación de la recta para cada una de ellas, en donde la pendiente de esta recta fue igual o menor a 0.1 en casi todos los genes, lo cual valida la aplicación del método de ΔCt . Estas curvas también permitieron conocer el rango dinámico es decir, el rango de concentraciones entre las cuales la amplificación de ambos genes (el gen de interés y el gen endógeno) es eficiente. Por lo que se decidió emplear la concentración de 3.94ng/ μ L (concentración intermedia en el rango dinámico) para realizar los experimentos.

9.2. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES AMPK, PGC-1A, NRF-1, NRF-2, TFAM, HIF-1A Y CS.

Los valores de los ciclos umbrales obtenidos para cada uno de los genes de interés de las líneas celulares (A-427, A-549 y MCF-7) y células de fibroblastos MRC-5 fueron normalizados con los valores de los ciclos umbrales obtenidos para el 18S (gen endógeno), en la misma dilución y misma condición de crecimiento; obteniendo así el valor de ΔCt . Decidimos utilizar los valores de ΔCt de la condición de crecimiento Glucosa, pH 7.2 y normoxia (Glu7.2N), por lo que fue ajustada a 1, permitiendo la comparación de las otras 7 condiciones de crecimiento respecto a (Glu7.2N).

9.2.1. Expresión relativa de la AMPK

Interesantemente, las células MRC-5 mostraron niveles significativamente menores en el resto de las condiciones de cultivo respecto a Glu7.2N, lo que puede estar relacionado con niveles energéticos estables en esta línea celular. Mientras que, los niveles de expresión de AMPK en A-427 fueron significativamente mayores en hipoxia en comparación con la expresión observada en normoxia. Por otro lado, en A-549, los niveles de expresión fueron menores en casi todas las condiciones, excepto en Glu6.2H que aumentaron significativamente. Curiosamente en las células MCF-7, no se observa una variación significativa entre las ocho diferentes condiciones de cultivo (Fig. 12).

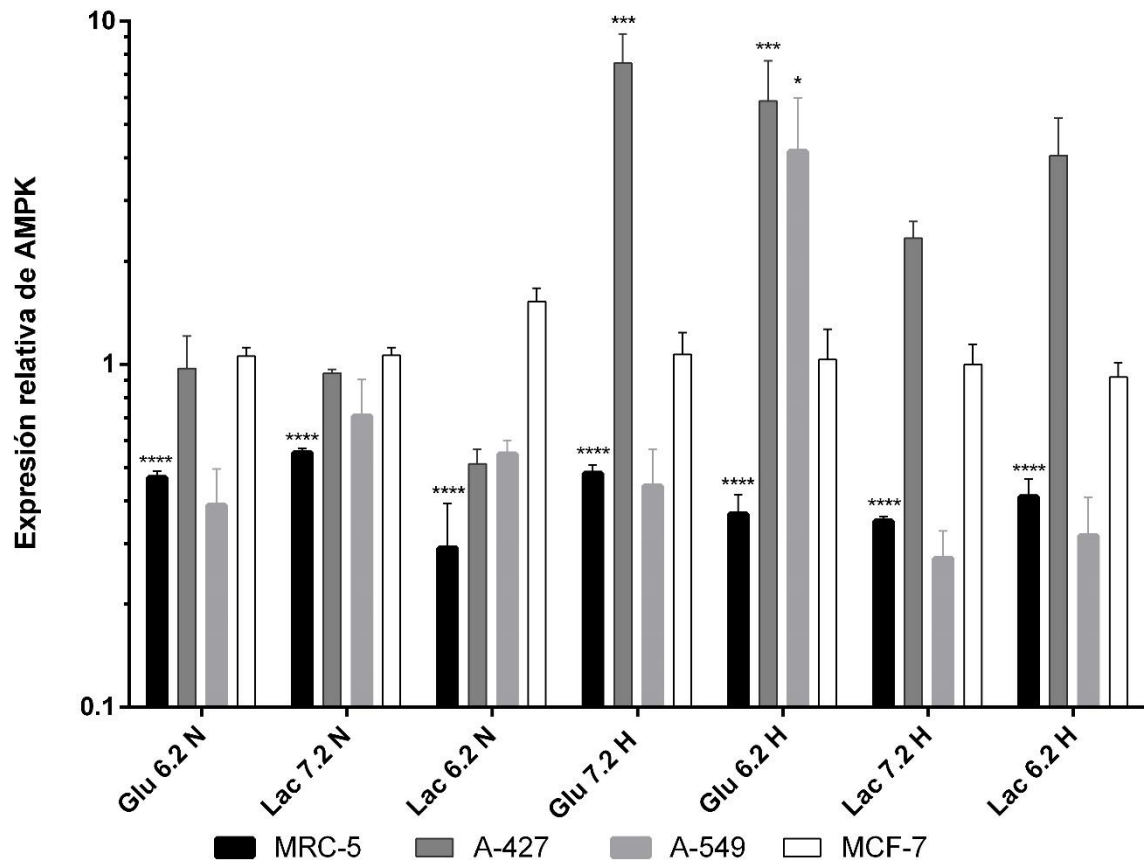


Figura 12. Cuantificación relativa de mRNA del gen AMPK en MRC-5, A-427, A-549 y MCF-7, cultivadas bajo diferentes condiciones, variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y pH. Los niveles de expresión fueron comparados respecto a la condición de Glucosa, pH 7 en normoxia. ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05. Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) pH 6.2 (6.2), Normoxia (N), Hipoxia (H).

9.2.2. Expresión relativa de PGC-1 α

De forma interesante, la expresión de PGC-1 α no se observó en las líneas celulares A-427 y MCF-7. Sin embargo en MRC-5, los niveles de expresión de PGC-1 α se observaron significativamente mayores cuando las células se cultivaron en condiciones de hipoxia en comparación cuando se cultivaron en normoxia. En A-549, la tensión baja de oxígeno y el pH ácido disminuyeron significativamente los niveles de expresión de PGC-1 α en comparación cuando se cultivaron en normoxia y pH 7.2 (Fig. 13)

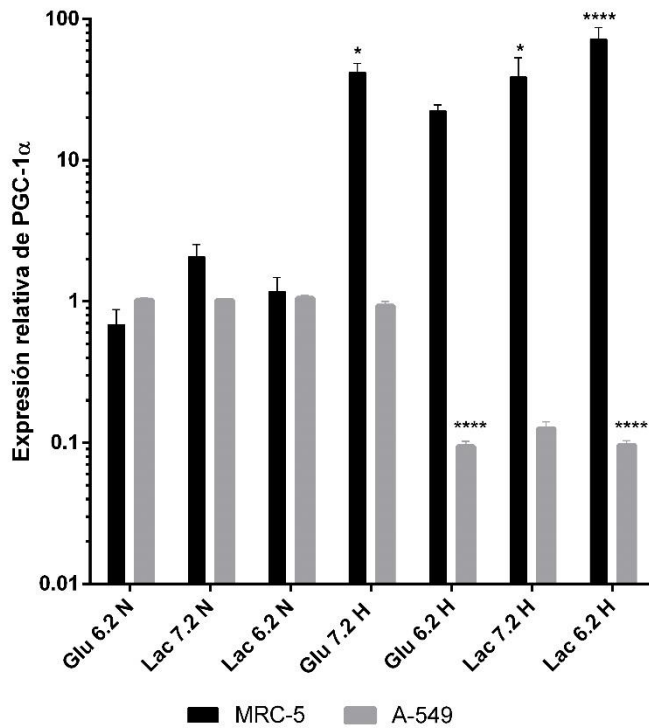


Figura 13. Cuantificación relativa de mRNA del gen PGC-1 α en las líneas MRC-5 y A-549, cultivadas bajo diferentes condiciones, variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y pH. Los niveles de expresión fueron comparados respecto a la condición de Glucosa, pH 7 en normoxia. ****p<0.0001, *p<0.05. . Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) pH 6.2 (6.2), Normoxia (N), Hipoxia (H).

9.2.3. Expresión relativa de NRF-1

Cuando las células MRC-5 y la línea celular A-427 se cultivaron en condiciones de hipoxia, los niveles de expresión de NRF-1 fueron significativamente mayores en comparación con sus contrapartes en normoxia. Sin embargo, en el caso de A-549 los niveles de expresión de NRF-1 no variaron significativamente en todas las condiciones. Por el contrario, en MCF-7, los niveles de expresión de NRF-1 fueron significativamente menores en condiciones de hipoxia en comparación cuando se cultivaron en normoxia, también cuando se cultivaron con lactato en condiciones de normoxia (Fig. 14).

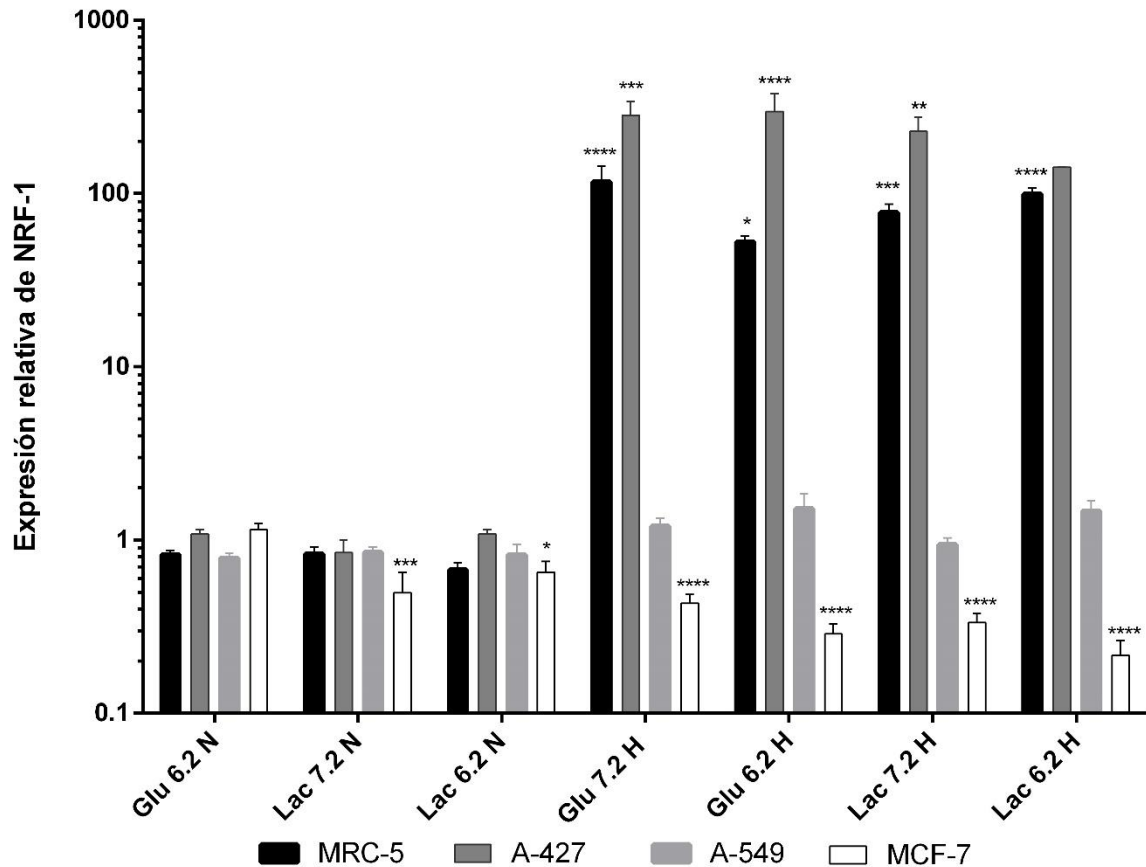


Figura 14. Cuantificación relativa de mRNA del gen NRF-1 en MRC-5, A-427, A-549 y MCF-7, cultivadas bajo diferentes condiciones, variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y pH. Los niveles de expresión fueron comparados respecto a la condición de Glucosa, pH 7 en normoxia. ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05. . Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) pH 6.2 (6.2), Normoxia (N), Hipoxia (H).

9.2.4. Expresión relativa de TFAM

En MRC-5, los niveles de expresión de TFAM no variaron en todas las condiciones analizadas. Mientras que en la línea celular A-427, los niveles de expresión de TFAM fueron significativamente mayores cuando las células se cultivaron con glucosa y en tensiones bajas de oxígeno en comparación cuando se cultivaron en normoxia. Por otra parte, cuando las células A-549 se cultivaron en condiciones de hipoxia, los niveles de expresión de TFAM fueron significativamente menores en comparación cuando se cultivaron en condiciones de normoxia. Interesantemente,

en MCF-7 los niveles de expresión de TFAM fueron significativamente menores en todas las condiciones (Fig. 15).

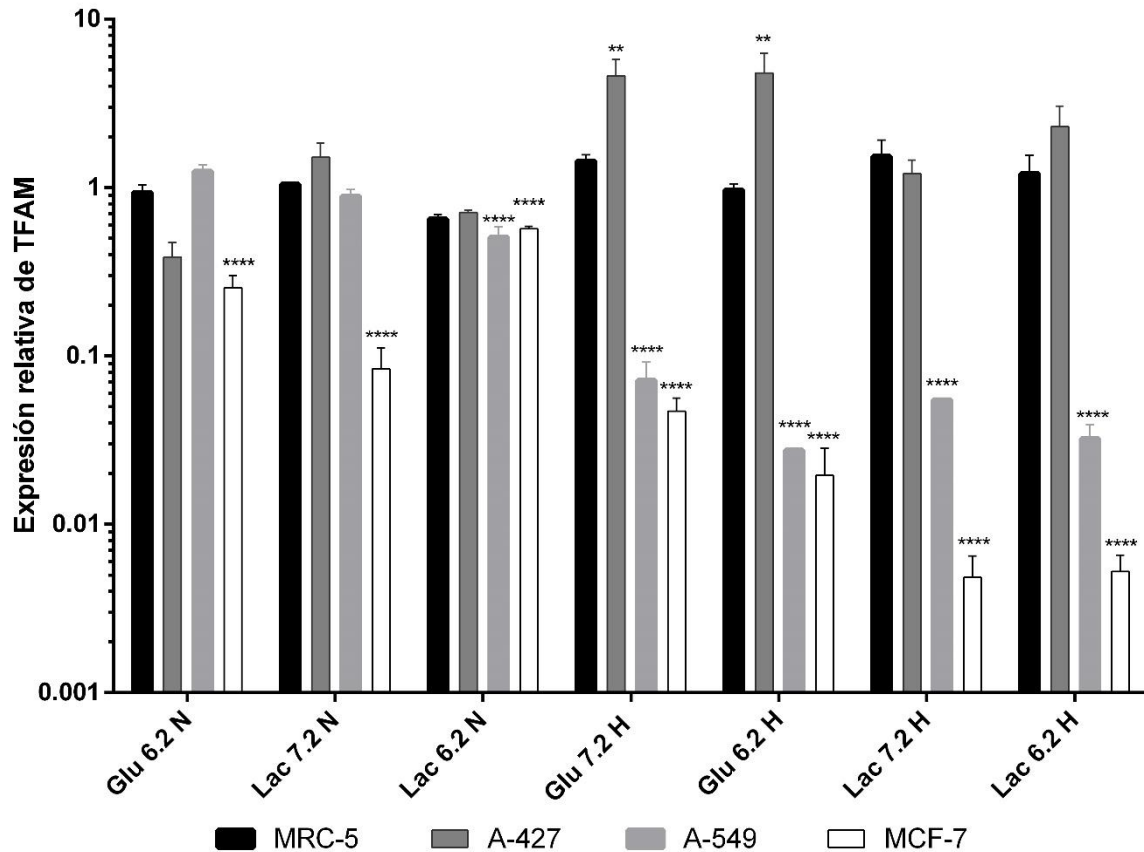


Figura 15. Cuantificación relativa de mRNA del gen TFAM en MRC-5, A-427, A-549 y MCF-7, cultivadas bajo diferentes condiciones, variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y pH. Los niveles de expresión fueron comparados respecto a la condición de Glucosa, pH 7 en normoxia. ****p<0.0001, **p<0.01. . Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) pH 6.2 (6.2), Normoxia (N), Hipoxia (H).

9.2.5. Expresión relativa de NRF-2

Cuando las células de fibroblastos MRC-5 se cultivaron con pH neutro tanto hipoxia como en normoxia, los niveles de expresión de NRF-2 fueron significativamente mayores en comparación cuando se cultivaron con pH ácido. En A-427 y en A-549, los niveles de expresión de NRF-2 fueron significativamente mayores cuando se cultivaron en hipoxia en comparación cuando fueron cultivadas en normoxia. Con respecto a los niveles de expresión de NRF-2 en MCF-7, éstos no variaron

significativamente en la mayoría de las condiciones, excepto en la condición de Lac7.2H que disminuyeron significativamente (Fig. 16).

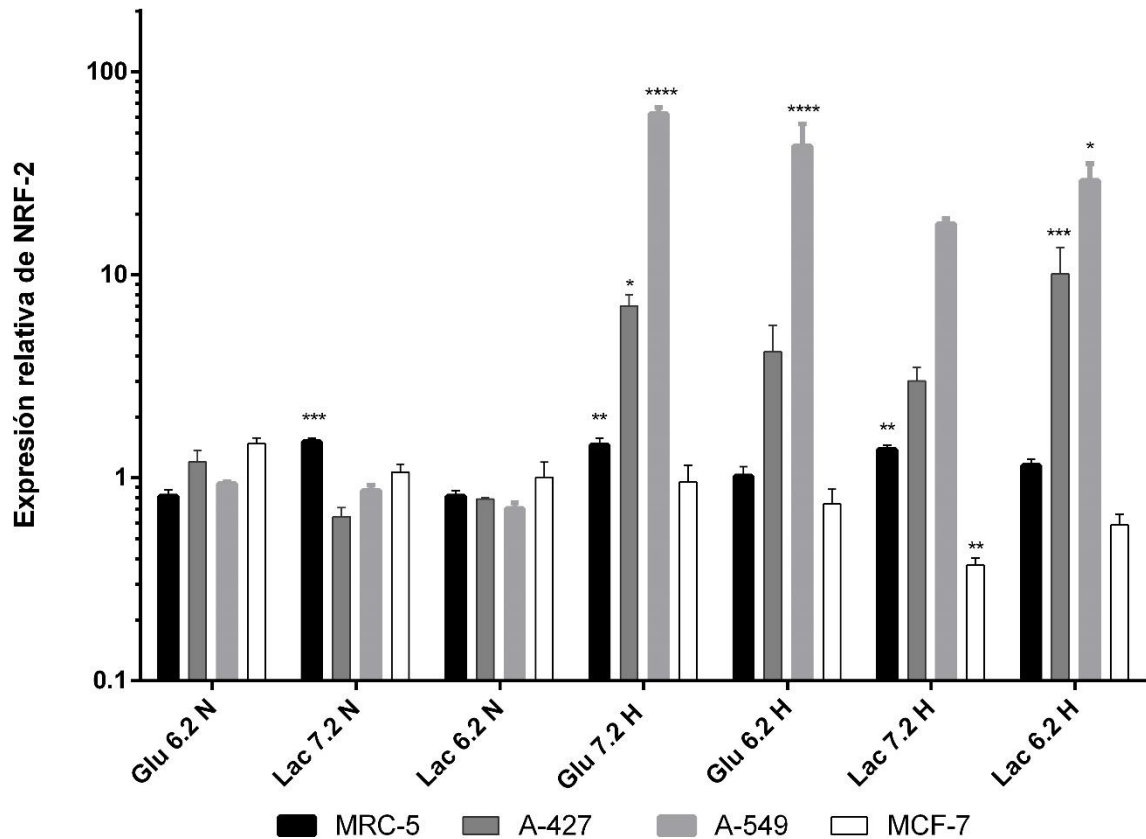


Figura 16. Cuantificación relativa de mRNA del gen NRF-2 en MRC-5, A-427, A-549 y MCF-7, cultivadas bajo diferentes condiciones, variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y pH. Los niveles de expresión fueron comparados respecto a la condición de Glucosa, pH 7 en normoxia. ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05. . Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) pH 6.2 (6.2), Normoxia (N), Hipoxia (H).

9.2.6. Expresión relativa de HIF-1α

Como se esperaba en condiciones de hipoxia, las células de fibroblastos MRC-5 y la línea de cáncer pulmonar A-427 incrementaron significativamente los niveles de expresión de HIF-1α en comparación cuando se cultivaron en una tensión de oxígeno normal. Interesantemente, cuando la línea celular A-549, se cultivó en normoxia, los niveles de expresión de HIF-1α fueron significativamente mayores en comparación cuando se cultivaron en hipoxia. Por otra parte, los niveles de

expresión de HIF-1 α en MCF-7 no variaron significativamente en todas las condiciones analizadas (Fig. 17).

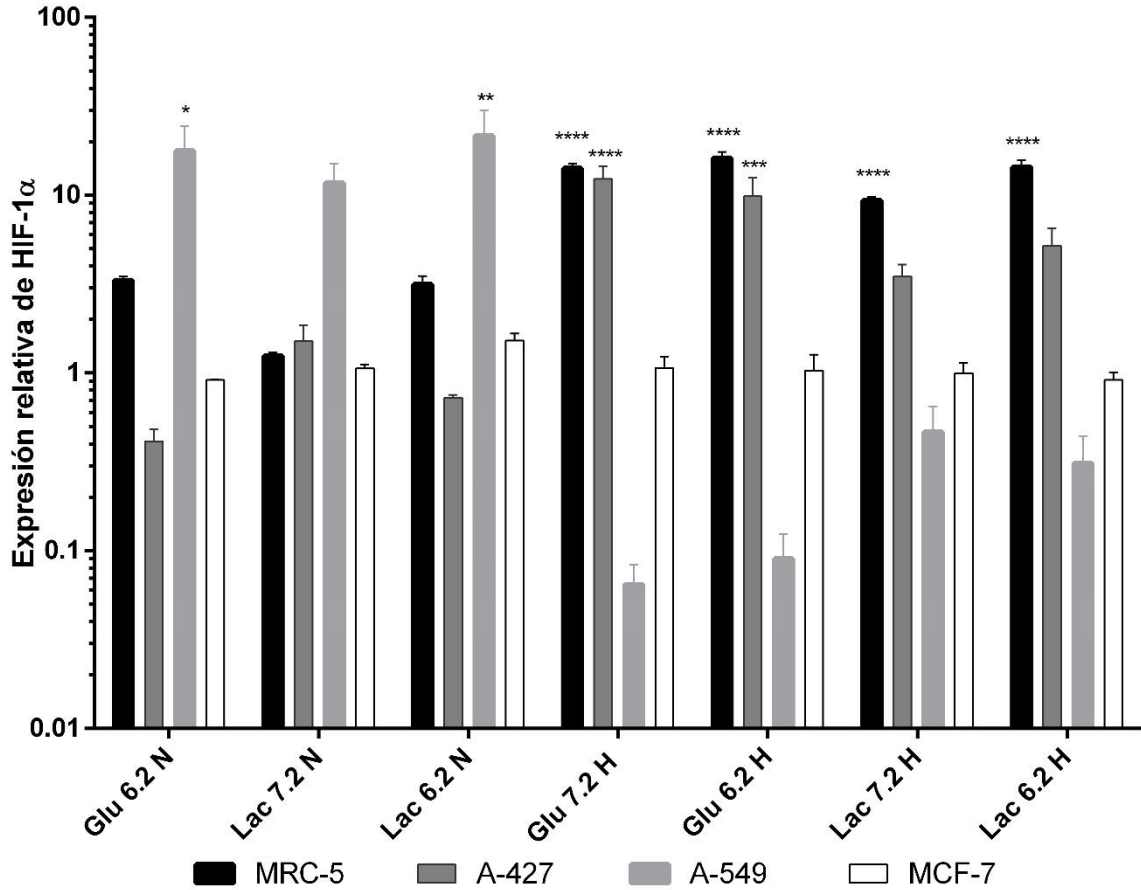


Figura 17. Cuantificación relativa de mRNA del gen HIF-1 α en MRC-5, A-427, A-549 y MCF-7, cultivadas bajo diferentes condiciones, variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y pH. Los niveles de expresión fueron comparados respecto a la condición de Glucosa, pH 7 en normoxia. ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05. . Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) pH 6.2 (6.2), Normoxia (N), Hipoxia (H).

9.2.7. Expresión relativa de la citrato sintasa (CS)

Puede observarse que los niveles de expresión de la citrato sintasa en las células MRC-5 fueron significativamente menores en hipoxia en comparación con sus contrapartes en normoxia. También puede observarse que en las líneas de adenocarcinoma pulmonar (A-427 y A-549), los niveles de expresión de la CS fueron significativamente mayores cuando las células fueron cultivadas en glucosa e

hipoxia en comparación cuando fueron cultivadas en glucosa y normoxia. Con respecto a las células MCF-7, los niveles de expresión de la CS no variaron significativamente en la mayoría de las condiciones, excepto en la condición Lac6.2H que disminuyeron significativamente (Fig. 18).

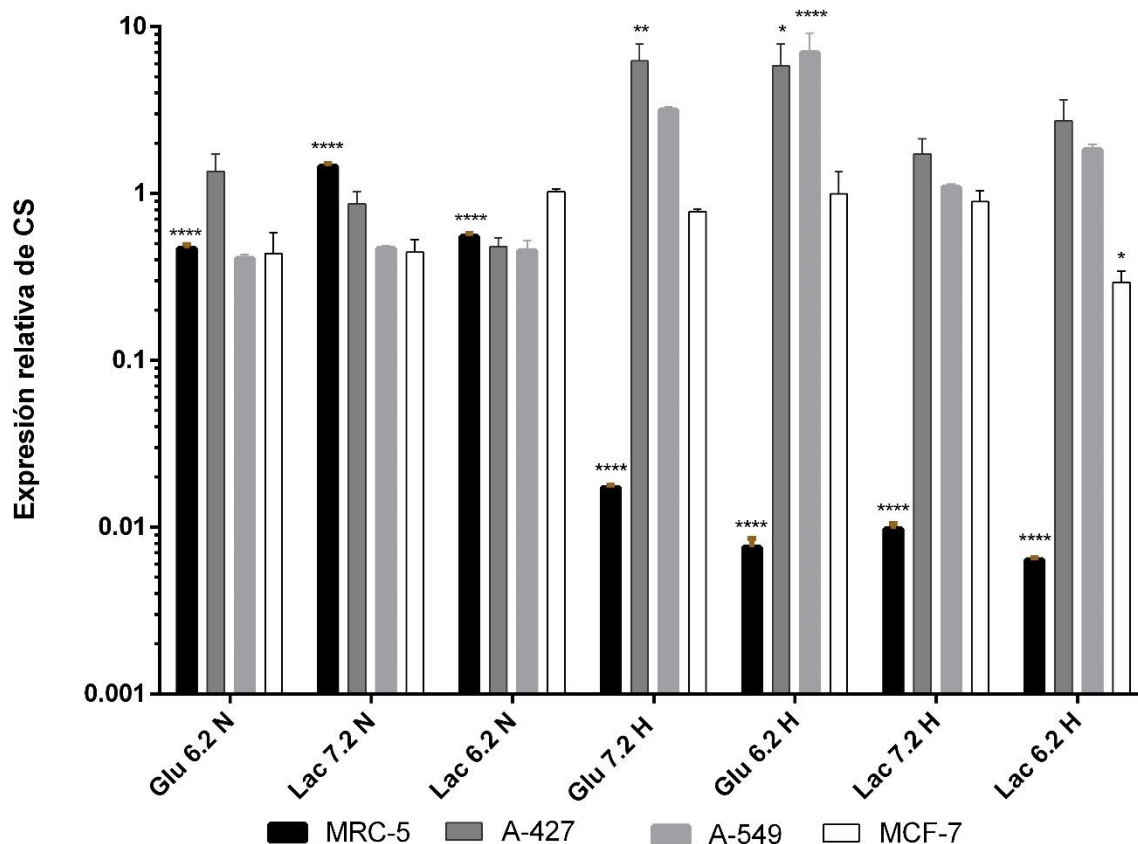


Figura 18. Cuantificación relativa de mRNA del gen citrato sintasa (CS) en MRC-5, A-427, A-549 y MCF-7, cultivadas bajo diferentes condiciones, variando la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y pH. Los niveles de expresión fueron comparados respecto a la condición de glucosa, pH 7.2 en normoxia. ****p<0.0001, **p<0.01, *p<0.05. Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) pH 6.2 (6.2), Normoxia (N), Hipoxia (H).

10. DISCUSIÓN

En este estudio se determinaron los niveles de expresión del mRNA de los principales genes reguladores de la biogénesis mitocondrial en diferentes líneas de cáncer pulmonar que fueron cultivadas bajo diferentes condiciones de cultivo variando fuente de carbono, pH y tensión de oxígeno.

En respuesta a la modificación de las condiciones de cultivo, las células tumorales presentaron diferentes niveles de expresión de los genes, sugiriendo que estas modificaciones en los patrones de expresión se llevaron a cabo en función de la supervivencia celular.

Se ha reportado que las células tumorales son capaces de modificar su metabolismo en función de los cambios en el microambiente, tales como acidosis y la disponibilidad de oxígeno (Romero-García et al, 2011). En este sentido, la expresión de la citrato sintasa (CS) puede relacionarse con el continuo funcionamiento del ciclo de Krebs tanto en condiciones de normoxia e hipoxia, debido a la función anabólica del ciclo de Krebs, en la que genera biomoléculas y macromoléculas como por ejemplo: ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminoácidos, ya que la CS cataliza la condensación de la acetil-CoA y el oxalacetato, lo que corresponde a la reacción inicial del ciclo de Krebs (Voet et al, 2009, Schlichtholz et al, 2005).

AMPK es una cinasa sensora de la energía y un potente regulador involucrado en la biogénesis mitocondrial interactuando directamente con PGC-1 α (Scarpulla, 2008).

Defectos en el metabolismo oxidativo y la reducción de los niveles de ATP celulares han demostrado activar a AMPK. Se ha observado que ésta cinasa regula la homeostasis mitocondrial en células normales, promoviendo tanto la biogénesis mitocondrial mediante la activación de PGC-1 α , así como la mitofagia, mediante la activación de factores como ULK1 (Unc-51-like kinase 1) y la inhibición de mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) (Boland et al, 2013). En este sentido, se han reportado niveles elevados de PGC-1 α en celulares de cáncer cervicouterino

(HeLa) y carcinoma de hígado (HepG2) respecto a su contraparte no transformada, y han relacionado este aumento con la capacidad de promoción del crecimiento del tumor (Jones et al, 2012). Por el contrario, se han reportado niveles bajos en la expresión de PGC-1 α en cáncer, mismos que se han asociado con disfunción mitocondrial (Finck y Kelly, 2006).

En este estudio encontramos que en MRC-5 hay un aumento de PGC-1 α en condiciones hipóxicas que no se relaciona con los niveles observados en AMPK, cuyos niveles de expresión se encuentran disminuidos, bajo estas condiciones. Sin embargo, se ha reportado que otra forma de contribuir a la expresión de PGC-1 α es mediada por la participación de CREB, puesto que se ha visto que un aumento en la generación de las especies reactivas de oxígeno (las cuales son generadas en condiciones de hipoxia) pueden contribuir a la activación de PGC-1 α (Wu et al, 2014). Tanto los niveles de expresión de PGC-1 α y de AMPK en la línea celular A-549 se encuentran disminuidos cuando se somete a una tensión de oxígeno baja y lactato como fuente de carbono, lo que sugiere que bajo estas condiciones el proceso de biogénesis mitocondrial no está siendo favorecido. Como se ha reportado, PGC-1 α está disminuído en múltiples tipos de cáncer, entre los cuales se encuentra el cáncer de mama (Watkins et al, 2004, Villena, 2015), lo cual podría explicar la ausencia de transcriptoma de PGC-1 α en MCF-7; sin embargo aún no hay estudios que reporten la expresión de PGC-1 α en la línea celular A-427.

El aumento en los niveles de expresión de NRF-1 observado en las células de fibroblastos MRC-5 podría relacionarse con el aumento observado en PGC-1 α bajo las mismas condiciones, ya que PGC-1 α interactúa directamente con NRF-1 (Scarpulla, 2008). Sin embargo, en el caso de A-427, en donde no se observó expresión de PGC-1 α , la elevación en los niveles de NRF-1 se podría deber a que PGC-1 β , otro miembro de la familia de PGC-1 y que se relaciona estructuralmente con PGC-1 α mostrando secuencias y motivos parecidos (Jones et al, 2012), también es capaz unirse a NRF-1 fungiendo así como un potente inductor de la expresión de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial. Esto se ha observado en células musculares en las cuales se ha forzado la expresión de PGC-

1 β observado un aumento en la biogénesis mitocondrial así como en el consumo de oxígeno, aunque PGC-1 α ha sido asociado con un mayor índice de flujo de electrones que PGC-1 β . La participación de PGC-1 β también podría estar implicada en el mantenimiento de los niveles de NRF-1 en A-549, ya que se ha mencionado que ambos miembros de la familia PGC-1 actúan sobre NRF-1 y a otros factores de transcripción para inducir la biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2008). Sin embargo, para poder descartar si PGC-1 β es el que está interactuando con los factores respiración se tendrían que medir los niveles de expresión también de este gen. Del mismo modo que los niveles del mRNA de NRF-1 se relacionan con el aumento o disminución de PGC-1 α , los niveles de expresión de TFAM mantuvieron la misma dependencia con NRF-1 en todas las líneas celulares analizadas.

En el caso de las líneas de cáncer de pulmón, éstas presentaron niveles de expresión de NRF-2 aumentados bajo condiciones hipóxicas; mientras que MRC-5 y MCF-7 los mantuvieron constantes. Tomando en cuenta la dependencia que tiene este NRF-2 con PGC-1 α , se esperaría que los niveles estuvieran disminuidos; sin embargo presentan un comportamiento contrario, lo que se pudiera explicar de la siguiente manera, al igual que NRF-1, NRF-2 se ha reportado que puede ser estimulado por PGC-1 β (Boland et al, 2013). Aunado a esto, se ha reportado que NRF-2 puede ser activado también por los receptores relacionados al estrógeno o ERR. Los ERR son miembros que pertenecen a la familia de los receptores nucleares, que comparten una similitud estructural con los receptores de estrógeno, y están relacionados con la activación de genes mitocondriales que participan en la biogénesis mitocondrial (Wu et al, 2015, Shigeta et al, 1997). De forma interesante se observó que la expresión de NRF-2 fue constante o hubo una sobre-expresión lo cual puede sugerir que para la célula es de gran importancia. Se sabe que NRF-2 está involucrado en la expresión de la citocromo oxidasa y el control nuclear de la función mitocondrial (Scarpulla, 2008), también se sabe que participa en el ensamblaje y en la organización del mitocondrion (UniProt, 2016), en la defensa contra las especies reactivas de oxígeno y en la reprogramación metabólica hacia vías anabólicas, como por ejemplo, de aquellas involucradas en la biosíntesis de nucleótidos, promoviendo el crecimiento celular (Boland et al, 2013). Debido a estos

hallazgos, se cree que la expresión de NRF-2 es importante para la célula aún en condiciones hipóxicas.

HIF-1 α corresponde a un factor de transcripción que induce la expresión de genes en respuesta a la hipoxia. Al someter a las células tanto tumorales como no transformadas a tensiones bajas de oxígeno, se favorece la estabilidad de HIF-1 α impidiendo su ubiquitinación y degradación vía proteosoma (Chiche et al, 2010).

En las células MRC-5 hubo un aumento en los niveles de expresión de mRNA de HIF-1 α cuando se cultivaron en hipoxia. Mientras que la línea tumoral de A-427 presentó un comportamiento parecido a la línea control, lo que indica que en estas células también están respondiendo a la falta de oxígeno mediante la expresión de HIF-1 en respuesta a la privación de oxígeno. Sin embargo, en el caso de la línea tumoral A-549 se observa una completa desregulación en HIF-1 α . La elevación que se observa en condiciones de normoxia puede sugerir que la subunidad 1 alfa de HIF se encuentra estable; y que por el contrario, en condiciones de tensión baja de oxígeno, ésta está siendo degradada. Varios autores han relacionado un aumento en los niveles de expresión de este gen en condiciones de normoxia, debido a posibles polimorfismos en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), estos cambios en el ODD son: Pro582Ser (C1772T) y Ala588Thr(G1790A), lo que impidiendo su hidroxilación por la PHD (Prolil hidroxilasa), posterior ubiquitinación y degradación (Ranasinghe, et al 2015, Nagaraju et al, 2015). Otro mecanismo por el cual pueda estar siendo estabilizado la subunidad 1 alfa de HIF en condiciones de normoxia, involucra la participación de la mitocondria, de los intermediarios del ciclo de Krebs y el ion Fe⁺², lo cuales determinan la estabilidad de HIF-1 α al regular la actividad de la PHD, que esta enzima requiere Fe⁺² y O₂ como cosustratos para agregar el grupo hidroxilo al dominio de degradación dependiente de oxígeno. Por otra parte, se ha reportado que las especies reactivas de oxígeno también tienen la capacidad de estabilizar a HIF al actuar sobre Fe⁺² oxidandolo a Fe³⁺, disminuyendo la actividad de la PHD (Nagaraju et al, 2015, Kim et al, 2007). Sin embargo estos mecanismos de regulación sólo se han observado en condiciones hipóxicas. Por otro lado, no se han encontrado reportes que indiquen

una disminución en la expresión del mRNA de HIF-1 α cuando se cultivan a las células en tensiones bajas de oxígeno, fenómeno que se observó en la línea de adenocarcinoma pulmonar A-549.

11. CONCLUSIONES

Los niveles de expresión de los principales reguladores de la biogénesis mitocondrial se ven modificados cuando se varían las condiciones de tensión de oxígeno, fuente de carbono y pH en las líneas de cáncer de pulmón.

No se observó expresión de PGC-1 α en A-427 lo que sugiere la colaboración de otros genes como por ejemplo, PGC-1 β o los ERR en la activación de la biogénesis mitocondrial, activando a NRF-1 y NRF-2.

En A-549 se podría sugerir que el proceso de biogénesis mitocondrial no se lleva a cabo en condiciones de hipoxia, puesto que se observaron niveles disminuidos de PGC-1 α y de TFAM, así como niveles constantes de NRF-1 y NRF-2, a diferencia de A-427, en donde se observa un aumento en NRF-1 y NRF-2 así como en TFAM.

Por otra parte, con base a los niveles de expresión observados de la CS en las líneas celulares A-549 y A-427, se sugiere que estas células poseen mitocondrias funcionales aún en condiciones de baja tensión de oxígeno y acidosis.

12. REFERENCIAS

1. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. (2006). Introducción a la Biología celular. Buenos Aires: Médica Panamericana.
2. Anderson, A.S., Roberts, P.C., Frisard, M.I., McMillan, R.P., Brown, T.J., Lawless, M.H., Hulver, M.W. & Schmelz, E.M. (2013). Metabolic changes during ovarian cancer progression as targets for sphingosine treatment. *Experimental Cell Research*, 319(10), 1431-1442.
3. Aravamudan, B., Thompson, M. A., Pabelick, C. M., & Prakash, Y. S. (2013). Mitochondria in lung diseases. *Expert review of Respiratory Medicine*, 7(6), 631-646.
4. Arias, J. (2000). Enfermería Médico-Quirúrgica I. Madrid: Tébar.
5. Baeriswyl, V., Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329-337.
6. Baker, M. J., Frazier, A. E., Gulbis, J. M., & Ryan, M. T. (2007). Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends in Cell Biology*, 17(9), 456-464.
7. Balliet, R.M., Capparelli, C., Guido, C., Pestell, T.G., Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Chiavarina, B., Pestell, R.G., Howell, A., Sotgia, F. & Lisanti, M.P. (2011). Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth: understanding the aging and cancer connection. *Cell Cycle*, 10(23), 4065-4073.
8. Bergeron, R., Ren, J.M., Cadman, K.S., Moore, I.K., Perret, P., Pypaert, M., Young, L.H., Semenkovich, C.F. & Shulman, G.I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 281(6), 1340-1346.
9. Boland, M. L., Chourasia, A. H., & Macleod, K. F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in Oncology*, 10(3), 292.

10. Campbell, C. T., Kolesar, J. E., & Kaufman, B. A. (2012). Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(9), 921-929.
11. Campbell, N. A. (2007). *Biología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
12. Cannino, G., Di Liegro, C. M., & Rinaldi, A. M. (2007). Nuclear–mitochondrial interaction. *Mitochondrion*, 7(6), 359-366.
13. Chaube, B., & Bhat, M. K. (2016). AMPK, a key regulator of metabolic/energy homeostasis and mitochondrial biogenesis in cancer cells. *Cell Death & Disease*, 7(1), 2044.
14. Chaube, B., Malvi, P., Singh, S. V., Mohammad, N., Viollet, B., & Bhat, M. K. (2015). AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis. *Cell Death Discovery*, (1).
15. Chen, L. Y., Yang, B., Zhou, L., Ren, F., Duan, Z. P., & Ma, Y. J. (2015). Promotion of mitochondrial energy metabolism during hepatocyte apoptosis in a rat model of acute liver failure. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5035-5041.
16. Chen, L., Liu, T., Zhou, J., Wang, Y., Wang, X., Di, W., & Zhang, S. (2014). Citrate synthase expression affects tumor phenotype and drug resistance in human ovarian carcinoma. *PloS one*, 9(12), e115708.
17. Chiche, J., Brahim-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 771-794.
18. Choi, S. Y. C., Collins, C. C., Gout, P. W., & Wang, Y. (2013). Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *The Journal of Pathology*, 230(4), 350-355.
19. Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. Universidad de Michigan: Sinauer.
20. Cormio, A., Guerra, F., Cormio, G., Pesce, V., Fracasso, F., Loizzi, V., Cantatore, P., Selvaggi, L. & Gadaleta MN. (2009). The PGC-1 α -dependent

- pathway of mitochondrial biogenesis is upregulated in type I endometrial cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(4), 1182-1185.
21. Correia, R. L., Oba-Shinjo, S. M., Uno, M., Huang, N., & Marie, S. K. N. (2011). Mitochondrial DNA depletion and its correlation with TFAM, TFB1M, TFB2M and POLG in human diffusely infiltrating astrocytomas. *Mitochondrion*, 11(1), 48-53.
 22. Crea, F., Danesi, R., & Farrar, W. L. (2009). Cancer stem cell epigenetics and chemoresistance. *Epigenomics*, 1(1), 63-79.
 23. Curtis, H., Schnek, A. (2008). *Biología*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
 24. D'Errico, I., Salvatore, L., Murzilli, S., Sasso G.L., Latorre, D., Martelli, N., Egorova, A.V., Polishuck, R., Madeyski-Bengtson, K., Lelliott, C., Vidal-Puig, A.J., Seibel, P., Villani, G. & Moschetta, A. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1- α (PGC1 α) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(16), 6603-6608.
 25. Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 615-622
 26. Finsterer, J., & Stöllberger, C. (2016). Oncocytoma and noncompaction in metabolic myopathy. *International Journal of Cardiology*, 207, 382-383.
 27. Globocan. Organización Mundial de la Salud. <http://www.globocan.iarc.fr/Default.aspx> 2012
 28. Gridelli, C., Rossi, A., & Carbone, D. P. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 15009.
 29. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
 30. Hardie^a, D. G. (2011). Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 93(4), 891-896.

31. Hardie^b, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 1-13.
32. Jones, A. W., Yao, Z., Vicencio, J. M., Karkucinska-Wieckowska, A., & Szabadkai, G. (2012). PGC-1 family coactivators and cell fate: Roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria–nucleus signalling. *Mitochondrion*, 12(1), 86-99.
33. Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry*, (47), 69-84.
34. Justus, C. R., Sanderlin, E. J., & Yang, L. V. (2015). Molecular connections between cancer cell metabolism and the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 11055-11086.
35. Kalluri, R., Weinberg, R. A. (2010). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1786.
36. Kang, D., Kim, S. H., & Hamasaki, N. (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*, 7(1), 39-44.
37. Kim, J. W., Gao, P., & Dang, C. V. (2007). Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 291-298.
38. Kimbro, K. S., Simons, J. W. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-related Cancer*, 13(3), 739-749.
39. Koolman, J. (2005). *Bioquímica: Texto y Atlas*. Madrid: Médica Panamericana.
40. LeBleu, V.S., O'Connell, J.T., Gonzalez Herrera, K.N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M.C., de Carvalho, F.M., Damascena, A., Domingos Chinen, L.T., Rocha, R.M., Asara, J.M. & Kalluri, R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology*, 16(10), 992-1003.
41. Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. 41(3), 211-218.

42. Nagaraju, G. P., Bramhachari, P. V., Raghu, G., & El-Rayes, B. F. (2015). Hypoxia inducible factor-1 α : Its role in colorectal carcinogenesis and metastasis. *Cancer Letters*, 366(1), 11-18.
43. Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2005). Lehninger: Principios de Bioquímica. Barcelona: OMEGA.
44. Nosek, J., & Tomáška, L. (2003). Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Current Genetics*, 44(2), 73-84.
45. Piantadosi, C. A., & Suliman, H. B. (2006). Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 324-333.
46. Pierce, B. A. (2009). Genética un enfoque conceptual. Buenos Aires: Medica Panamericana.
47. Ranasinghe, W. K., Baldwin, G. S., Bolton, D., Shulkes, A., Ischia, J., & Patel, O. (2015). HIF1 α expression under normoxia in prostate cancer—which pathways to target? *The Journal of Urology*, 193(3), 763-770.
48. Reznick, R.M., Zong, H., Li, J., Morino, K., Moore, I.K., Yu, H.J., Liu, Z.X., Dong, J., Mustard, K.J., Hawley, S.A., Befroy, D., Pypaert, M., Hardie, D.G., Young, L.H. & Shulman, G.I. (2007). Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metabolism*, 5(2), 151-156.
49. Ricard, F. (2008). Tratado de osteopata visceral y medicina interna. Buenos Aires: Medica Panamericana.
50. Roberts, P. C., Mottillo, E. P., Baxa, A. C., Heng, H. H., Doyon-Reale, N., Gregoire, L., Lancaster, W.D., Rabah, R. & Schmelz, E. M. (2005). Sequential molecular and cellular events during neoplastic progression: a mouse syngeneic ovarian cancer model. *Neoplasia*, 7(10), 944-956.
51. Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Báez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., & Prado-Garcia, H. (2011). Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biology & Therapy*, 12(11), 939-948.

52. Savagner, F., Mirebeau, D., Jacques, C., Guyetant, S., Morgan, C., Franc, B., Reynier, P. & Malthiery, Y. (2003). PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocytoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(3), 779-784.
53. Scarpulla, R. C. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews*, 88(2), 611-638.
54. Schlichtholz, B., Turyn, J., Goyke, E., Biernacki, M., Jaskiewicz, K., Sledzinski, Z., & Swierczynski, J. (2005). Enhanced citrate synthase activity in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 30(2), 99-104.
55. Semenza, G. L. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 8(4), 62-67.
56. Seyfried, T. N. (2015). Cancer as a mitochondrial metabolic disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, (3).
57. Shigeta, H., Zuo, W., Yang, N., DiAugustine, R., & Teng, C. T. (1997). The mouse estrogen receptor-related orphan receptor alpha 1: molecular cloning and estrogen responsiveness. *Journal of Molecular Endocrinology*, 19(3), 299-309.
58. Shimogai, R., Kigawa, J., Itamochi, H., Iba, T., Kanamori, Y., Oishi, T., Shimada, M., Sato, S., Kawaguchi, W., Sato, S., & Terakawa, N. (2008). Expression of hypoxia-inducible factor 1 α gene affects the outcome in patients with ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18(3), 499-505.
59. Srivastava, S., Barrett, J. N., & Moraes, C. T. (2007). PGC-1 α/β upregulation is associated with improved oxidative phosphorylation in cells harboring nonsense mtDNA mutations. *Human Molecular Genetics*, 16(8), 993-1005.
60. Tortora, G. J. (2007). Introducción a la microbiología. Buenos Aires: Médica Panamericana.
61. Uniprot. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q06547> 2016

62. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.
63. Vaux, D. L. (2011). In defense of the somatic mutation theory of cancer. *Bioessays*, 33(5), 341-343.
64. Villena, J. A. (2015). New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *The FEBS Journal*, 282(4), 647-672.
65. Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. (2009). *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
66. Wang, J., Ni, Z., Duan, Z., Wang, G., & Li, F. (2014). Altered expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and its regulatory genes in gastric cancer tissues. *PloS One*, 9(6), e99835.
67. Watkins, G., Douglas-Jones, A., Mansel, R. E., & Jiang, W. G. (2004). The localisation and reduction of nuclear staining of PPAR γ and PGC-1 in human breast cancer. *Oncology Reports*, 12(2), 483-488.
68. Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Induction and testing of hypoxia in cell culture. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (54), e2899-e2899.
69. Wu, S. B., Wu, Y. T., Wu, T. P., & Wei, Y. H. (2014). Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(4), 1331-1344.
70. Wu, Y. M., Chen, Z. J., Liu, H., Wei, W. D., Lu, L. L., Yang, X. L., Liang, W. T., Liu, T., Liu, H. L., Du, J., & Wang, H. S. (2015). Inhibition of ERR α suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells by directly targeting fibronectin. *Oncotarget*, 6(28), 25588.
71. Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C. & Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115-124.

72. Yin, P. H., Lee, H. C., Chau, G. Y., Wu, Y. T., Li, S. H., Lui, W. Y., Wei, Y.H., Liu, T.Y. & Chi, C. W. (2004). Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 90(12), 2390-2396.
73. Zhao, M., Zhang, Y., Zhang, H., Wang, S., Zhang, M., Chen, X., Wang, H., Zeng, G., Chen, X., Liu, G. & Zhou, C. (2015). Hypoxia-induced cell stemness leads to drug resistance and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 87(2), 98-106.
74. Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L. & Simons, J. W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Research*, 59(22), 5830-5835.
75. Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J., & Shulman, G. I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15983-15987.