



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DEL METABOLISMO
EN CÁNCER DE PULMÓN Y LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL
TUMORAL RESPECTO A LA NORMAL EN
CONDICIONES DE ESTRÉS METABÓLICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO EN

BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

CAMPA HIGAREDA ANDREA

A S E S O R

DRA. AIDA SUSANA ROMERO GARCÍA

C O A S E S O R E S

DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

DR. J. FRANCISCO MONTIEL SOSA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
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

Evaluación de la modificación del metabolismo en cáncer de pulmón y la funcionalidad mitocondrial tumoral respecto a la normal en condiciones de estrés metabólico.

Que presenta la pasante Andrea Campa Higareda

Con número de cuenta: 307110907 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 08 de Noviembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|---------------|-----------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dr. J. Francisco Montiel Sosa | |
| VOCAL | Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda | |
| SECRETARIO | Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Maritere Domínguez Rojas | |
| 2do. SUPLENTE | Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García | |

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, DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN; INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. AIDA SUSANA ROMERO GARCÍA Y EL DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA.

DEDICATORIAS

A mis padres, los cuales me han amado y cuidado por tantos años, que me han enseñado el valor del trabajo, de la familia y sobre todo me han guiado por el camino de la honestidad. Sin ustedes este trabajo y mi carrera profesional no hubieran sido posibles.

A mi madre, Susana Higareda Robles. Te agradezco infinitamente tu cariño y todas las noches de desvelo que sufriste por mí causa. Has creído en mí, cuando ni yo misma lo he hecho, me has apoyado y brindado aliento en épocas difíciles. Espero algún día ser tan fuerte como tú.

A mi padre, Sergio Campa Astorga. No hay nadie más trabajador y honesto. Aunque no estamos de acuerdo en muchas cosas, te agradezco la paciencia, el cariño y el amor que me has dado todos estos años. Eres mi mayor ejemplo a seguir.

A mis hermanos Sergio y Jorge, que me han acompañado a lo largo de mi vida y que poco a poco me han enseñado a ser más relajada, que me quieren y me aceptan, aun cuando soy su hermana la "rara".

A mi abuelita, Rosalba Astorga. Que ha sido otro pilar fundamental en mi crecimiento y desarrollo profesional. Le agradezco mucho todo el apoyo que me ha brindado y su cariño. Gracias abu.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Romero y al Dr. Heriberto Prado, que me tuvieron muuucha paciencia en esta etapa tan difícil de mi vida. En serio les agradezco mucho su esfuerzo, el apoyo profesional y moral que me mostraron. Me enseñaron que lo bien aprendido no se olvida y me ayudaron a ver que la investigación es el camino por el cual debo seguir.

A todos los compañeros del Laboratorio de Cáncer Pulmonar: Lorenzo, Rodolfo y Joel que me hicieron muy agradable la estancia en el laboratorio. A la Dra. Ángeles, Dra. Dolores, Miriam y Manuel que fueron muy amables conmigo. Y sobre todo al Dr. Sullivan López por abrirme las puertas de su laboratorio.

A mis compañeros de la Facultad, con los que viví muchas horas de estrés, Quetzalli, Gerardo y Marco, muchas gracias por haberme acompañado en esta larga travesía del desarrollo profesional. También a Diego, Raúl, Liz, Mariana, Marco Morales y Alberto a los cuales les tengo un gran cariño.

A mi mejor amiga, Erika. Que ha sido un gran apoyo en épocas difíciles, te agradezco mucho tu amistad, el cariño tan sincero que tienes conmigo y los consejos que me has dado. Te quiero mucho Eri.

A la Sra. María Cosgaya y a su esposo Don Jesús. Les agradezco mucho todas las atenciones que han tenido con mi familia. Sin ustedes, esta tesis tampoco sería posible. Espero algún día poder devolverles todas las atenciones que han tenido con nosotros. Muchas gracias.

A la UNAM, que podría decir que no sea haya dicho antes, me ha dado todo: educación, crecimiento personal, experiencias nuevas y mi carrera.

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------|--|
| $\Delta\Psi_m$ | Potencial de membrana mitocondrial |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomicia D |
| AD | Adenocarcinoma |
| ADP | Adenosina-5'-difosfato |
| AMP | Adenosina monofosfato |
| ATP | Adenosina-5'-trifosfato |
| CCCP | Carbonil cianuro 3-clorofehidrazona |
| FADH₂ | Flavina adenina dinucleótido reducido |
| GLUT1 | Transportador de glucosa 1 |
| GTP | Guanosina-5'-trifosfato |
| HIF | Factor de transcripción inducible por hipoxia |
| HIF-1α | Subunidad alfa del factor de transcripción inducible por hipoxia |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática |
| JC-1 | 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3'-yoduro de tetraetilbencimidazolcarbocianina |
| MFI | Intensidad media de fluorescencia |
| NAD⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado |
| NADH₂ | Nicotinamida adenina dinucleótido reducido |
| NADP⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido |
| NSCLC | Cáncer pulmonar de células no pequeñas |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |

| | |
|-------------|--|
| PHD | Prolilhidroxilasa |
| PDK | Piruvato deshidrogenasa cinasa |
| PBS | Buffer salino de fosfatos |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SCLC | Cáncer pulmonar de células no pequeñas |
| SqCC | Carcinoma de células escamosas |
| SFB | Suero fetal bovino |

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1.1 Cáncer | 1 |
| 1.2. Epidemiología del cáncer | 1 |
| 1.2.1 Epidemiología del cáncer de pulmón | 1 |
| 1.3 Clasificación del cáncer de pulmón | 2 |
| 1.4 Marcas de clase del cáncer | 3 |
| 1.5 Metabolismo de células no tumorales | 4 |
| 1.5.1 Glicólisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas | 4 |
| 1.5.2 Mitocondria | 7 |
| 1.5.3 Ciclo de Krebs | 8 |
| 1.5.4 Fosforilación oxidativa | 11 |
| 1.6 Capacidad reductora celular | 12 |

2. ANTECEDENTES

| | |
|--|----|
| 2.1. Reprogramación metabólica | 14 |
| 2.1.1 Efecto Warburg | 15 |
| 2.1.2 Glutaminolisis | 16 |
| 2.2 Microambiente tumoral | 18 |
| 2.2.1 Hipoxia | 18 |
| 2.2.1.1 Moléculas de respuesta a la hipoxia: Factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α) | 19 |
| 2.2.1.2 Moléculas de respuesta a la hipoxia: Piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) | 22 |
| 2.2.2 Lactosis: Producción de lactato | 23 |

| | |
|---|----|
| 2.3.3 Acidosis | 25 |
| 2.3. Simbiosis metabólica | 26 |
| 2.3.1 Marcadores de metabolismo celular | 27 |
| 2.3.1.1 Proteína receptora transferrina (CD71) | 27 |
| 2.3.2.2 5'-ecto nucleotidasa (CD73) | 27 |
| 2.3.2.3 Transportador de aminoácidos (CD98) | 28 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 30 |
| 4. OBJETIVOS | 31 |
| Objetivo general | 31 |
| Objetivos particulares | 31 |
| 5. HIPÓTESIS | 32 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 6.1 Reactivos | 33 |
| 6.2 Equipos | 33 |
| 6.3 Cultivo celular | 34 |
| 6.4 Conteo y viabilidad celular | 34 |
| 6.5 Condiciones de cultivo | 34 |
| 6.6 Cinéticas de crecimiento celular | 35 |
| 6.7 Consumos de glucosa y glutamina, producción de lactato y glutamato | 36 |
| 6.8 Evaluación de la masa mitocondrial empleando Mitotracker Green por citometría de flujo. | 36 |
| 6.9 Evaluación de la capacidad reductora celular empleando alamar blue por fluorometría. | 38 |
| 6.10 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial empleando | 39 |

| | |
|---|----|
| JC-1/ Anexina V/ 7-AAD por citometría de flujo | |
| 6.11 Evaluación de los marcadores HIF-1 α y PDK por citometría de flujo | 42 |
| 6.12 Evaluación de los marcadores de metabolismo CD98/CD73/CD71 por citometría de flujo. | 44 |
| 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 47 |
| 8. RESULTADOS | 48 |
| 8.1 Los cultivos en normoxia presentaron mayor proliferación celular que sus contrapartes hipoxicas. | 48 |
| 8.2 El consumo de glucosa se incrementó en MRC-5 y SKMES-1 en hipoxia | 50 |
| 8.3 La producción de lactato se incrementó en MRC-5 y SKMES-1 en hipoxia | 52 |
| 8.4 El consumo de glutamina fue mayor en lactato pH 6.2 normoxia | 53 |
| 8.5 La producción de glutamato fue menor en hipoxia | 55 |
| 8.6 La masa mitocondrial disminuyó cuando las células se cultivaron con lactato e hipoxia | 57 |
| 8.7 La capacidad reductora celular incrementó en los medios con acidosis y lactato tanto en SKMES-1 como en MRC-5 | 58 |
| 8.8 El potencial de membrana mitocondrial disminuyó en la línea celular SKMES-1 | 59 |
| 8.9 En medios con lactato e hipoxia se incrementó la expresión de PDK-1 y HIF-1 α | 62 |
| 8.10 CD98 incrementó su expresión en SKMES-1 en los medios con lactato y pH 7.2 | 64 |
| 9. DISCUSIÓN | 66 |
| 10. CONCLUSIONES | 77 |
| 11. APÉNDICE | 78 |
| 12 REFERENCIAS | 80 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.- Metabolismo de la glucosa en células no transformadas. | 4 |
| Figura 2.- Representación de la glicólisis. | 6 |
| Figura 3.- Estructura de la mitocondria. | 8 |
| Figura 4.- Transformación del piruvato a acetil-CoA. | 9 |
| Figura 5.- Ciclo de Krebs. | 10 |
| Figura 6.- Estructura interna mitocondrial. | 11 |
| Figura 7.- Diferencias entre el metabolismo celular normal y el tumoral. | 14 |
| Figura 8.- Representación del efecto Warburg y la Fermentación láctica. | 15 |
| Figura 9.- Representación del microambiente tumoral. | 18 |
| Figura 10.- Factor de transcripción inducible por hipoxia: HIF-1. | 21 |
| Figura 11.- Representación de la simbiosis metabólica. | 26 |
| Figura 12.- Esquema de análisis de la masa mitocondrial empleando Mitotracker Green por citometría de flujo. | 37 |
| Figura 13.- Par oxido-reducción de Alamar blue. | 38 |
| Figura 14.- Evaluación del potencial de membrana mitocondrial. | 39 |
| Figura 15.- Esquema de análisis del potencial de membrana mitocondrial empleando JC-1/ Anexina V/ 7-AAD por citometría de flujo | 41 |
| Figura 16.- Representación de Zombie NIR. | 42 |
| Figura 17.- Esquema de análisis de las moléculas de respuesta a hipoxia: HIF-1 α y PDK por citometría de flujo. | 44 |
| Figura 18.- Esquema de análisis de los marcadores de metabolismo CD98/CD73/CD71 por citometría de flujo. | 46 |
| Figura 19.- Cinéticas de proliferación celular de MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 49 |

| | |
|---|----|
| Figura 20.- Consumos de glucosa de MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 51 |
| Figura 21.- Producción de lactato de MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 53 |
| Figura 22.- Consumo de glutamina de MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 54 |
| Figura 23.- Producción de glutamato de MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 56 |
| Figura 24.- Análisis de viabilidad por tinción con yoduro de propidio de MRC-5 y SKMES-1. | 57 |
| Figura 25.- Análisis de la masa mitocondrial en las células MRC-5 y SKMES-1 bajo diferentes condiciones de cultivo. | 58 |
| Figura 26.- Capacidad reductora celular bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 59 |
| Figura 27.- Efecto del CCCP en el $\Delta\Psi_m$ de las células SKMES-1. | 60 |
| Figura 28.- Porcentaje de células viables, necróticas, apoptóticas tardías y tempranas para cada condición de cultivo de MRC-5 y SKMES-1. | 61 |
| Figura 29.- Potencial de membrana mitocondrial bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 62 |
| Figura 30.- Tinción intracelular de HIF-1 y PDK-1. | 63 |
| Figura 31.- Expresión de HIF-1 α y PDK-1 en las líneas MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 64 |
| Figura 32.- Expresión de CD98, CD73 y CD71 en SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. | 65 |
| Figura 33.- Fenotipo metabólico propuesto para los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 cultivadas en medio con glucosa y normoxia. | 73 |
| Figura 34.- Fenotipo metabólico propuesto para los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 cultivadas en medio con glucosa e hipoxia. | 74 |
| Figura 35.- Fenotipo metabólico propuesto para los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 cultivados bajo acidosis láctica y normoxia. | 75 |

Figura 36.- Fenotipo metabólico propuesto para los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 cultivados bajo acidosis láctica e hipoxia. 76

RESUMEN

El cáncer de pulmón es uno de los principales cánceres en México, ocupando el tercer lugar en mortalidad. Por ello es necesario elucidar los mecanismos intrínsecos asociados a la elevada tasa de proliferación celular del cáncer. Diferentes estudios han sugerido que el microambiente tumoral juega un papel decisivo durante el crecimiento y la diferenciación clonal del cáncer, provocando fenotipos más resistentes a los tratamientos. El papel que juega el microambiente tumoral sobre la funcionalidad mitocondrial cobra importancia ya que actualmente se debate si existe una participación activa de la mitocondria en el metabolismo y la proliferación tumoral. Todos los estudios disponibles sobre la funcionalidad mitocondrial en las células tumorales sólo evalúan algunas de las condiciones presentes dentro del microambiente tumoral, debido a esto en este trabajo se recrearon todas las condiciones presentes dentro del microambiente tumoral con la finalidad de evaluar de manera integral la funcionalidad mitocondrial y la relación que está tiene sobre el crecimiento celular tumoral. Comparamos las diferencias metabólicas entre las células tumorales SKMES-1 y los fibroblastos MRC-5 con la finalidad de elucidar los cambios específicos que permiten a las células tumorales proliferar bajo condiciones adversas. Los resultados de nuestros estudios muestran que las células tumorales SKMES-1 se adaptan con mayor eficiencia a los cambios en el medio de cultivo, a diferencia de los fibroblastos MRC-5 que favorecen la autoreparación sobre la proliferación desmedida. La capacidad de las células tumorales SKMES-1 para proliferar aun en las condiciones más adversas de cultivo se relacionó con una restructuración del ciclo de Krebs a través del incremento en la glutaminólisis, mostrando una participación no sólo activa sino funcional por parte de la mitocondria. Aunado a esto encontramos que la condición de cultivo de acidosis láctica parece activar vías alternas del metabolismo tumoral que permiten la sobrevivencia de las células tumorales SKMES-1. El estudio de la compleja red metabólica de las células tumorales, así como la influencia del microambiente tumoral sobre la funcionalidad mitocondrial permitirá adaptar y mejorar las terapias en contra del cáncer de pulmón.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de tipo multifactorial caracterizada por la presencia de células que han perdido el control sobre los procesos de proliferación y muerte celular. Dicha pérdida ocasiona que las células se dividan rápida y continuamente provocando un crecimiento anormal y desorganizado (Pierce, 2011).

Para que una célula normal se convierta en una célula tumoral es necesario que existan mutaciones sobre protooncogenes y genes supresores de tumor (Herráez, 2012). Estas mutaciones pueden ser debidas a la exposición con agentes químicos alquilantes o intercalantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes o por la inserción de material genético proveniente de agentes biológicos como los virus (Law, 1990), (Matakodou, 2005), (Pierce, 2011).

1.2 Epidemiología del cáncer

En la actualidad, el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo de acuerdo a estimaciones realizadas en el año 2012 por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En dicho año se reportaron 14.1 millones de nuevos casos y 8.2 millones de defunciones. La mayoría de los cánceres se encontraron localizados en pulmón, estómago, hígado, colón y mama, siendo el cáncer de pulmón el tipo más frecuente de cáncer (OMS, 2012). El cáncer de pulmón presentó una incidencia del 12.9%, mientras que su mortalidad fue del 19.4% (Globocan, 2012).

1.2.1 Epidemiología del cáncer de pulmón

De acuerdo a reportes del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) sobre el cáncer en México del año 2012, se encontró que la tercera causa de mortalidad por tumores malignos corresponde al cáncer en órganos respiratorios e intratorácicos. La mortalidad de acuerdo al sexo fue de 12.8 y 6.4 por ciento en varones y mujeres, respectivamente (INEGI, 2011).

El tabaquismo es uno de los factores más importantes asociados con el cáncer pulmonar. La población mexicana en estado de marginación puede encontrarse en contacto con otro importante factor de riesgo asociado al cáncer de pulmón, el humo de la leña (García-Sancho, 2012) (Law, 1990), (McHugh, 2014).

1.3 Clasificación del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se clasifica de acuerdo a características histológicas y patrones moleculares asociados en dos tipos: carcinoma de células pequeñas (**Small Cell Lung Cancer** o **SCLC**) y carcinoma de células no pequeñas (**Non Small Cell Lung Cancer** o **NSCLC**) (Stewart, 2010). Se ha encontrado una incidencia del 15% y 85% para SCLC y NSCLC, respectivamente (Pikor, 2013).

El carcinoma de células pequeñas se caracteriza por presentar mayor desarrollo y metástasis que el NSCLC. El desarrollo de tumores comienza en los bronquios y causa posteriores paraneoplasias (Stewart, 2010), (ACS, 2015), (Chan, 2013).

El carcinoma de células no pequeñas presenta una frecuencia del 30%. Se origina en las células basales de las vías aéreas centrales, sitio en donde se presentan la mayoría de los tumores. Es el subtipo histológico que más se asocia al hábito de fumar (Pikor, 2013), (Stewart, 2010).

El carcinoma de células no pequeñas puede subdividirse en tres tipos histológicos principales: adenocarcinoma (AD), carcinoma de células escamosas (SqCC) y carcinoma de células grandes (Pikor, 2013).

El adenocarcinoma es el subtipo histológico más común al tener una frecuencia del 40%. Se origina en el epitelio glandular del parénquima pulmonar (Pikor, 2013), (Stewart, 2010).

El carcinoma de células grandes tiene una frecuencia del 9%. Es un subtipo que presenta una morfología variada, incluye a la variante de carcinomas de células grandes neuroendocrinas (Pikor, 2013), (Stewart, 2010).

“A pesar de los diferentes métodos de diagnóstico y las diferentes modalidades de tratamiento la sobrevivencia de los pacientes con cáncer de pulmón no se ha incrementado significativamente durante los últimos 30 años”, es por ello que la importancia de estudiar los mecanismos intrínsecos, que ocasionan la aparición y desarrollo, de esta enfermedad cobran importancia (Yan, 2011).

1.4 Marcas de clase del cáncer

En los diferentes tipos de cáncer se han encontrado algunas características compartidas que permiten a las células tumorales sobrevivir, proliferar y diseminarse a través del cuerpo, dichas características son conocidas como “marcas de clase”. Las cuales son: producción de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, producción de factores angiogénicos, evasión a la apoptosis, potencial ilimitado de replicación, invasión a tejidos sanos y metástasis. Recientemente se reconoció a la evasión a la respuesta inmune y a la reprogramación metabólica como dos “marcas de clase” adicionales (Hanahan, 2000) (Hanahan, 2011).

Nuestro estudio se enfoca en la reprogramación metabólica, sobre las otras marcas de clase, debido a que consideramos que el metabolismo celular tumoral es una pieza fundamental para el desarrollo y progresión del cáncer.

1.5 Metabolismo de células no tumorales

La producción de ATP en células no transformadas está dada por una vía catabólica conocida como “respiración celular”. La respiración celular tiene la función de generar de 36 a 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa a través de tres etapas metabólicas diferentes: la glicólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa en presencia de oxígeno (Figura 1) (Campbell, 2007).

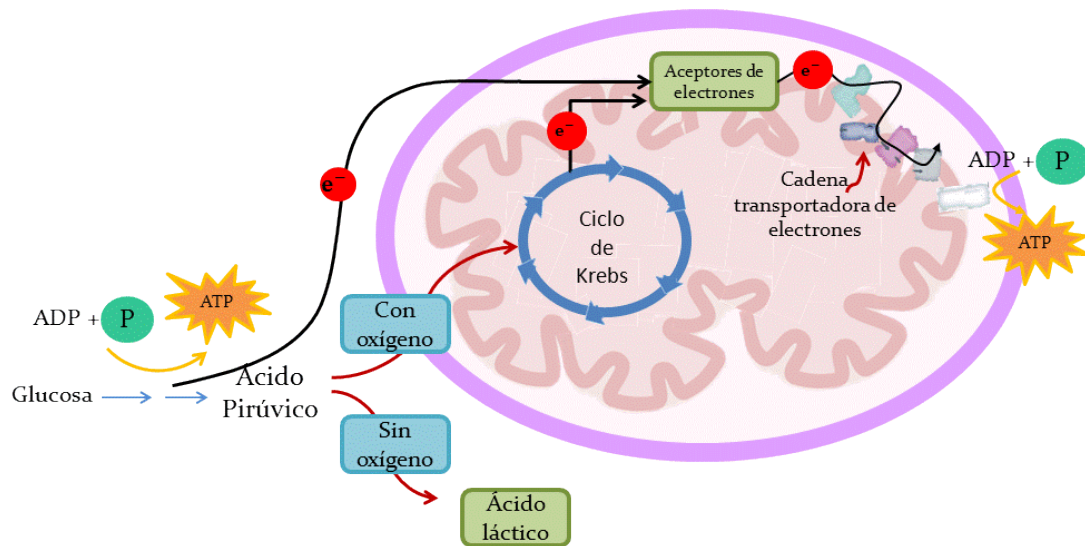


Figura 1. Metabolismo de la glucosa en células no transformadas. Imagen de autoría propia.

1.5.1 Glicólisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas

La glicólisis es una vía catabólica que se lleva a cabo en el citoplasma de la célula (Finley, 2013). La vía se encuentra estructurada en diez reacciones enzimáticas que permiten la degradación parcial de la glucosa hasta dos moléculas de piruvato. En dicho proceso se acopla la energía liberada de la degradación de la glucosa a la síntesis de dos moléculas de ATP (adenosina trifosfato) y dos moléculas de NADH₂ (nicotina adenina dinucleótido reducido) (Campbell 2007, Garrido 2006, Voet 2006).

La glicólisis se presenta en dos fases principales: la fase de inversión de energía y la fase de rendimiento energético. La fase de inversión de energía se caracteriza por emplear dos moléculas de ATP para la fosforilación de una molécula de glucosa y la posterior ruptura en dos triosas fosfato (gliceraldehído-3-fosfato y

dihidroxiacetona fosfato) (Figura 2A). En la fase de rendimiento energético, las triosas fosfato generadas son oxidadas hasta piruvato y se obtienen cuatro moléculas de ATP y dos de NADH_2 por molécula de glucosa (Figura 2B).

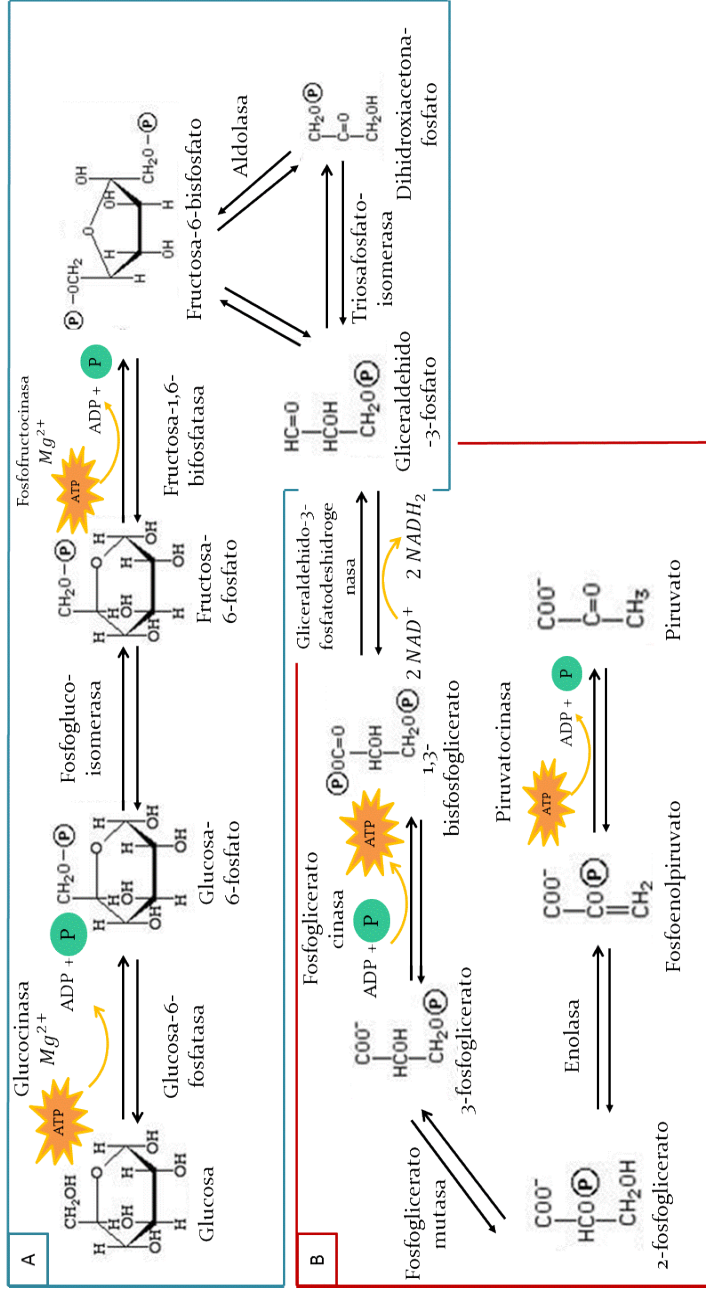


Figura 2.- Representación de la glicólisis: A.-Fase de inversión de energía: La glucosa entra a la célula y es fosforilada por la glucocinasa a glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es isomerizada en fructosa-6-fosfato. Posteriormente, la fosofruccinasa transfiere un grupo fosfato del ATP a la fructosa-6-fosfato para generar fructosa-1-6- bisfosfato. La fructosa-1-6 bisfosfato es escindida por la aldolasa en dos triosas fosfato, gliceralehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. La isomerasa cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato a gliceralehido-3-fosfato.

B.-Fase de rendimiento energético: Las dos moléculas de gliceralehido-3-fosfato generadas son transformadas a 1,3-bisfosfoglicerato por la triosafosfato deshidrogenasa. Además, se producen dos moléculas de NADH₂. La siguiente reacción está dada por la fosfogliceratocinasa que cataliza la transformación de 1,3-bisfosfoglicerato a 3-fosfoglicerato con la producción de dos moléculas de ATP. Las siguientes reacciones se encargan de reubicar al grupo fosfato de tal manera que pueda ser acoplado a la síntesis de ATP a nivel sustrato y formar piruvato. Imagen de autoría propia.

1.5.2 Mitocondria

La mitocondria es el organelo encargado principalmente de la bioenergética celular. También participa en la regulación de la apoptosis, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y homeostasis del calcio (Cámara, 2005), (Sánchez, 2008).

La mitocondria posee un diámetro de 0.1 μm a 0.5 μm y una longitud de 7 μm . Tiene su propio genoma (constituido por 16,569 bp); el cual es circular (mtDNA) y codifica para distintos componentes de la cadena transportadora de electrones (Sánchez 2008), (Lodish 2006).

La mitocondria se caracteriza por poseer tres espacios definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Estos espacios están delimitados por la presencia de una doble membrana (Figura 3), compuesta por una membrana externa y una membrana interna.

- Membrana externa: Es una bicapa lipídica caracterizada por poseer 40% de lípidos y 60% de proteínas. Las proteínas que posee son porinas o canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC). Se caracteriza por ser permeable a moléculas menores de 10KDa (Cámara, 2005), (Koopman, 2013).
- Membrana interna: Es una bicapa lipídica caracterizada por poseer 20% de lípidos y 80% de proteínas. Las proteínas que contiene son aquellas involucradas en la cadena transportadora de electrones, ATPasa y transportadoras de metabolitos como la ANT (adenina nucleótido translocasa). Se caracteriza por formar pliegues conocidos como “crestas” que tienen la finalidad de incrementar el área total de la superficie interna. Tanto la síntesis de proteínas de la cadena transportadora de electrones, así como el número de crestas, se ha visto que se modulan de acuerdo al requerimiento energético (Cámara, 2005), (Koopman, 2013).

La mitocondria se localiza en el citoplasma en posición perinuclear, al ser una estructura dinámica tiene la capacidad de localizarse en sitios donde el ATP es requerido. En células del músculo cardiaco se localiza en las proximidades de las miofibrillas (Adhihetty, 2014), (Epstein, 2014), (Pocok, 2005), (Stetler, 2013).

El número de mitocondrias está regulado por las necesidades metabólicas de las células siendo el corazón, cerebro, hígado y músculo en donde se encuentran en

mayor número. El número promedio de mitocondrias por célula mamífera es de 1,000 a 2,000, en el caso de hepatocitos se ha reportado que poseen alrededor de 2,200 mitocondrias. Se ha reportado que el ejercicio aumenta el contenido mitocondrial (Koolman, 2004), (Karp, 2009), (Jornayvaz, 2010).

La masa mitocondrial puede encontrarse disminuida en personas que padecen diabetes. En células con un mayor metabolismo oxidativo como las neuronas, las mitocondrias pueden poseer un mayor número de crestas (Jornayvaz, 2010), (Koolman 2004).

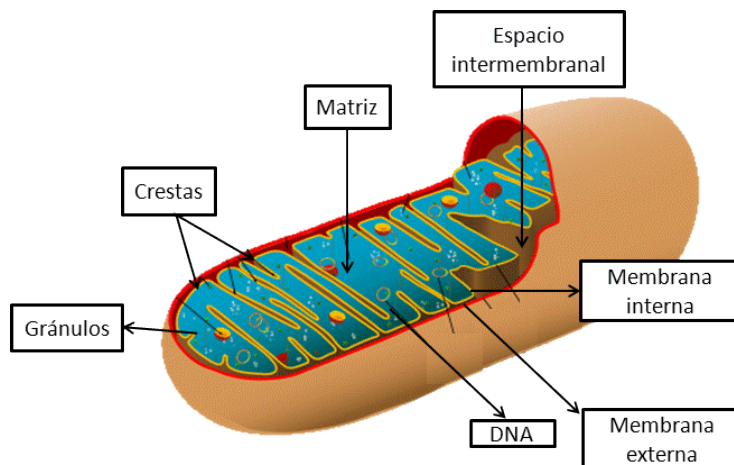


Figura 3.- Estructura de la mitocondria. Imagen modificada de Campbell.

1.5.3 Ciclo de Krebs

Es una vía metabólica que se localiza en la matriz mitocondrial. Tiene como función oxidar completamente el grupo acetilo de la acetil-CoA hasta CO_2 en ocho pasos (Devlin, 2004). La acetil-CoA es una molécula intermediaria producida en la β -oxidación de ácidos grasos, degradación de aminoácidos y descarboxilación oxidativa del piruvato (Peréto, 2007). Por otro lado, el piruvato generado en la glicólisis, es convertido a acetil-CoA por el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (Figura 4) (Campbell, 2007).

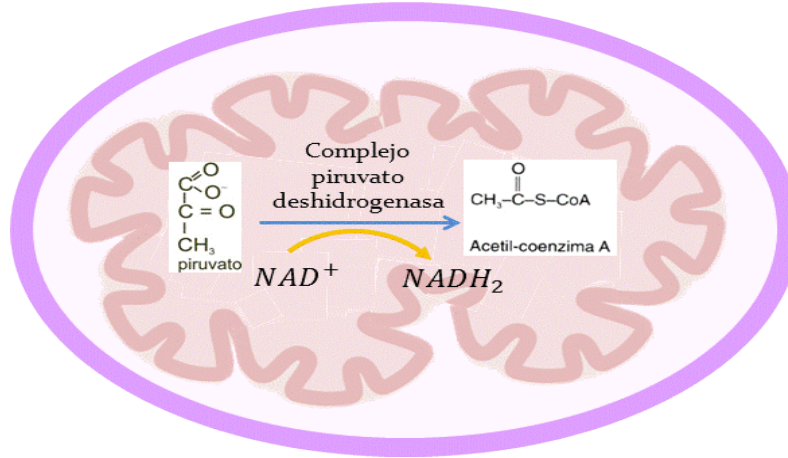


Figura 4.- Transformación del piruvato a acetil-CoA. Imagen de autoría propia.

En el ciclo de Krebs, durante la oxidación de la acetil-CoA se reducen tres moléculas de NAD^+ y una de FAD^+ produciendo tres NADH_2 y un FADH_2 (flavina adenina dinucleótido reducido) (Figura 5), estos últimos son empleados en la fosforilación oxidativa (Figura 6). A su vez se genera una molécula de GTP (guanosina-5'-trifosfato) (Campbell, 2007).

El ciclo de Krebs se encuentra regulado por las concentraciones intramitocondriales de ATP y NADH_2 que actúan como moduladores negativos de la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato (Garrido, 2006).

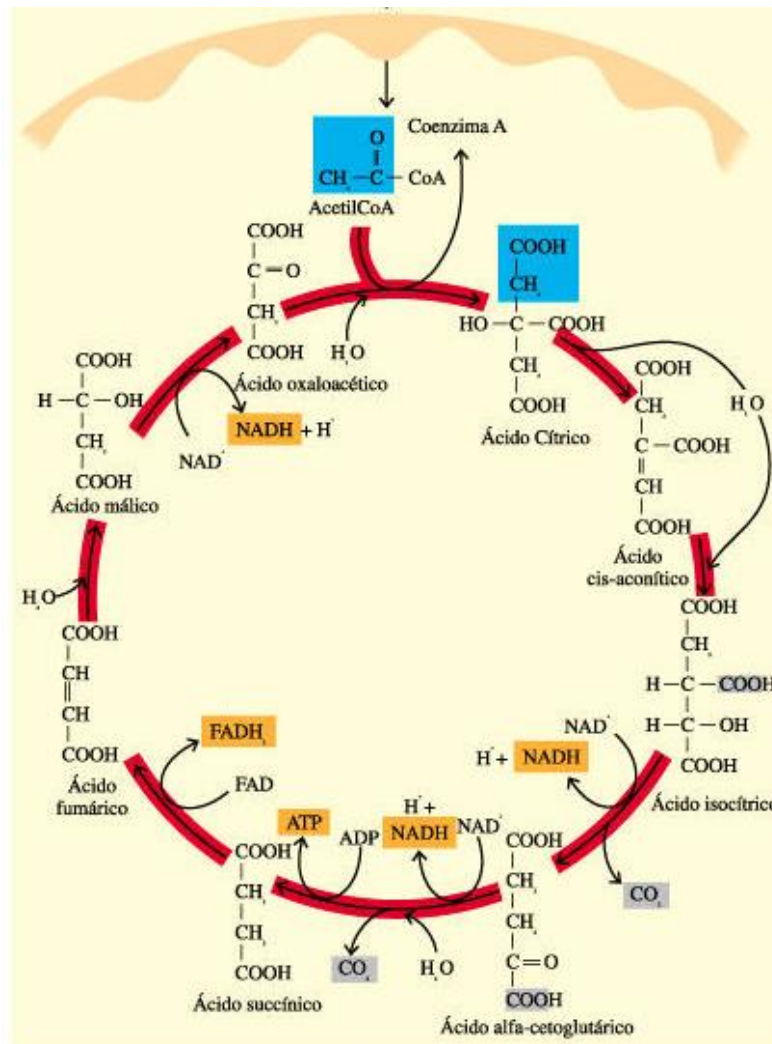


Figura 5.- Ciclo de Krebs. La vía comienza cuando la acetil-CoA se condensa con el oxalacetato produciendo citrato, el citrato se isomeriza a isocitrato, el isocitrato se oxida a α -cetoglutarato con la producción de NADH₂, el α -cetoglutarato se oxida a succinil CoA generando a su vez NADH₂, succinil-CoA se convierte a succinato y tiene lugar una fosforilación a nivel sustrato la cual produce un GTP. El succinato se convierte en fumarato produciendo FADH₂, el fumarato se condensa con una molécula de agua produciendo malato, por último, el malato se oxida a oxalacetato, generando a su vez una molécula de NADH₂ (Curtis, 2008).

1.5.4 Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial (Figura 6). Donde se encuentran una serie de complejos proteicos que se encargan de captar y transportar electrones que provienen de los cofactores NADH_2 y FADH_2 generados en la glicólisis, el ciclo de Krebs o en la β -oxidación. El transporte de electrones permite que los complejos I, III y IV bombeen protones de la matriz hacia el espacio intermembranal, generándose un gradiente de pH (iones hidrógeno) y una diferencia de potencial a lo largo de la membrana interna. En el complejo IV, los electrones son donados al oxígeno, cada átomo de oxígeno capta un par de iones hidrógeno de la matriz mitocondrial y forma agua (Campbell 2007, Koopman 2013).

El último complejo proteico dentro de la matriz mitocondrial es el complejo V, también conocido como ATP sintasa. La ATP sintasa es una bomba iónica que transporta iones en contra de su gradiente. La ATP sintasa aprovecha este gradiente y produce un flujo de iones hidrógeno hacia la matriz mitocondrial. El flujo de los iones hidrógeno impulsa la fosforilación del ADP a ATP (Campbell, 2007), (Koopman, 2013).

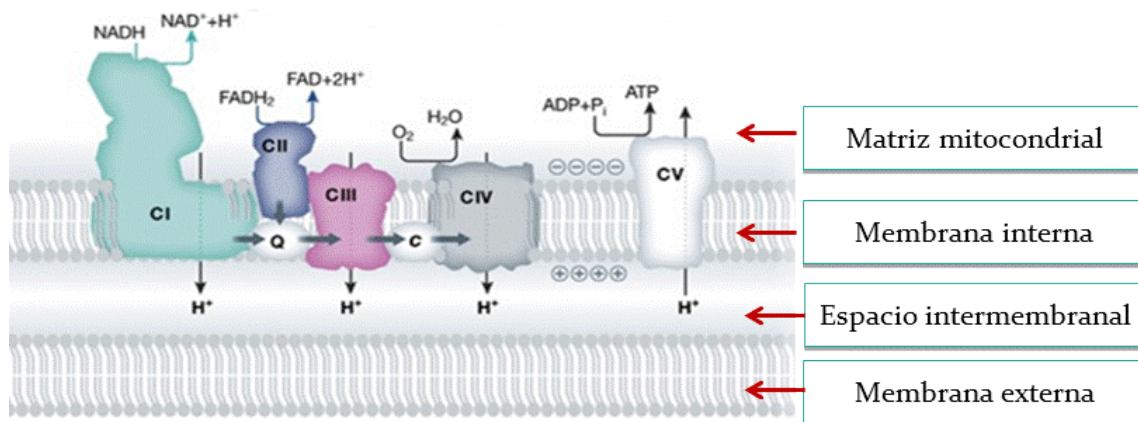


Figura 6.- Estructura interna mitocondrial. Imagen modificada (Koopman,2013)

Parte del potencial de membrana es empleado para la regulación térmica (Koopman, 2013). A su vez el potencial electroquímico regula a los mecanismos de

fusión y fisión mitocondrial, tales mecanismos son responsables de reparar el daño mitocondrial generado por las especies reactivas de oxígeno (Rafelski, 2013).

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) reportado es aproximadamente de 150-180mV (Kann, 2006). Se ha observado que cuando el potencial de membrana mitocondrial es elevado ocasiona que el flujo a través de la cadena transportadora de electrones sea lento favoreciendo reducciones incompletas del O_2 que producen ROS. También se ha observado que un elevado $\Delta\Psi_m$ genera un transporte reverso de electrones de la succinato al complejo I favoreciendo un microambiente tóxico (Cámara, 2005). Dentro de los tumores sólidos se han encontrado variaciones en el potencial de la membrana mitocondrial, las cuales se encuentran asociadas a fenotipos más tumorigénicos (Houston, 2011).

En un estudio con células de carcinoma de colón (SW620), se evaluó si las alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial producían cambios en los niveles de expresión de genes mitocondriales, y en el arresto celular en G0-G1 del ciclo celular. Para ello se generaron líneas lisogénicas (Rot, AntA, Az, OliB y Nig) de SW620. Al comparar el potencial de membrana con la línea parental se encontraron diferencias significativas, las líneas AntA y Nig presentaron potencial mitocondrial elevado mientras que para Az y OliB se encontró disminuido. Después, usando RT-PCR evaluaron la expresión de ND6, COI, COII (la primera y segunda subunidades del citocromo c oxidasa y el complejo IV), encontrando que la expresión de estas aumentaba significativamente en las líneas Az y OliB (con potencial disminuido) al compararlas con la expresión de la línea parental (Heerdt, 2003).

1.5 Capacidad reductora celular

La capacidad reductora celular hace referencia al sistema encargado del transporte de electrones provenientes de la oxidación de moléculas orgánicas que conducen la energía química. Tales transportadores son: la nicotina adenina dinucleótido reducido ($NADH_2$) y la nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Ambas moléculas son similares estructuralmente mas no son intercambiables desde el punto de vista metabólico (Voet, 2006).

El NADH₂, se genera a través del ciclo de Krebs, la glicólisis y la β-oxidación, en los cuales se reduce de NAD⁺ a NADH₂. Una de sus funciones es la síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa (Voet, 2006). Las concentraciones citosólicas de NAD⁺/NADH₂ son empleadas en mantener la homeostasis redox, así como en los procesos bioquímicos ya que aproximadamente 700 enzimas oxidoreductasas emplean al NAD⁺ o al NADH₂ como cofactores (Sun, 2012).

El NADPH se genera mediante la oxidación de la glucosa-6-fosfato por la vía de las pentosas fosfato y la vía del gluconato, en las cuales se reducen dos moléculas de NADP⁺ a dos moléculas de NADPH. El NADPH participa principalmente en procesos anabólicos, los electrones de alta energía se transfieren a enzimas que catalizan reacciones anabólicas (Bray, 2006). El NADPH es el principal agente reductor empleado para la síntesis de lípidos y esteroides (Melo, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 Reprogramación metabólica

La reprogramación metabólica es la redistribución de las vías metabólicas a causa de la transformación maligna. Para darse una elevada proliferación celular es necesario que las células tumorales posean el flujo necesario de moléculas para obtener energía y para la construcción de nuevas células. Las principales vías metabólicas modificadas son la glicólisis, que se encuentra elevada, y el ciclo de Krebs, que se reestructura con la glutaminólisis aumentada (Curry, 2013), (Steward, 2012), (Schavani, 2010).

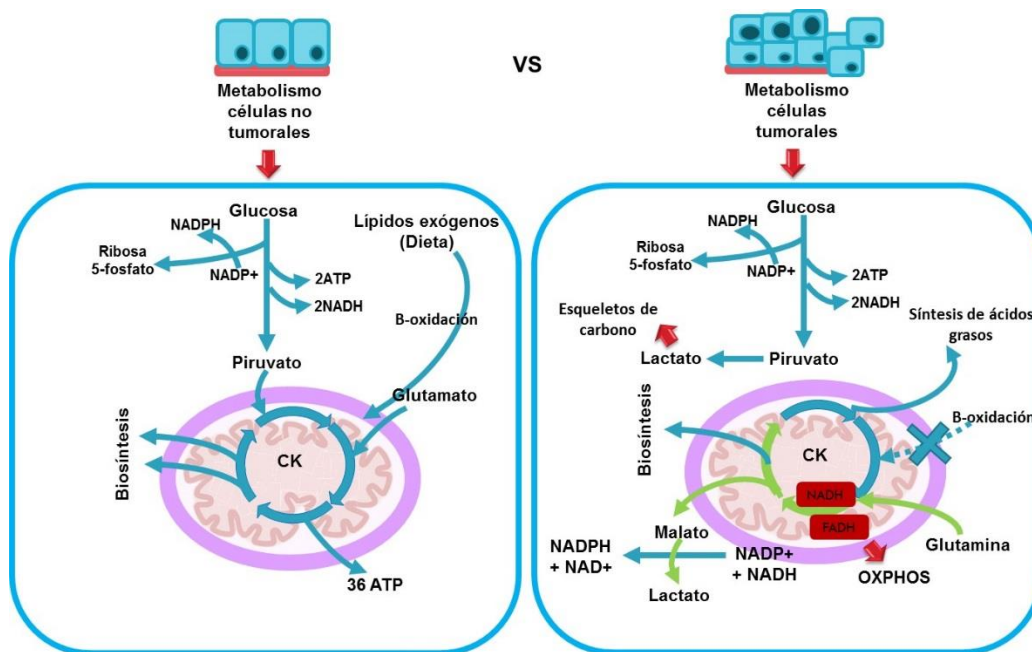


Figura 7.- Diferencias entre el metabolismo celular normal y el tumoral. Las células tumorales reprograman su metabolismo para poder satisfacer sus necesidades de ATP, NADPH, NADH y esqueletos de carbono, moléculas necesarias para el crecimiento y la proliferación celular. Imagen adaptada (Romero-García, 2011)

2.1.1 Efecto Warburg

En células normales y en presencia de oxígeno, la producción principal de ATP es a través de la fosforilación oxidativa, pero si la célula no tiene disponibilidad de oxígeno la forma para generar ATP es llevando a cabo una glicólisis aumentada y después hacer una fermentación ácido láctica (Figura 8). En ésta, el piruvato se reduce directamente por acción de la lactato deshidrogenasa en presencia de $NADH_2$ para formar lactato y NAD^+ (Figura 8) (Campbell, 2007), (Faduchi, 2010).

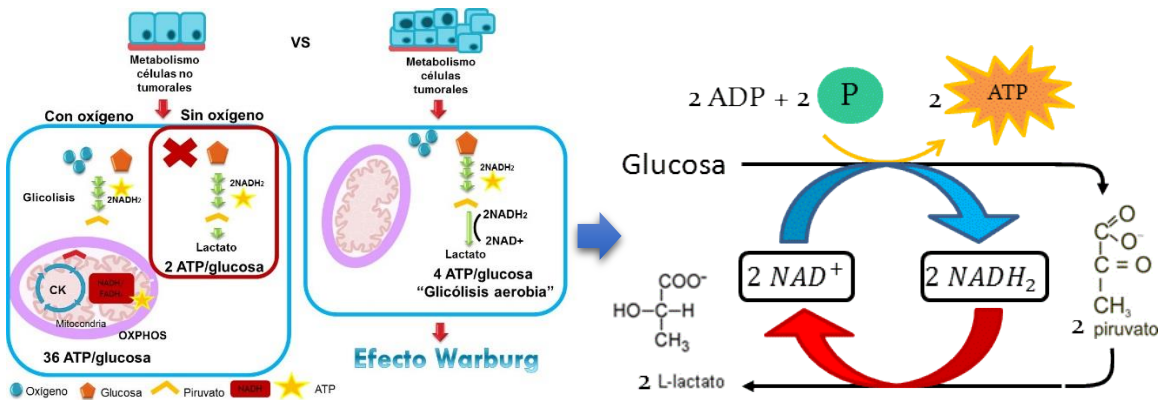


Figura 8.- Representación del efecto Warburg y la fermentación láctica de las células tumorales. Imagen de autoría propia.

En 1924 Otto Heinrich Warburg postuló que, en las células tumorales, la principal forma de producción de ATP es a través de una glicólisis incrementada con producción de ácido láctico, aún en presencia de oxígeno. Este fenómeno es conocido como “efecto Warburg” (Vázquez, 2010), (Menéndez, 2013).

Warburg propuso que las células tumorales producen ATP a través de una glicólisis aumentada debido a un daño en la fosforilación oxidativa, posiblemente debido a defectos de las proteínas de la cadena transportadora de electrones (Bellance, 2009) (Koopman, 2013).

Estudios en líneas celulares de glioma, hepatoma y cáncer de mama muestran poseer una mitocondria funcional; además, dichas líneas celulares obtienen su ATP principalmente por la fosforilación oxidativa (Díaz, 2010). En un estudio con

fibroblastos de pulmón (MRC-5) y la línea celular de carcinoma de pulmón tipo epidermoide (HLF-a) se evaluaron los niveles de ATP intracelulares, la actividad del citocromo c oxidasa y la tasa de respiración mitocondrial. Se encontró que la producción de ATP fue mayor en la línea HLF-a que en MRC-5. Al emplear un inhibidor de la glicólisis, ácido yodoacético, en medios con piruvato/malato/ADP se encontró que existía una mayor producción de ATP en MRC-5 que en HLF-a. La evaluación del citocromo c oxidasa se realizó por polarografía al emplear ascorbato-TMPD, no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos celulares. Por otro lado, la tasa de respiración mitocondrial fue mayor en HLF-a que en MRC-5. Estos resultados indican que las mitocondrias de la línea HLF-a son funcionales ya que mostraron actividad y producción de ATP (Bellance, 2009).

2.1.2 Glutaminolisis

En células no tumorales (normales) la glutamina es un aminoácido no esencial, participa en la síntesis de DNA, neurotransmisores, RNA y ayuda a regular el equilibrio ácido-base (Devlin, 2004).

Las células tumorales emplean a la glutamina como aminoácido esencial ya que participa en el ciclo de Krebs, sirve como generadora de glutatión y puede ser convertida en aminoácidos no esenciales, purinas, pirimidinas y ácidos grasos empleados en el crecimiento y duplicación celular. Se ha observado que las células tumorales exhiben un elevado consumo de glutamina exógena y cuando ésta disminuye las células tumorales mueren (Lifeng, 2014).

La glutaminolisis está dada por dos reacciones enzimáticas diferentes: la primera está catalizada por la glutaminasa (GLS) que convierte a la glutamina en glutamato, mientras que la segunda reacción está dada por la glutamato deshidrogenasa (GDH1) que convierte al glutamato en α -cetoglutarato. Éste último puede entrar al ciclo de Krebs y mantener un flujo constante de intermediarios en el ciclo (Lifeng, 2014).

En la línea celular de hepatoblastoma (HepG2), se encontró que el metabolismo del glutamato está relacionado con NADPH oxidasa 1 (NOX1). Los niveles de NOX1 se correlacionaron inversamente con los niveles de glutamato deshidrogenasa (GDH1) mitocondriales (Bertram, 2015).

En las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR3, OVCAR8, OVCA429, OVCA420, SKOV3 y SKOV3ip se evaluó la proliferación celular en medio completo, medio sin glucosa y medio sin glutamina bajo condiciones de normoxia e hipoxia por 72h. Se encontró que las líneas OVCAR3, IGROV1 y OVCA429 eran glutamina independientes; que las líneas OVCAR8 y OVCA420 eran moderadamente dependientes mientras que las líneas SKOV3, SKOV3ip y Hey8 eran altamente dependientes de glutamina bajo condiciones de normoxia. Mientras que en hipoxia se encontró que OVCAR3 fue glutamina independiente y SKOV3 fue glutamina dependiente. Sin embargo, el crecimiento celular en todas las líneas fue glucosa dependiente. Esto indica que las células tumorales pueden emplear o no a la glutaminólisis como vía suplementaria para su crecimiento y que su metabolismo depende en su mayoría del consumo de glucosa. Además, se encontró que las líneas celulares glutamina independientes OVCAR3, IGROVI y OVCA428 poseían una capacidad de invasividad baja, mientras que las líneas celulares glutamina dependientes SKOV3, SKOV3ip y Hey8 poseían una capacidad de invasiva alta mientras que OVCAR8 y OVCA420 poseen una capacidad moderada (Lifeng, 2014).

En un panel de 39 líneas celulares, en donde 38 corresponden a NSCLC y una a una línea no tumoral (NHLF), se evaluó el crecimiento celular en presencia o ausencia de glucosa o glutamina por 72h. Se encontró que quince de las líneas celulares (NCI-H358, A-427, A-549, NCI-H647 entre otras) disminuyó la proliferación en un 70% o más en los medios sin glutamina con respecto al control, por lo que fueron consideradas glutamina dependiente. Quince líneas celulares (SW1573, HOP62, SKMES-1, NCI-H441 entre otras) mostraron una disminución del 30 al 70% en su proliferación (glutaminas medianamente independientes) mientras que solo nueve de las líneas celulares (NHLF, CI-H727 y SW900 entre otras) mostraron insensibilidad al presentar una disminución del 30% en el crecimiento (Pieter, 2012).

2.2 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es dinámico, interactivo y en constante cambio; en el cual existe una pérdida de las funciones especializadas de las células y la generación de una microestructura desorganizada. El microambiente tumoral dirige el comportamiento de las células tumorales y puede presentar zonas con bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia), altas concentraciones de lactato (lactosis) y acidosis extracelular (Figura 8); también podría presentar bajas concentraciones de glucosa.

Estos cambios están asociados con una combinación de perfusión pobre, vasculatura anormal, proliferación descontrolada y un metabolismo desregulado (Ling-Yu Chen, 2008), (Masson, 2010), (Tarin, 2012).

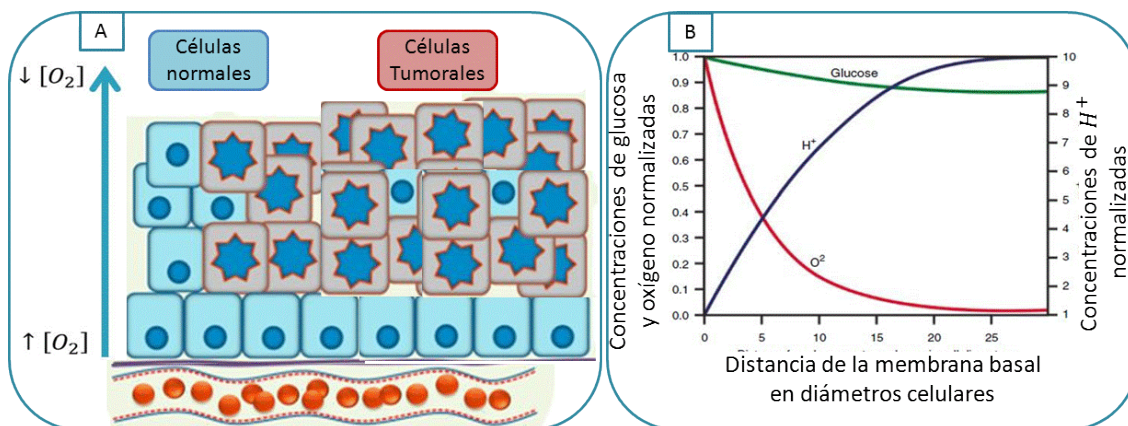


Figura 9.- Representación del microambiente tumoral. **A.-** En los tumores sólidos existen zonas alejadas de los vasos sanguíneos. **B.-** A medida que las células tumorales se van alejando de los vasos sanguíneos, las concentraciones de glucosa (línea verde) y oxígeno (línea roja) disminuyen mientras que la concentración de $[H^+]$ (línea azul) extracelular se incrementa. Imagen modificada de Ortmann.

2.1.1 Hipoxia

La hipoxia tumoral es una consecuencia fisiopatológica de una microcirculación perturbada tanto estructural como funcional (Höckel, 2001).

Las células normales tienen un flujo de oxígeno aproximado de 40mmHg, cuando este flujo se reduce a menos del 2% de oxígeno se considera un estado de hipoxia. La hipoxia aguda ocasiona una insuficiencia energética, es responsable del

aumento de la permeabilidad de la membrana celular (con pérdida del potencial electroquímico). La hipoxia produce un desacoplamiento de las funciones metabólicas y de membrana, arresto celular, daño celular progresivo y por último muerte celular (Arias,1999), (Hochachka,1997). Las células normales en hipoxia reducen el consumo de oxígeno e incrementan el consumo de glucosa (Krivoruchko, 2010).

En tumores sólidos se pueden encontrar zonas de hipoxia y anoxia (pO_2 de 23 a 0 mmHg o 3 a 0% O_2). Siendo las zonas de hipoxia asociadas a fenotipos más resistentes al tratamiento (Ameri, 2002), (Nakajima, 2014).

En condiciones de hipoxia tanto las células normales como las tumorales promueven la adaptación celular a través de la expresión del factor de transcripción HIF-1 (Krivoruchko, 2010).

En un estudio con la línea celular de carcinoma de cabeza y cuello (Ca133) se evaluó la OXPHOS a través de la de tasa de consumo de oxígeno (OCR). Ca133 se incubó bajo condiciones de normoxia (21% O_2) e hipoxia (2% O_2) por 16h. Se encontró que en hipoxia existía una disminución del 41% del OCR en comparación con la condición de normoxia (Nakajima, 2014).

Por otro lado, en un estudio *in vitro* en líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello (Ca133) y carcinoma escamoso oral (OSC19) bajo condiciones de hipoxia (2% O_2 por 48h), se encontró que el consumo de glucosa se incrementó un 38% y 26%, respectivamente. Ambas líneas incrementaron su producción de lactato bajo las condiciones de hipoxia en comparación con sus contrapartes normoxicas un 37 y 40%, respectivamente; mostrando que las células tumorales bajo condiciones de hipoxia aumentan el metabolismo glicolítico y la producción de lactato (Nakajima, 2014).

2.1.1.1 Moléculas de respuesta a la hipoxia: Factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α)

Las células normales y tumorales se adaptan a la hipoxia por medio de la expresión de HIF-1. Éste es un factor de transcripción heterodimérico constituido por dos

subunidades; la subunidad beta (HIF-1 β , se expresa constitutivamente en el núcleo) y la subunidad alfa (HIF-1 α , se localiza citoplasmáticamente) (Figura 10).

Las células expresan HIF-1 ya que éste se encarga de activar diferentes genes que ayudan a sobrevivir a la hipoxia. Los genes que activa aumentan la glicólisis como HK2, PFK-1 y los transportadores de glucosa como GLUT1 y GLUT4. También activa la expresión de transportadores de aminoácidos como CD98, de lactato como MCT4, entre otros (Prior, 2014), (Doherty, 2013), (Kapler, 2012).

HIF-1 α inhibe el metabolismo mitocondrial en parte al promover la expresión de la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK-1) que inhibe a la piruvato deshidrogenasa (PDH), produciendo un aumento de la producción de lactato (Ward, 2012).

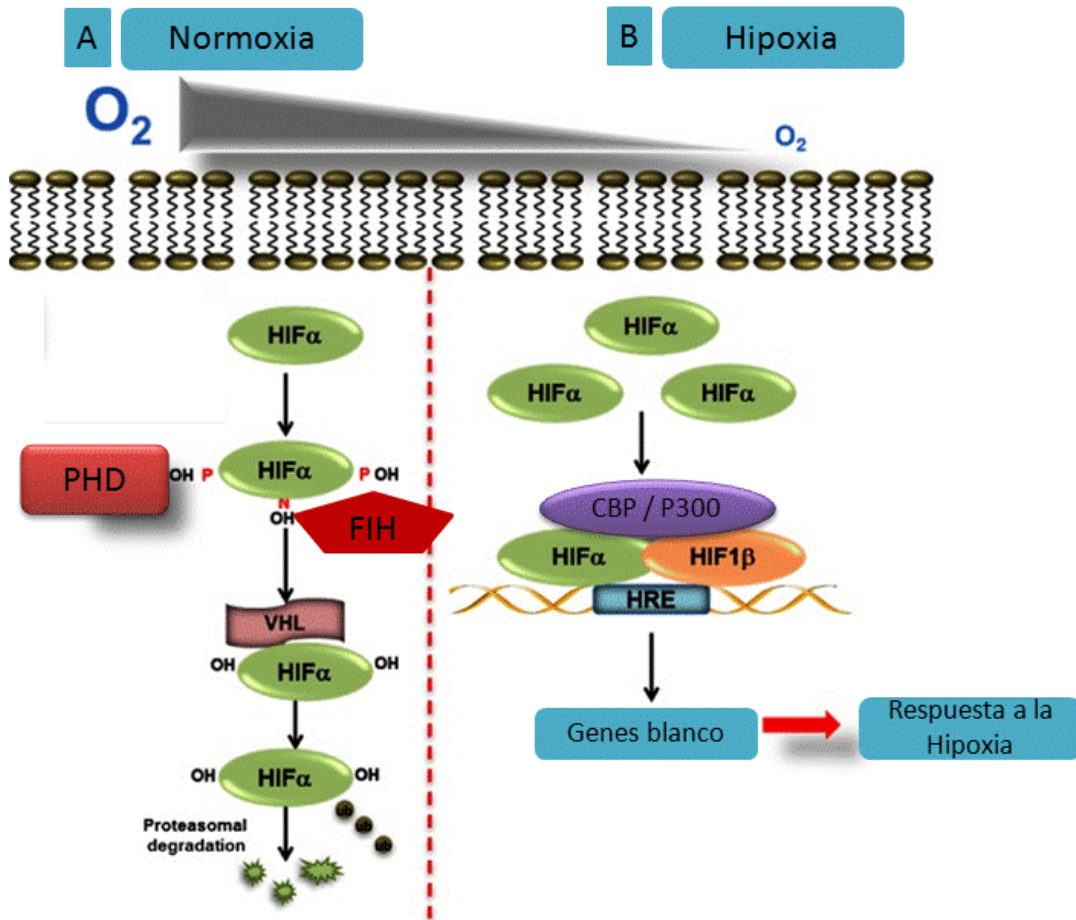


Figura 10.-Factor de transcripción inducible por hipoxia. HIF-1. A) En normoxia cuando las células están oxigenadas, HIF-1 α es hidroxilada por la prolil-hidroxilasa (PHD). Dicha hidroxilación produce un sitio de unión para el factor Von Hippel-Linau (VHL), lo cual causa una poliubiquitinación y degradación vía el proteosoma. B) En hipoxia, las células tienen bajos niveles de oxígeno por lo que la actividad de PHD se encuentra reducida y permite la estabilización de HIF-1 α . Cuando HIF-1 α se estabiliza migra al núcleo y se dimeriza con HIF-1 β . HIF-1 activa la expresión de genes en hipoxia al unirse al DNA en la secuencia 5'-RCGTG-3' de los elementos de respuesta a hipoxia (Ameri 2002), (Ortmann, 2014), (Stresse 2013).

En un estudio *In vivo* con ratones se ha observado que después de exponerlos a una atmosfera de 7% de O₂ por 30 minutos, los niveles de mRNA de HIF-1 α incrementaron (Shimoda 2011), (Wiener, 1996). Algo similar se encontró en un estudio con las líneas de cáncer de pulmón (H1339 y A-549) y de cabeza y cuello

(SAS y EPLC-272H), cuando éstas se cultivaron en condiciones de normoxia (21% de O₂ y 5% de CO₂) e hipoxia (1% de O₂ y 5% de CO₂, 95% de N₂) por 20 h. Bajo condiciones de normoxia, se encontraron diferencias significativas en los niveles basales de HIF-1 α , en H1339 fueron elevadas, en EPLC-272H fueron intermedias y en SAS fueron bajas. Mientras que, bajo condiciones de hipoxia, los niveles de HIF-1 α se incrementaron en las líneas EPLC-272H y SAS, pero en H1339 no se modificaron. Esto nos indica que la expresión de HIF-1 α es diferente para cada tipo de línea celular (Schiling, 2012), pero principalmente muestra que tanto en líneas celulares, así como en modelos *In vivo* la respuesta celular a la hipoxia se encuentra altamente regulada por la expresión de HIF-1 α .

2.1.1.1 Moléculas de respuesta a la hipoxia: Piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK)

La piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) es la enzima responsable de controlar la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) a través de la fosforilación de los residuos serina/treonina. La PDK, en condiciones fisiológicas, se activa cuando las relaciones de acetil-CoA/CoA, ATP/ADP y NADH₂/NAD⁺ se encuentran elevadas, pero se inhibe por el incremento de las concentraciones de calcio intramitocondrial (Gil, 2010).

La expresión de PDK-1 se ha asociado con la invasividad, la progresión del tumor y el pronóstico pobre en tumores primarios de cáncer de mama y de cáncer gástrico (Lin, 2005), (Hur, 2013).

En un estudio con líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello (UM-22A, UM-22B y JHY-O22) se encontró que al aumentar la expresión de PDK-1, por medio de transfección, este inhibía la actividad de la piruvato deshidrogenasa alfa (responsable de regular al complejo piruvato deshidrogenasa, PDH) causando un aumento en la tasa de glicólisis, producción de lactato y un fenotipo similar al efecto Warburg. Por otro lado, al inhibir la actividad de PDK-1, se restaura la actividad del complejo PDH, disminuyen las concentraciones de lactato, disminuye la expresión de HIF-1 α y la supervivencia celular en hipoxia (McFate, 2008).

2.2.2 Lactosis: Producción de lactato

La acumulación de lactato, a pesar de un adecuado suministro de oxígeno, es un patrón metabólico común en los tumores sólidos (McFate, 2008). Dicha acumulación está asociada a un elevado metabolismo glicolítico, una incompleta oxidación de la glucosa y la glutaminólisis.

En biopsias de cáncer de mama se evaluó la concentración de lactato por bioluminiscencia. Se encontró que la concentración media era de $4.4\mu\text{mol/g}$. De estas muestras se encontró que había dos poblaciones: una con elevadas y otra con bajas concentraciones de lactato. El rango de concentraciones de lactato fue de 0.6 a $8.0\mu\text{mol/g}$ en las muestras de pacientes mientras que en tejido benigno de mama se encontró una concentración de 0.8 – $1.9\mu\text{mol/g}$. Mientras que la media de producción de lactato es de 5 a 10mM en diferentes líneas celulares (Kennedy, 2013).

Sin embargo, en un estudio con células epiteliales mamarias humanas (HMEC) y líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y R3230A) se evaluó la respuesta celular a la exposición aguda con lactato. Para ello se emplearon los marcadores de apoptosis Anexina V y 7-AAD, bajo diferentes concentraciones de lactato (0 , 10 , 20 y 40mM) en presencia y ausencia de glucosa por 24h . Se encontró que los medios con lactato y glucosa no mostraron disminución en la viabilidad celular. Solo las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 en medio con lactato [40mM] (sin glucosa) aumentó la apoptosis tardía (Kennedy, 2013).

En líneas celulares de cáncer de mama (ACC-732, ACC-812, MDA-MB-231) se analizó el consumo de glucosa y producción de lactato. Se encontró que la tasa de consumo de glucosa media fue de $2.3\pm 0.4\text{ nmol/ min}$. Cuatro de las doce líneas celulares evaluadas (ACC-3199, ACC-893, ACC-2638 y ACC-2087) exhibieron elevados niveles de consumo comparables a la línea celular MDA-MB-231 mientras que otras cuatro líneas celulares poseían bajos niveles de consumo menores al de MDA-MB-231. Esto demuestra la heterogeneidad de la acumulación de lactato encontrado en los diferentes tipos de cánceres (Robey, 2008).

En líneas celulares de glioblastoma (HSR-GBM1, JHH-GBM10), carcinoma escamoso oral y líneas de cáncer de pulmón (NCI-H1048, NCI-H526, NCI-H524,

NCI-H146, NCI-H82), se ha observado que expulsan el lactato intracelular en simporte con protones utilizando el transportador Monocarboxilato tipo 4 (MCT4), produciendo acidificación del medio (Curry-Tuluc, 2013), (Zhu, 2014).

En tejido normal, los hepatocitos emplean el lactato para la gluconeogénesis a través del ciclo de Cori. Algunas otras células capaces de emplear al lactato como sustrato para la producción de ATP son: astrocitos y miocitos. En dichas células, el lactato es transportado al interior por medio del transportador de monocarboxilato tipo 1 (MCT1). Después es convertido por la lactato deshidrogenasa (LDH) a piruvato, de tal manera que pueda entrar al ciclo de Krebs o llevar a cabo la gluconeogénesis (Kennedy, 2010).

En diversos estudios se ha encontrado que las células tumorales tienen la capacidad de consumir el lactato, emplearlo para la producción de ATP y formación de aminoácidos. En células de glioma humano y de rata, el lactato exógeno es la principal fuente de carbono para el metabolismo oxidativo. También en células de glioma C6, el lactato puede ser convertido principalmente a alanina y glutamato (Bouzier,1998), (Bouzier, 2001).

Además, en células de cáncer cervical (SiHa) y cáncer de mama (MDA-MB-231), el consumo de lactato puede ocurrir de manera dependiente del pH, siendo mayor en zonas hipóxicas y con acidosis (Wang, 2007).

A través de espectroscopia magnética se ha encontrado que los niveles de lactato son un fuerte indicador de un pronóstico pobre en cáncer de cerebro, mama, pulmón, e hígado. A su vez se ha encontrado que el lactato puede estabilizar directamente al HIF-1 α (De Saeledeer, 2012), (Gillies, 2008).

La acumulación de lactato se ha correlacionado con el incremento en la metástasis y pobre supervivencia en cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de cabeza y cuello (Martínez-Outschoorn, 2011), (Kennedy 2010).

2.1.3 Acidosis

En condiciones fisiológicas, el valor de pH intracelular se encuentra entre pH 7.2-7.4. (Ayus, 2007). Éste se mantiene bajo un estricto control para la correcta función de sistemas enzimáticos (intracelulares y extracelulares) (Campbell, 2007).

En las células tumorales; la acumulación de lactato y protones en el medio extracelular producen una disminución del pH entre 6 y 7, mientras que dentro de las células tumorales es un pH 7.4. La acidosis extracelular está dada por el simporte de lactato/H⁺ y por la hidratación de CO₂ a bicarbonato (HCO₃⁻) y H⁺. El CO₂ se genera a partir del ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato (Kennedy 2010), (Ling-Yu Chen, 2008).

En un estudio con la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) se evaluó el tráfico de la glucosa y glutamato al emplear isotopos de estas (1,2¹³C-glucosa y (U)¹³C glutamina) bajo dos condiciones de pH diferentes (pH 7.4 y pH 6.7). Se encontró que la glucosa bajo condiciones de acidosis, era empleada como sustrato para la vía de las pentosas fosfato, y que los átomos de carbono de ésta se encontraban en forma de CO₂. Se encontró que bajo acidosis se incrementaba el consumo de glutamato y que éste era metabolizado a través del ciclo de Krebs. Bajo acidosis la línea MCF-7 depende del metabolismo mitocondrial para sobrevivir (LaMonte, 2013).

En un estudio con líneas de cáncer de mama de ratón (4T1) y humano (MCF-7) se evaluó la proliferación celular en medios con glucosa con y sin ácido láctico [20nM] a pH 6.7. Se encontró que las células sin acidosis láctica morían más rápidamente ya que su supervivencia fue hasta el cuarto día de incubación mientras que las células cultivadas con acidosis láctica el tiempo de supervivencia se extendió hasta el día 15 de incubación (Dai, 2013).

Se ha relacionado a la acidosis con fenotipos más resistentes, ya que promueve la degradación de la matriz extracelular, dirige la respuesta al estrés provocando arresto celular, restringe la biogénesis ribosomal y aumenta la actividad mitocondrial (Gupta, 2014), (Khacho, 2014).

2.2 Simbiosis metabólica

Es un modelo que trata de explicar la supervivencia de las células tumorales alejadas de los vasos sanguíneos (Figura 9). En este modelo se propone que el lactato producido por las células en hipoxia es consumido por las células aeróbicas. Las células aeróbicas emplean el lactato y permiten que la glucosa difunda hacia las zonas en hipoxia, permitiendo de este modo que tanto las células cercanas como las alejadas de los vasos sanguíneos tengan una fuente de carbono y proliferen (Kiamery, 2014).

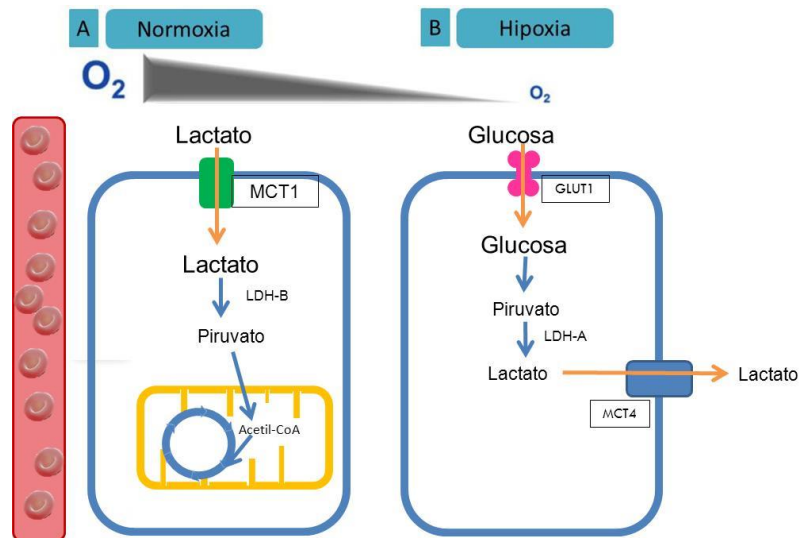


Figura 11.- Representación de la simbiosis metabólica. Las células en hipoxia metabolizan a la glucosa hasta lactato, posteriormente éste es transportado por el MCT4 extracelularmente. El lactato es empleado por las células en normoxia, éstas lo transportan con el MCT1 y lo metabolizan a piruvato que entra al ciclo de Krebs. Imagen de autoría propia.

MCT1 se encuentra expresado normalmente en niveles bajos en células con elevado nivel OXPHOS mitocondrial tal como en corazón, musculo esquelético y neuronas mientras que MCT4 solo se expresa en musculo esquelético, testículos y placenta. Ambos transportadores se encuentran sobre expresados en cáncer de mama, cervical, colorectal, gástrico, neuroblastoma, próstata y renal (Kennedy, 2010). MCT4 es un blanco de regulación por HIF-1 α , lo cual favorecería la supervivencia de las células tumorales en hipoxia (Rademakers, 2012). Es posible

que las células tumorales se adapten a las diferentes condiciones del microambiente tumoral a través de la expresión de diferentes moléculas transportadoras.

2.2.1 Marcadores de metabolismo celular

2.2.1.1 Proteína receptora transferrina (CD71)

Es una glicoproteína asociada a la membrana citoplasmática involucrada con la homeostasis del hierro y el crecimiento celular. Se encuentra expresada en bajos niveles en células normales mientras que se sobre expresa en células con elevados índices de proliferación, incluyendo a las células tumorales. Las células emplean el hierro como cofactor en reacciones enzimáticas y en la síntesis de DNA (Camp, 2013), (Daniels, 2011), (Loisel, 2011).

La sobreexpresión de CD71 se ha asociado con la sobreexpresión de los factores de transcripción HIF-1 α y c-Myc. Se encuentra elevado en el 74% de los carcinomas de mama, adenocarcinomas de pulmón y en el 93% de los carcinomas de células escamosas (Leung,2011). También se ha encontrado sobreexpresado en carcinoma de tiroides anaplásico, carcinoma tiroideo papilar, linfoma no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, tumores neuroendocrinos y cerebrales (Parenti, 2014), (Gómez, 2011).

En carcinomas de colón, estómago, páncreas, mama, pulmón hígado, vejiga, cavidad oral y útero se ha demostrado la correlación de CD71 con la proliferación, el estado y la prognosis tumoral (Parenti, 2014). Al emplear quelantes de hierro como Deferasirox se pudo inhibir el crecimiento de las células de leucemia mieloide *In vitro* e *In vivo* (Lui, 2006).

2.7.2 5'-ecto nucleotidasa (CD73)

Es una glicosilfosfatidilinositol nucleótidasa anclada en los lípidos de la membrana celular. Estructuralmente es un homodímero unido por puentes de disulfuro, el cual tiene la función de catalizar la hidrólisis de AMP (adenosina monofosfato) extracelular a adenosina. Se encuentra expresada en linfocitos, células endoteliales

y epiteliales (Allard, 2012). Regula negativamente los efectos proinflamatorios del ATP (Bertrand, 2012).

Otro factor que regula la expresión de CD73 es la naturaleza hipóxica del microambiente tumoral. El gen que codifica para CD73 posee un sitio de unión para HIF-1 α y por tanto la hipoxia promueve su expresión (Bertrand, 2012).

CD73 se ha encontrado sobreexpresada en biopsias de pacientes con cáncer de mama, colón, ovárico, gástrico en los cuales se ha asociado su expresión con un mal pronóstico (Zhao, 2014).

En líneas celulares melanoma, glioblastoma multiforme, cáncer de mama murino y humano se han encontrado que existen dos tipos diferentes; aquellas que expresan elevados niveles de los marcadores (T98G, C8161, PMW, SBCL2, SKMel28, 4T1.2, E0771) y aquellas que poseen bajos niveles (WM35, Mel501, Mel505). Se ha encontrado que estas variaciones se deben a una metilación en el gen NT5E que codifica para CD73 (Zhao, 2014), (Bertrand, 2012). Zhi y colaboradores (2010) observaron que al inhibir a CD73 con shRNA se inhibía la proliferación celular en una línea de cáncer de mama (MB-MDA-231) en la que se produjo arresto celular y apoptosis. Mientras que al transfectar la línea celular MCF-7 con el gen de NT5E, se incrementó la viabilidad celular y se promovió la progresión a través del ciclo celular. Por lo que se ha asociado la sobreexpresión de CD73 con la proliferación celular (Zhao, 2014).

En contraste, Wang y Ren (2006) encontraron que la adenosina extracelular induce apoptosis en células de carcinoma gástrico de una manera dosis dependiente y puede inhibirse al retirar el consumo de adenosina al emplear un bloqueador del transporte de nucleósidos. Además, Shirali y cols. (2013) encontraron que la adenosina puede inducir la apoptosis en células de cáncer de ovario vía Bax y caspasa-3 (Zhao, 2014).

2.7.3 Transportador de aminoácidos (CD98)

El transportador de aminoácidos neutros (arginina, fenilalanina, leucina, tirosina y triptofano) se localiza en la membrana apical celular. Es un sistema heterodimérico compuesto por una cadena pesada (CD98) y una cadena ligera (LAT1 o LAT2).

CD98 es parte fundamental para la correcta función de la cadena ligera al actuar como chaperona (Kaira, 2011).

Se encuentra altamente expresado en tejidos en proliferación, en líneas celulares tumorales (T24, RERF-LC, Hela) y tumores primarios (Kaira, 2011). La expresión de CD98/LAT1 se correlaciona con la angiogénesis, proliferación celular, y pronóstico pobre en cáncer de células no pequeñas de pulmón (NSCLC) (Kaira, 2011). Encontrándose una mayor expresión de CD98 en SqCC y LCC que en AC (Kaira, 2012). En un estudio de 106 muestras de pacientes con NSCLC se encontró que la expresión de CD98 se relaciona con un aumento en la expresión de transportador de glucosa (GLUT-1) (Kaira, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

El metabolismo de las células tumorales en el microambiente tumoral ha sido un tópico interesante en los últimos años, debido a que se ha debatido si existe una participación activa de la mitocondria. Diferentes estudios han demostrado que las mitocondrias de las células tumorales tienen la capacidad de modular su actividad de acuerdo a las condiciones del microambiente tumoral, mientras que existen estudios en los que se han encontrado una actividad mitocondrial baja o nula.

Estudios de la funcionalidad mitocondrial se han realizado bajo las diferentes condiciones presentes en el microambiente tumoral (hipoxia, acidosis y lactosis) de manera aislada. Sin embargo, no existen estudios que aborden de manera asociada cada una de las condiciones del microambiente tumoral.

En el presente trabajo se pretende evaluar de manera integral cómo las variaciones de las condiciones del microambiente tumoral afectan la funcionalidad mitocondrial. La mitocondria juega un papel clave en la supervivencia, proliferación y progresión de las células tumorales, por lo que al conocer las diferentes modulaciones que lleva a cabo se podrán identificar posibles blancos terapéuticos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la funcionalidad mitocondrial en la línea celular de cáncer de pulmón SKMES-1 y las células de fibroblastos MRC-5 bajo diferentes condiciones de crecimiento, variando la fuente de carbono, el pH y la tensión de oxígeno para emular las condiciones dadas en el microambiente tumoral que producen estrés metabólico. Así como evaluar la expresión de marcadores involucrados en el metabolismo energético y la respuesta celular a la hipoxia.

Objetivos particulares

En las células SKMES-1 y MRC-5, incubadas bajo diferentes condiciones de crecimiento variando la fuente de carbono, pH y tensión de oxígeno, se evaluará:

- La proliferación celular, consumos de glucosa y glutamina. Así como producción de lactato y glutamato.
- La masa y el potencial de membrana mitocondrial.
- La capacidad reductora celular.
- La expresión de HIF-1 α y PDK-1.
- La expresión de los marcadores CD98, CD73 y CD71.

5. HIPÓTESIS

Sí las mitocondrias de las células SKMES-1 son funcionales, responderán al estrés metabólico, inducido por variaciones en la fuente de carbono, el pH y tensión de oxígeno modificando su potencial de membrana y masa mitocondrial. La función mitocondrial posiblemente podrá asociarse con los marcadores CD98, CD73, CD71, HIF-1 α y PDK.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

El medio de cultivo RPMI-1640 (con o sin glucosa), el L-lactato de sodio y la solución de antibióticos (10 000u/mL de penicilina y 10mg/mL de estreptomina) se adquirieron en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. El suero fetal bovino (SFB) se adquirió con Thermo Scientific, Logan, Utah, USA. La solución de tripsina (0,05%)-verseno (0,05%) libre de calcio y magnesio se compró a In vitro, D.F., México. El azul de tripano se compró a Sigma Chemical Company. Los anticuerpos anti-CD71 (APC, clona OKT9), anti-CD73 (PerCP-eFluor 710, clona AD2) y anti-CD98 (FITC, clona 5E5) se adquirieron a Bioscience, Inc., San Diego, CA, USA. Los anticuerpos primarios de HIF-1 α y PDK-1 provenían del Kit “Hypoxic Response Human Flow Cytometry Kit” de Abcam San Francisco, CA, USA. Los anticuerpos secundarios para HIF-1 α (Alexa Fluor 647 anti-rabbit IgG, clona Poly4064) y PDK-1 (PE Goat anti-mouse IgG, clona Poly4053) se compraron a Biolegend, San Diego, CA, USA. El alamar Blue se compró a Invitrogen, Eugen, OR, USA y el yoduro de propidio a Sigma-Aldrich. El JC-1 y la carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP) provenían del kit “Mitoprobe JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry” de Invitrogen, Eugen, OR, USA. La Anexina V (Alexa Fluor 647) se compró a BioLegend y la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) a BD Pharmingen, San José, CA, USA.

6.2 Equipos

Las líneas celulares fueron incubadas en la incubadora Sanyo Electric Co. Para producir una atmósfera en hipoxia se empleó la cámara de incubación modular Billiups-Rothenberg. Se empleó el fluorómetro Fluoroskan Ascent FL de Labsystems y el citómetro de flujo FACSCanto II de Becton Dickinson. Se empleó el analizador bioquímico YSI de Life Science. Se empleó el contador de células automático TC20 de BioRad.

6.3 Cultivo celular

La línea celular de carcinoma epidermoide de pulmón SKMES-1 y las células de fibroblastos de pulmón MRC-5, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v y una solución de antibióticos al 1% v/v (estreptomina/ ampicilina). Las líneas celulares se mantuvieron con el medio RPMI-1640 a 37°C en una atmósfera de 21% de O₂ y 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaban el 95% de confluencia, se realizaba un pase celular con tripsina.

6.4 Conteo y viabilidad celular

Para evaluar la cantidad y viabilidad celular se empleó la cámara de Neubauer utilizando el colorante vital azul de tripano. El colorante posee grupos cargados amino y sulfonato los cuales le impiden atravesar las membranas celulares intactas, pero si a las membranas de células muertas. Por lo que se pueden observar a las células viables translucidas mientras que las muertas poseen un color azul.

6.5 Condiciones de cultivo

Las líneas celulares se cultivaron bajo diferentes condiciones de cultivo al modificarse la fuente de carbono, el pH y la tensión de oxígeno.

Se emplearon dos fuentes de carbono diferentes: medio RPMI-1640 con D-glucosa (2.0 g/L) y medio RPMI-1640 con L-lactato (2.8g/L). Los medios con D-glucosa y L-lactato se ajustaron a pH 7.2 y 6.2.

Las células fueron incubadas bajo diferentes tensiones de oxígeno: normoxia e hipoxia. La atmosfera de normoxia estuvo compuesta por un 21% de O₂ y 5% de CO₂ mientras que la atmosfera de hipoxia se controló a través de la cámara modular Billiups-Rothenberg en la que había un 2% de O₂, 5% de CO₂ y 93% de N₂.

Las condiciones de cultivo empleadas para los diferentes ensayos se resumen en las siguientes tablas:

| Normoxia | | | | Hipoxia | | | |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Glucosa | Glucosa | Lactato | Lactato | Glucosa | Glucosa | Lactato | Lactato |
| pH 7.2 | pH 6.2 | pH 7.2 | pH 6.2 | pH 7.2 | pH 6.2 | pH 7.2 | pH 6.2 |

Los ensayos realizados en la línea celular SKMES-1 y fibroblastos de pulmón MRC-5 fueron los siguientes:

- a) Cinéticas de crecimiento, de consumo de glucosa y glutamina y de producción de lactato y glutamato.
- b) Evaluación de la masa mitocondrial por citometría de flujo.
- d) Evaluación de la capacidad reductora celular por fluorometría
- d) Evaluación del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo.
- d) Evaluación de las moléculas HIF-1 α y PDK-1 por citometría de flujo
- f) Evaluación de los marcadores de metabolismo CD71, CD73 y CD98 por citometría de flujo.

6.6 Cinéticas de crecimiento celular

De las cajas de cultivo se recuperaron las células con tripsina y se lavaron con medio RPMI-1640. Se prepararon suspensiones celulares a una concentración celular de 100,000 cel/mL para SKMES-1 y 50,000 cel/mL para MRC-5, utilizando cada uno de los medios.

Utilizando placas de 24 pozos, se sembró 1mL por pozo de cada suspensión celular (4 pozos por placa). Una placa se incubó en normoxia y otra en hipoxia. Se recuperaron el sobrenadante y las células de cada pozo a las 24, 48, 72, y 96h de incubación. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. Las células se recuperaron empleando tripsina y se lavaron con PBS estéril. Se resuspendieron en PBS y se contaron con el contador de células TC20 empleando azul de tripano.

6.7 Consumos de glucosa y glutamina, producción de lactato y glutamato.

De los sobrenadantes obtenidos previamente, se determinó la cantidad de glucosa, glutamina, glutamato y lactato empleando el analizador bioquímico YSI (Life Science, St. Louis, MO, USA)

El YSI es un equipo automatizado que realiza la determinación de diferentes metabolitos de una manera rápida y precisa. La determinación de metabolitos se realiza por medio de enzimas acopladas en una membrana. Dichas enzimas producen como producto final: peróxido de hidrogeno. El peróxido de hidrogeno participa en una reacción oxido-reducción con el electrodo de platino del YSI, produciendo una señal que es directamente proporcional a la concentración de metabolito.

6.8 Evaluación de la masa mitocondrial empleando Mitotracker Green por citometría de flujo.

La masa mitocondrial se evaluó empleando el compuesto Mitotracker Green. Tal compuesto tiene la característica de no ser fluorescente en soluciones acuosas mientras que, en un ambiente lipídico, se acumula y fluoresce. La acumulación del compuesto es independiente del potencial de membrana mitocondrial por lo que la fluorescencia emitida es proporcional a la masa mitocondrial (Probes, 2010).

Se realizó una suspensión de una concentración celular de 100,000 cel/mL para SKMES-1 y 50,000 cel/mL de MRC-5, empleando cada uno de los medios. Se utilizaron placas de 24 pozos, se sembró 1mL por pozo de cada suspensión celular (1 pozo por placa). Una placa se incubó en normoxia y otra en hipoxia por 48h. Posteriormente se recuperaron las células y se lavaron con PBS. Las células se resuspendieron y contaron con azul de tripano en cámara de Neubauer. Se lavaron. Se resuspendieron en Mitotracker Green 200nM (200µL por cada 100,000 células) y se incubaron durante 30min a 37°C. Se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en 200 µL de yoduro de propidio (5µg/ml). Las células teñidas se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto II. De la región de las células viables (yoduro de propidio negativas) se adquirieron al menos 20,000 eventos. Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa FlowJo V10.

Evaluación de la masa mitocondrial empleando Mitotracker green por citometria de flujo

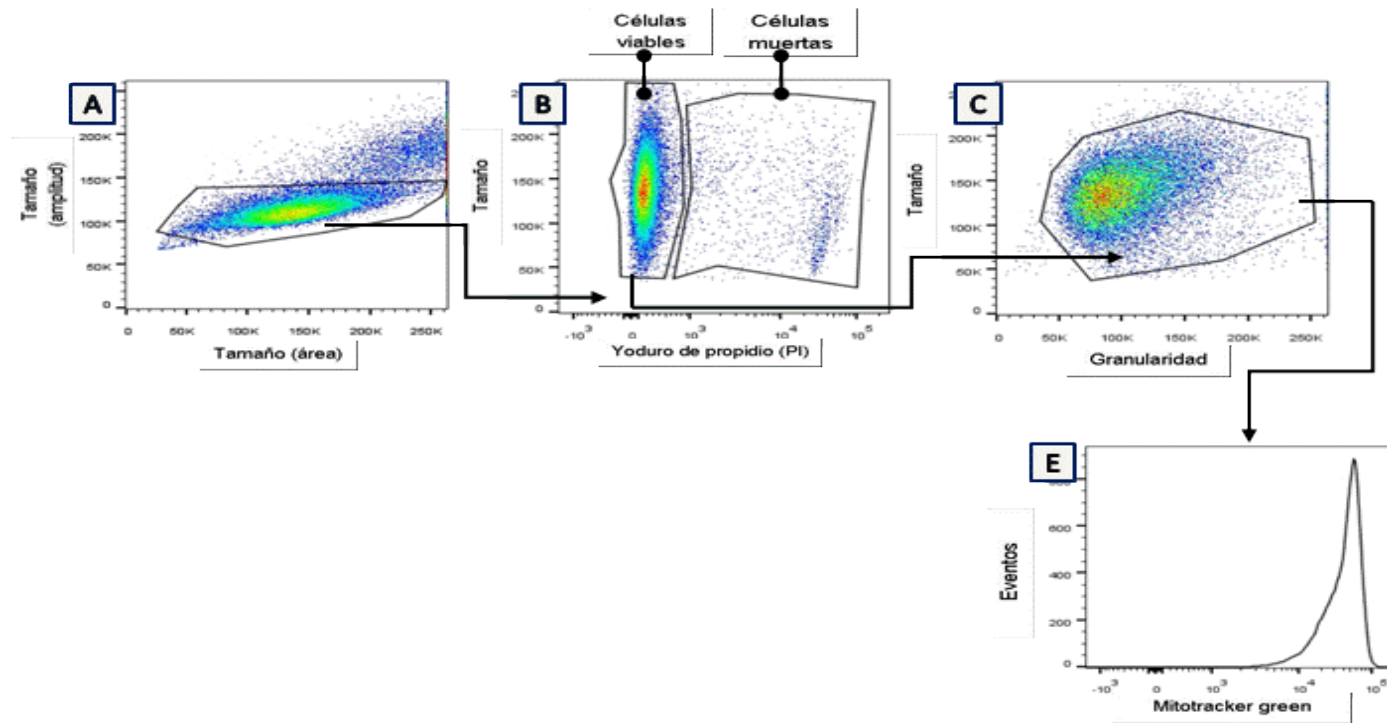


Fig. 12.- Análisis de la masa mitocondrial. A) Se muestra la densidad poblacional de las células tumorales. Se seleccionó la población que corresponde a las células individuales. B) De las células individuales se evaluó la marca fluorescente de yoduro de propidio (PI). Se seleccionó a la población negativa para PI, la cual corresponde a las células viables. C) En la gráfica se muestra la población de las células viables en los parámetros de tamaño y granularidad. D) Se realizó un histograma de la fluorescencia de Mitotracker green. De esta población se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada condición, la cual es directamente proporcional a la masa mitocondrial.

Evaluación de la capacidad reductora celular empleando Alamar blue por fluorimetría.

Para evaluar la capacidad reductora celular se empleó el compuesto soluble Alamar blue (también conocido como resazurina), el cual es un indicador de óxido-reducción que fluoresce y cambia de color en respuesta a la reducción química del medio en crecimiento. Tal reducción está dada por NADH_2 , NADPH , FADH , reductasas mitocondriales, diaforasas y citocromos (Figura 12). (Rampersad, 2012)

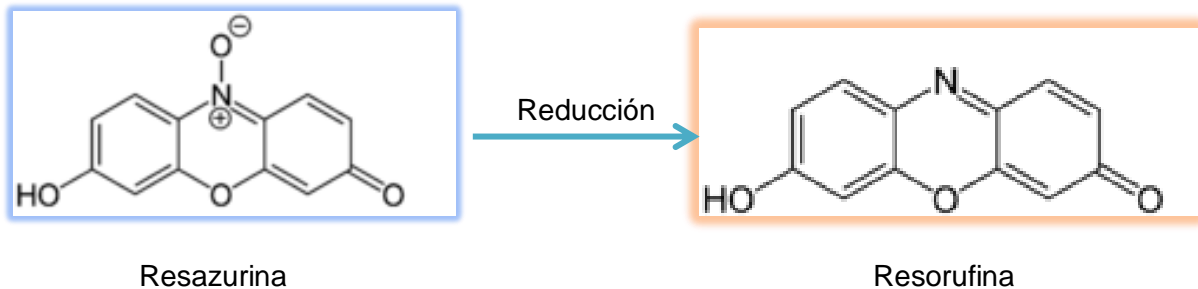


Figura 13.- Par oxido-reducción de Alamar blue. La resazurina (color azul y no fluorescente) es reducida a resorufina (color rosa y fluorescente) la cual es detectada por fluorimetría.

Se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 100,000 cel/mL para SKMES-1 y 50,000 cel/mL para MRC-5, empleando cada uno de los medios diferentes. En placas de 48 pozos, se sembraron 500 μl por pozo de cada suspensión celular (3 pozos por placa) y se incubaron por 48h.

A las 45h de incubación se colocó el 10% v/v de Alamar blue y se continuó con la incubación. A las 48h se tomaron 100 μl del sobrenadante de cada condición y se leyeron empleando el fluorómetro Fluoroskan Ascent FL (λ excitación de 544nm, λ emisión de 590nm). Posteriormente las células se recuperaron y lavaron con 1mL de PBS. Se contaron empleando azul de tripano. Se calculó la fluorescencia emitida por cada 1,000 células.

$$\text{Fluorescencia por célula} = \frac{\text{Fluorescencia para cada condición}}{\text{número de células para cada condición}} \times 1000$$

Evaluación del potencial de membrana mitocondrial empleando JC-1/ Anexina V/ 7-AAD por citometría de flujo.

El potencial de membrana mitocondrial es un indicador de la actividad mitocondrial. Se evaluó empleando un fluorocromo catiónico, el JC-1. Dicho fluorocromo tiene la capacidad de internalizarse en la mitocondria de forma dependiente del potencial, emitiendo una fluorescencia verde (514nm) en su forma monomérica y fluorescencia roja (590nm) al encontrarse en forma de agregados a consecuencia del aumento de potencial de membrana mitocondrial (Figura 15).

Se obtiene la intensidad media de fluorescencia (MFI) emitida por la fluorescencia roja y por la verde, el cociente (MFIroja/MFIverde) es un indicativo del potencial de membrana mitocondrial.

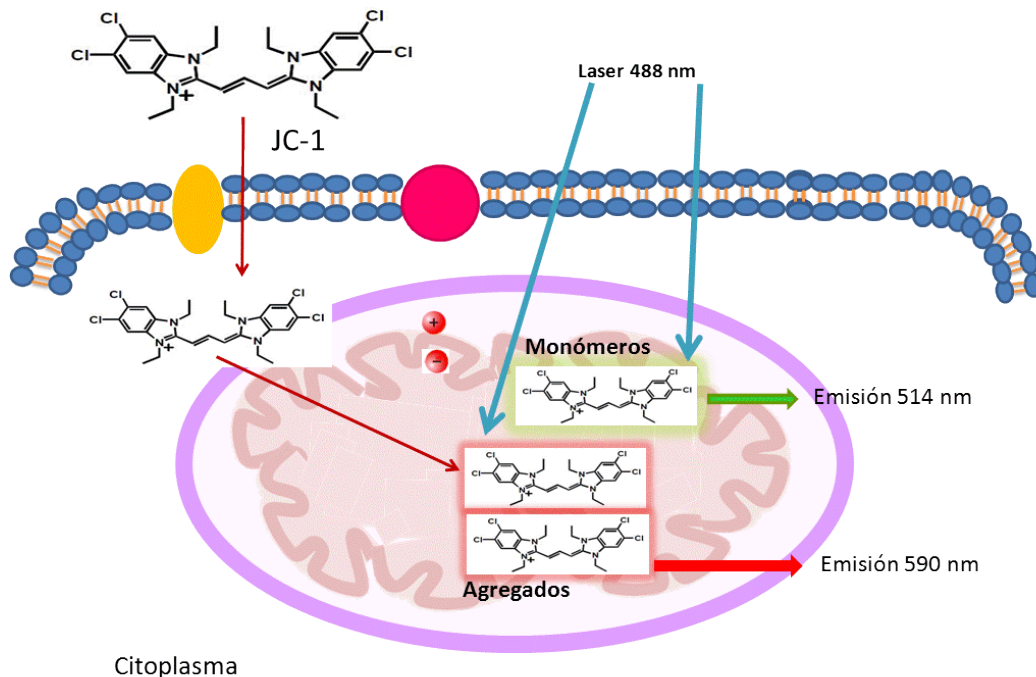


Figura 14.- Evaluación del potencial de membrana mitocondrial. El JC-1 se internaliza y se acumula en la matriz mitocondrial debido a la carga positiva del fluorocromo y la carga negativa de la matriz.

La tinción de JC-1 está acoplada con la técnica de Anexina V y 7-AAD. Dicha técnica permite discriminar a las células muertas o en apoptosis de las células viables.

La fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática en células viables, cuando las células entran en apoptosis esta molécula se transloca

a la cara externa. La Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. El 7-AAD es un fluorocromo soluble que es hidrofílico, y es excluido en las células viables. Cuando las células están muertas penetra y se une al DNA de doble membrana al intercalarse entre las regiones ricas en bases guanina-citocina

En placas de 24 pozos se colocaron las líneas SKMES-1 y MRC-5 a la densidad antes indicada. Se incubaron en normoxia e hipoxia por 48h. Las células se recuperaron y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 200 μ L de JC-1 (2 μ M) preparado en PBS, se incubó a 37°C por 30 min. Se lavaron las células y se resuspendieron en 100 μ L de Anexina V (5 μ L/tubo) preparado en buffer HEPES, se incubó a 37°C por 30 min. Se añadieron 100 μ L de 7-AAD (4 μ L/tubo) preparado en HEPES.

Las células teñidas se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto II. De la región de las células viables (Anexina V y 7-AAD negativas) se adquirieron al menos 20,000 eventos. Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa FlowJo V10.

Evaluación del potencial de membrana mitocondrial empleando JC-1/ Anexina V/ 7-AAD

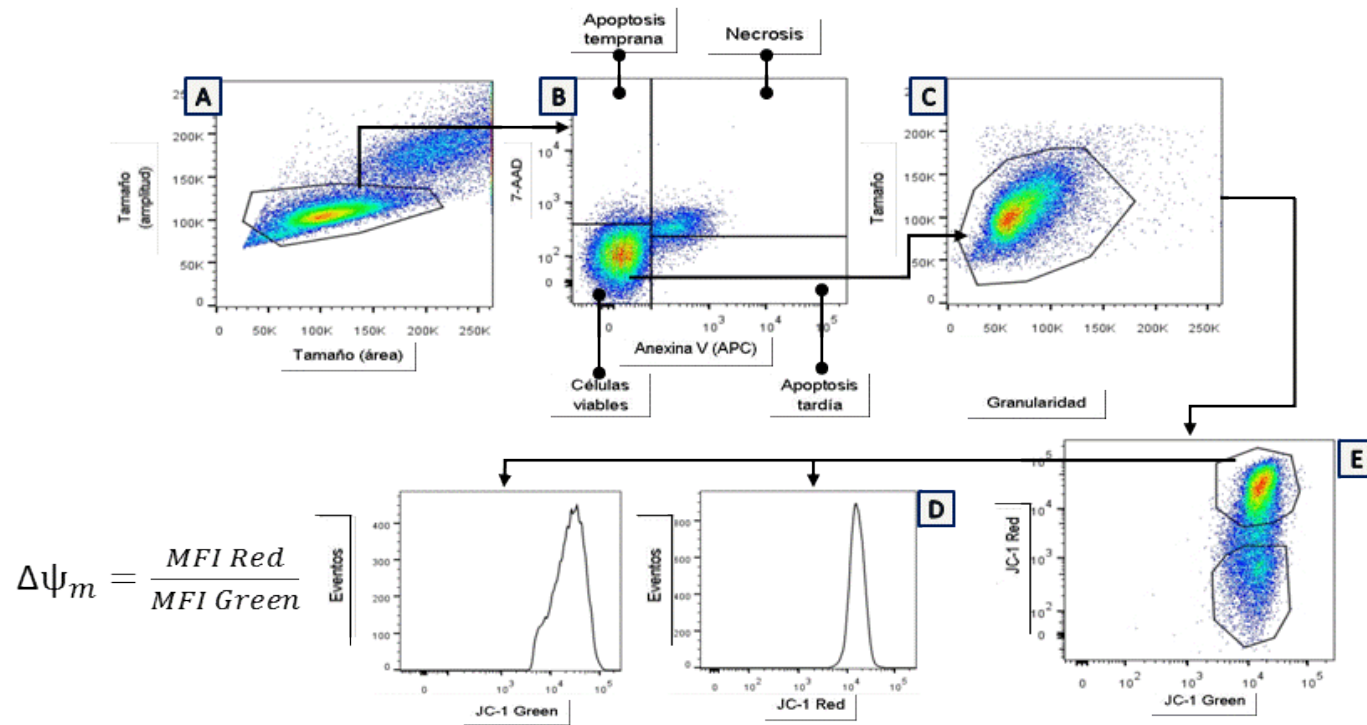


Fig. 15- Análisis del potencial de membrana. A) Se muestra la densidad poblacional de las células tumorales. Se seleccionó la población que corresponde a las células individuales. B) De las células individuales se evaluaron las marcas fluorescentes de Anexina V y 7-AAD. Se seleccionó la población negativa para Anexina V y 7-AAD, correspondiente a las células viables C) Las células viables se muestran graficadas en los parámetros de Tamaño-Granularidad D) De la población con fluorescencia roja se elaboró un histograma E) El histograma nos permitió obtener la MFI₅₉₀ Red y la MFI₅₁₄ Green. Se realizó un cociente entre la IMF₅₉₀/ IMF₅₁₄ que es proporcional al potencial de membrana mitocondrial.

6.11 Evaluación de las moléculas HIF-1 α y PDK-1 por citometría de flujo.

La evaluación de los marcadores HIF-1 α y PDK-1 se realizó por medio de una tinción intracelular. Para ello se ocuparon anticuerpos primarios dirigidos en contra de estas dos proteínas. Posteriormente se emplearon anticuerpos secundarios marcados dirigidos en contra de los anticuerpos primarios. Para discriminar las células muertas se empleó el reactivo Zombie NIR (Figura 15).

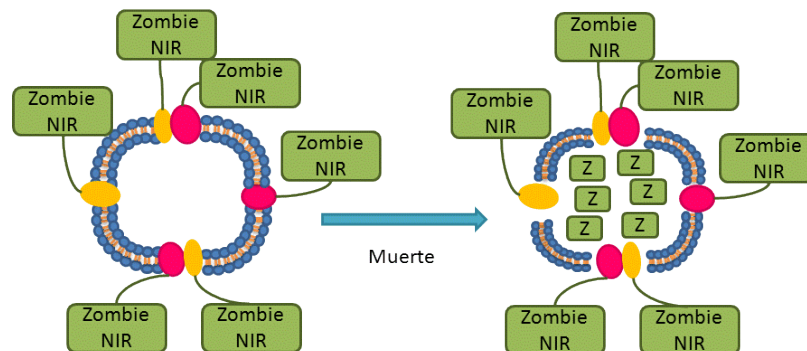


Figura 16.- Representación del Zombie NIR. Zombie NIR es un fluorocromo que interacciona con los grupos amino primarios de las proteínas. Es excluido en células viables por lo que solo es capaz de unirse a proteínas de superficie de la membrana plasmática. En células muertas la membrana pierde la continuidad y Zombie NIR penetra y se une con las proteínas presentes en el citoplasma. En células muertas aumenta la intensidad de fluorescencia del fluorocromo.

Se sembraron las células de acuerdo a la densidad y condiciones antes mencionadas. Posteriormente las células se recuperaron y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 100 μ L de Zombie NIR (0.75 μ L/tubo) diluido en PBS, se incubó a temperatura ambiente por 30min. Posteriormente se lavaron con PBS/ albumina (1% p/v) y azida de sodio (0.1% p/v). Se resuspendieron en 125 μ L de PBS y se añadió lentamente 125 μ L de p-formaldehído (4%), se mezclaron por inmersión. Las células se lavaron. Posteriormente se resuspendieron en 100 μ L de PBS y se añadieron 900 μ L de metanol (100%). Las células se almacenaron a -20°C.

Las células se sacaron de almacenamiento y se dejaron llegar a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron dos veces con 1mL de buffer de bloqueo. Las células se resuspendieron en 50 μ L de buffer de bloqueo y se incubaron a temperatura ambiente por 30min. Se añadieron 50 μ L de anticuerpos primarios: HIF-

1 α (2 μ L/tubo) y PDK-1(2 μ L/tubo) preparados en PBS, se incubaron a temperatura ambiente por una hora. Las células se lavaron y resuspendieron en 50 μ L de anticuerpos secundarios anti-IgG (PE) de ratón (0.5 μ L/tubo, PDK-1) y anti-IgG (Alexafluor647) de conejo (0.625 μ L/ tubo, HIF-1 α) diluidos en PBS, se incubaron a temperatura ambiente por 30min. Las células se lavaron y resuspendieron en 200 μ L de PBS.

Las células teñidas se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto II. De la región de las células viables (intensidad de fluorescencia de zombie baja) se adquirieron al menos 20,000 eventos. Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa FlowJo V10.

Evaluación de los marcadores HIF-1 α y PDK por citometría de flujo.

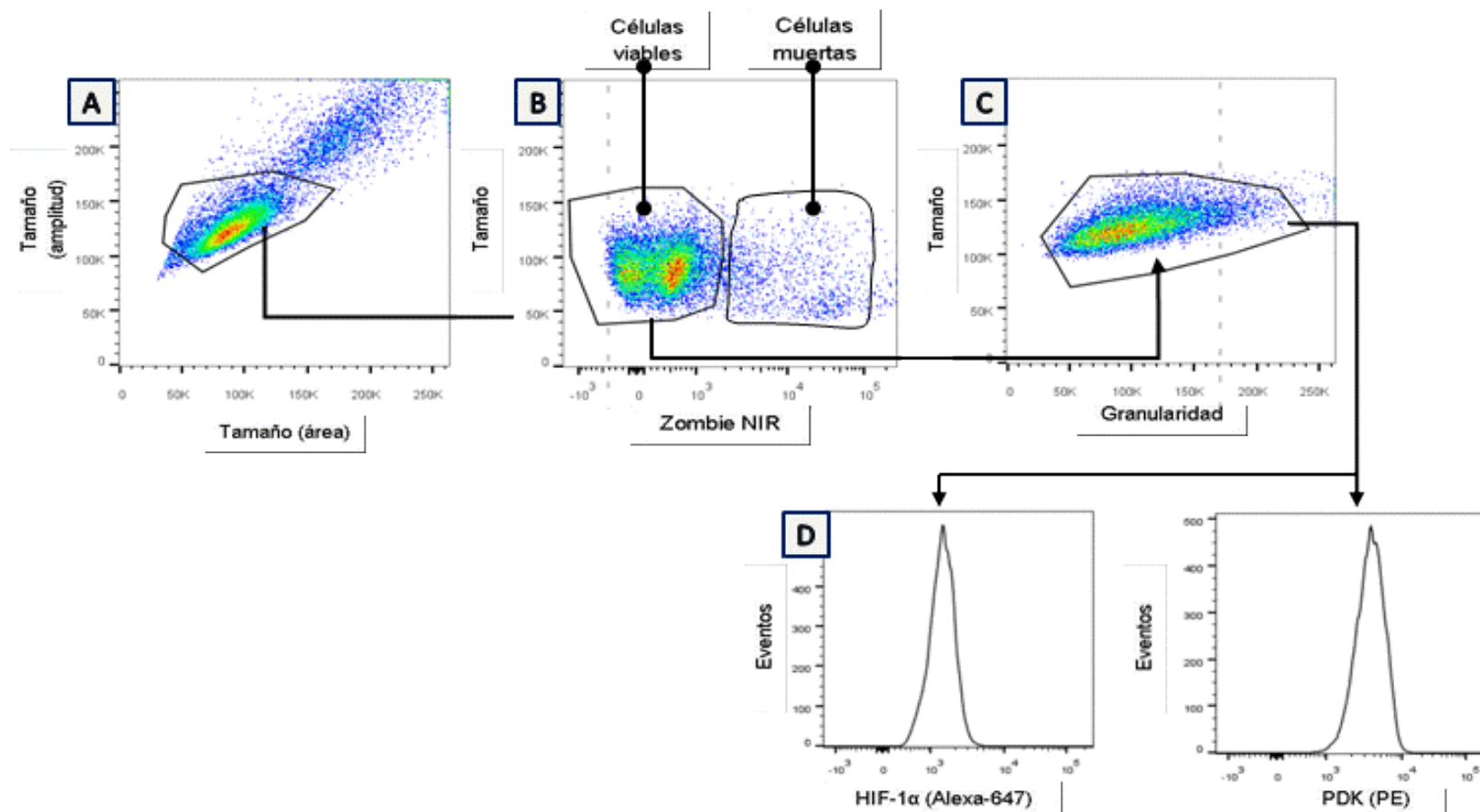


Fig. 17.- Análisis de los marcadores HIF-1 α y PDK-1. A) Se muestra la densidad poblacional de las células tumorales. Se seleccionó la población que corresponde a las células individuales. B) De las células individuales se evaluó la marca fluorescente de Zombie NIR. Se seleccionó a la población con intensidad de fluorescencia baja para dicha marca, la cual corresponde a las células viables. C) En la gráfica se muestra la población de las células viables en los parámetros de tamaño y granularidad. D) Se realizó un histograma de la intensidad de fluorescencia HIF-1 α y PDK.

6.12 Evaluación de los marcadores de metabolismo CD71, CD73 y CD98 por citometría de flujo.

Los marcadores de metabolismo se evaluaron a través de una inmunotinción de membrana. Se emplearon anticuerpos marcados en contra de CD71, CD73 y CD98.

Se colocaron SKMES-1 y MRC-5 bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas. A las 48h las células se recuperaron y lavaron con PBS. Se resuspendieron en 100 μ L de Zombie NIR (0.75 μ L) preparado en PBS, las células se incubaron a temperatura ambiente por 30min. Posteriormente las células se lavaron con PBS/ albumina (1% p/v) y azida de sodio (0.1% p/v). Las células se resuspendieron en una mezcla de anticuerpos anti-CD71, anti-CD73 y anti-CD98, y se incubaron a temperatura ambiente por 30min. Posteriormente las células se lavaron con PBS/BSA y se fijaron con 250 μ L de p-formaldehído al 1%.

Las células teñidas se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto II. De la región de las células viables (intensidad de fluorescencia de Zombie NIR baja) se adquirieron al menos 20,000 eventos. Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa FlowJo V10.

Evaluación de los marcadores CD71, CD73, CD98 citometría de flujo

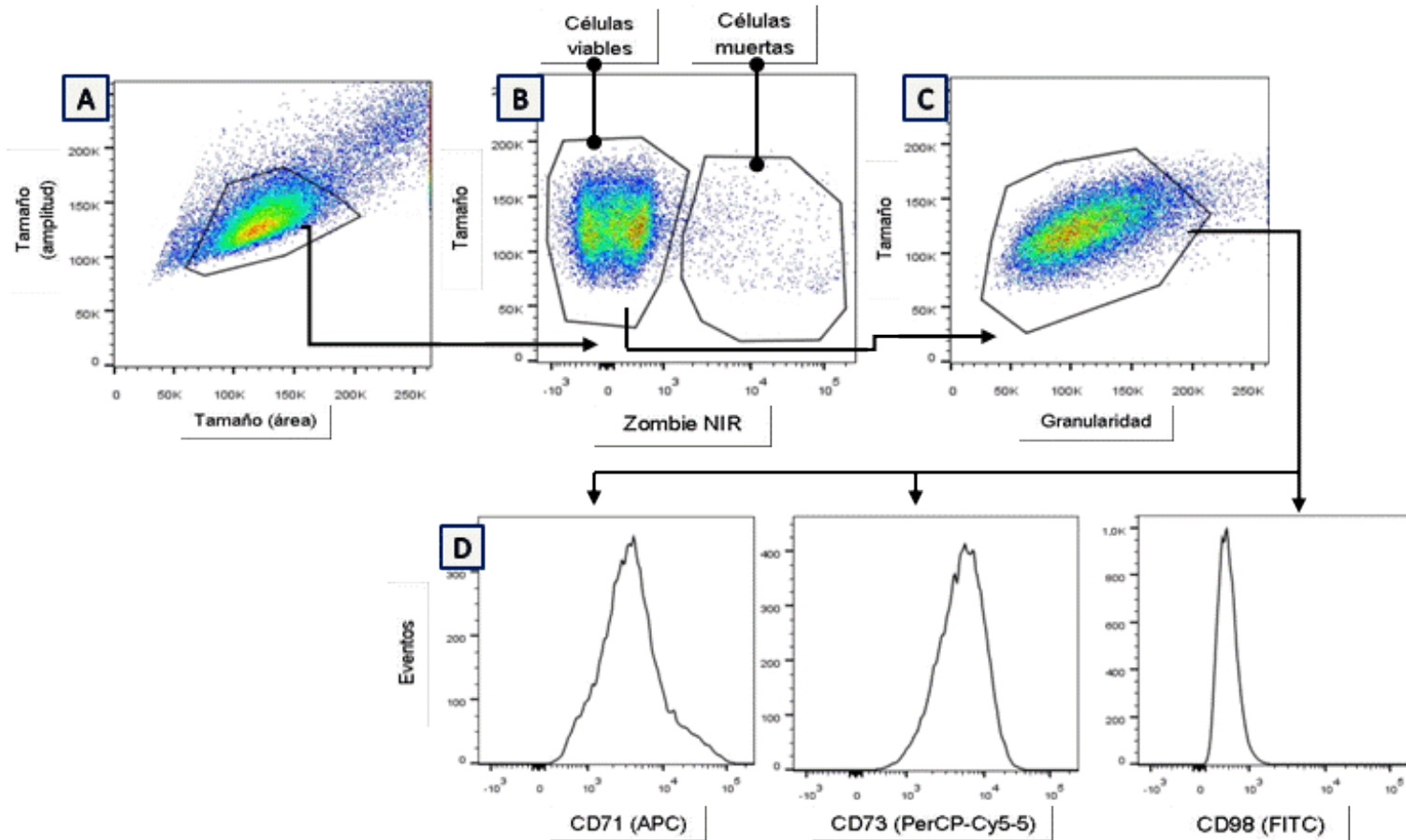


Fig. 18.- Análisis de los marcadores de metabolismo. A) Se muestra la densidad poblacional de las células tumorales. Se seleccionó la población que corresponde a las células individuales. B) De las células individuales se evaluó la marca fluorescente de Zombie NIR. Se seleccionó a la población con intensidad de fluorescencia baja dicha marca, la cual corresponde a las células viables. C) En la gráfica se muestra la población de las células viables en los parámetros de tamaño y granularidad. D) Se realizó un histograma de la intensidad de fluorescencia de CD71, CD73 y CD98.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa GradPad Prism 5. Se emplearon análisis ANOVA de una vía para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes resultados encontrados. Las pruebas post hoc utilizadas fueron:

Prueba de Bonferroni: para comparar la capacidad reductora celular, la masa mitocondrial, así como el potencial de membrana mitocondrial. Las comparaciones se realizaron entre todas las condiciones de cultivo.

Prueba de Dunnet: para comparar la expresión de los marcadores de metabolismo celular y de moléculas de respuesta a la hipoxia.

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

8. RESULTADOS

Los cultivos en normoxia presentaron mayor proliferación celular que sus contrapartes hipoxicas.

Se llevó a cabo la evaluación de la proliferación celular de los fibroblastos MRC-5 y de la línea celular SKMES-1, por medio de cinéticas de crecimiento bajo diferentes condiciones de cultivo (Figura 18). En la fase exponencial de crecimiento se calculó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación (Véase apéndice) (Tabla 1).

Tanto para MRC-5 como para SKMES-1, los cultivos en normoxia presentaron mayor proliferación que aquellos en hipoxia. Las células cultivadas en glucosa a pH 7.2 (Glu7.2) en normoxia e hipoxia presentaron mayor proliferación que el resto de las condiciones. Tanto en MRC-5 como en SKMES-1 se encontró que cuando las células son cultivadas bajo hipoxia la velocidad específica de crecimiento disminuyó y el tiempo de duplicación se incrementó.

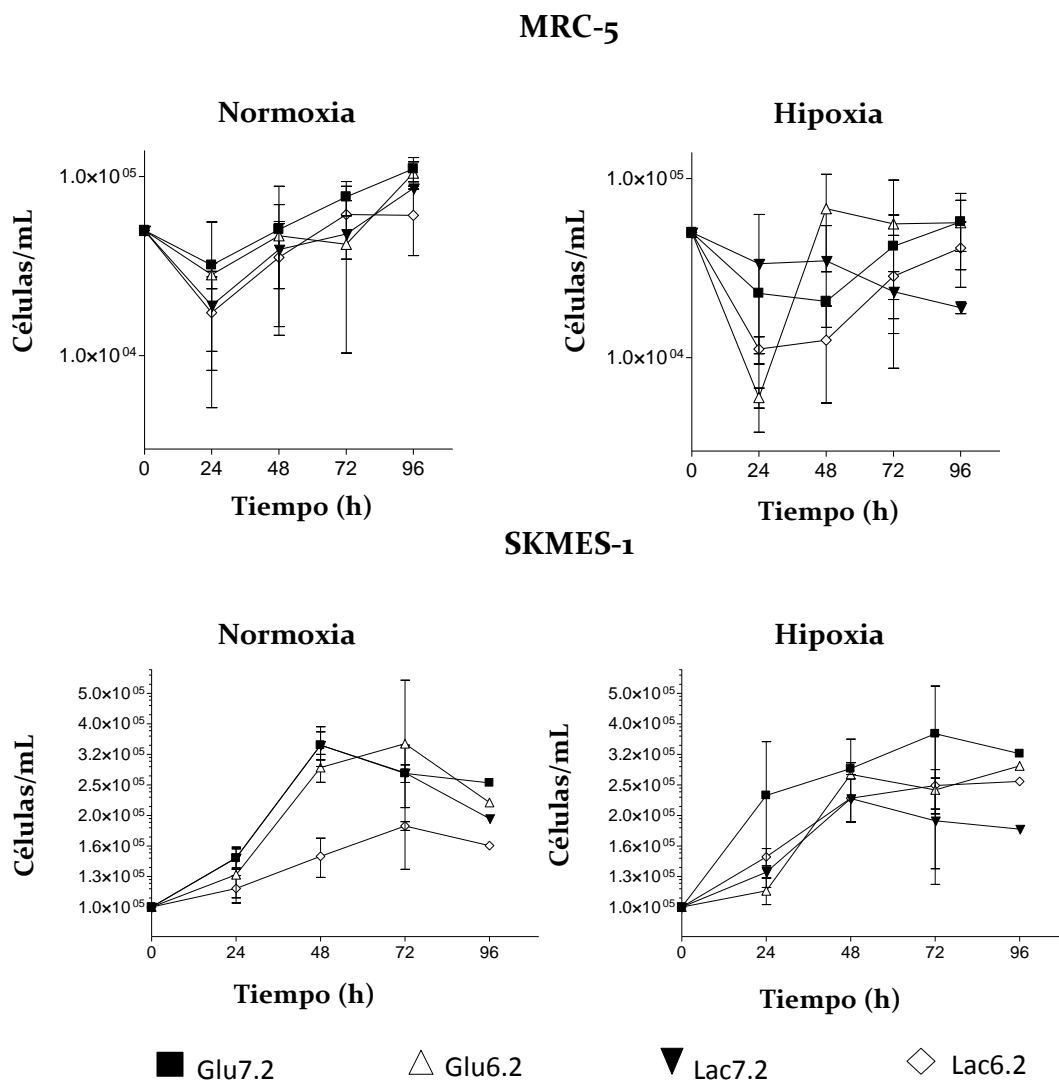


Figura 19.- Cinéticas de crecimiento celular de MRC-5 y SKMES-1 bajo diferentes condiciones de cultivo. Se muestra la desviación estándar (\pm) de una $n=2$ para MRC-5 y una $n=3$ para SKMES-1. Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH 6.2 (6.2).

Tabla 1.- Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de MRC-5 y SKMES-1 bajo diferentes condiciones de cultivo.

| Línea celular | Normoxia | | Hipoxia | |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| | Velocidad específica de crecimiento* | Tiempo de duplicación | Velocidad específica de crecimiento* | Tiempo de duplicación |
| MRC-5 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.016 | 41.81 | 0.015 | 43.87 |
| GlupH6.2 | 0.0204 | 33.93 | 0.018 | 37.62 |
| LacpH7.2 | 0.019 | 35.61 | -0.007** | -88.22** |
| LacpH6.2 | 0.024 | 27.73 | 0.0200 | 34.55 |
| SKMES-1 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.265 | 26.11 | 0.102 | 67.87 |
| GlupH6.2 | 0.262 | 26.41 | 0.317 | 21.85 |
| LacpH7.2 | 0.296 | 23.38 | 0.21 | 32.87 |
| LacpH6.2 | 0.89 | 77.55 | 0.174 | 39.66 |

* La velocidad específica de crecimiento está dada en (h^{-1}).

**Se presentó muerte celular.

El consumo de glucosa se incrementó en MRC-5 y en SKMES-1 en hipoxia

Un elevado consumo de glucosa es una característica presente en las líneas tumorales, es por ello que se evaluó el consumo de glucosa en este estudio. Se calculó la velocidad de consumo de glucosa para cada línea celular en la fase exponencial (Figura 19) (Véase apéndice); posteriormente se calculó el porcentaje de consumo de glucosa para cada condición con respecto al control (glucosa pH7.2 normoxia, Glu7.2N) los resultados se muestran en la Tabla 2.

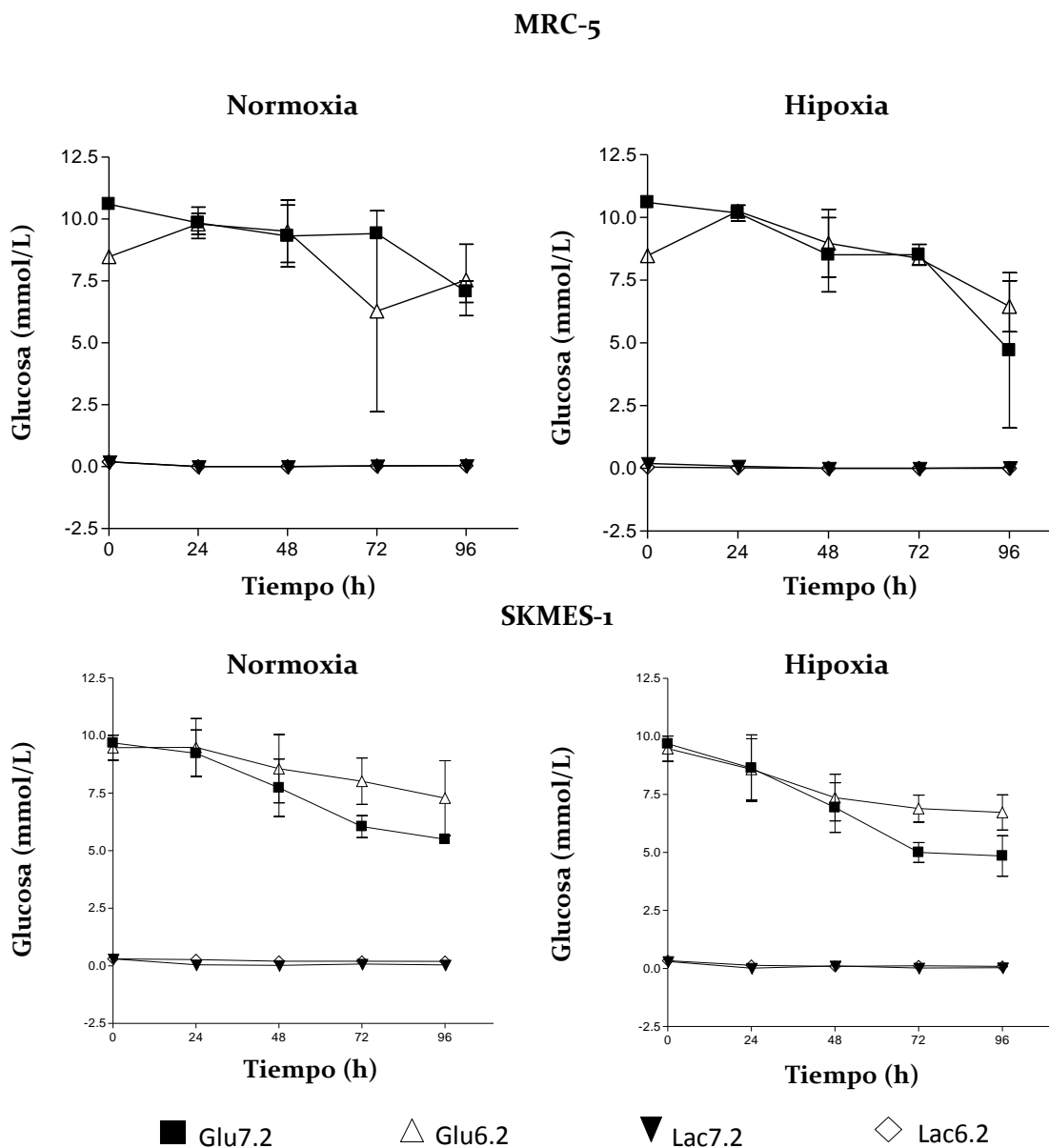


Figura 20.- Consumo de glucosa de MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. Se muestra la desviación estándar (\pm) de una $n=2$ para MRC-5 y una $n=3$ para SKMES-1. Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH 6.2 (6.2).

En MRC-5, el consumo de glucosa se incrementó bajo condiciones de hipoxia, siendo mayor en el medio con pH 7.2. En la línea SKMES-1, solo se observó un incremento del consumo de glucosa a pH ácido (Tabla 2).

Tabla 2.- Consumo de glucosa y producción de lactato de MRC-5 y SKMES-1 bajo diferentes condiciones de cultivo.

| Línea celular | Normoxia | | Hipoxia | |
|----------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| | Consumo de glucosa* | Porcentaje** | Consumo de glucosa* | Porcentaje** |
| MRC-5 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.5863 | 100 | 2.502 | 427 |
| GlupH6.2 | 0.6043 | 103 | 0.6957 | 119 |
| SKMES-1 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.2165 | 100 | 0.1775 | 82 |
| GlupH6.2 | 0.1281 | 59 | 0.3891 | 180 |
| | Producción de lactato* | Porcentaje** | Producción de lactato* | Porcentaje** |
| MRC-5 | | | | |
| GlupH7.2 | 1.50 | 100 | 3.98 | 265 |
| GlupH6.2 | 2.15 | 143 | 1.38 | 92 |
| LacpH7.2 | 1.86 | 124 | 0.68 | 45 |
| LacpH6.2 | 2.86 | 191 | 1.55 | 103 |
| SKMES-1 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.832 | 100 | 0.510 | 61 |
| GlupH6.2 | 0.595 | 71 | 1.28 | 154 |
| LacpH7.2 | 0.414 | 50 | 0.488 | 59 |
| LacpH6.2 | 0.650 | 78 | 0.384 | 46 |

* Velocidad de consumo está dada en micromol/1, 000,000cels*h.

**Respecto al control (Glu7.2N)

La producción de lactato se incrementó en MRC-5 y SKMES-1 en hipoxia

En diversos estudios con líneas celulares se ha observado que el aumento en la concentración de lactato extracelular está dado por un elevado consumo de glucosa. En las células MRC-5 la producción de lactato fue mayor en Glu7.2H, mientras que en las células SKMES-1, la producción de lactato fue mayor en Glu6.2H. Se encontró que los medios con mayor producción de lactato son aquellos en los que el consumo de glucosa fue mayor. Ninguna de las líneas consumió lactato bajo ninguna condición, ya que las concentraciones aumentaron progresivamente (Figura 20 y Tabla 3).

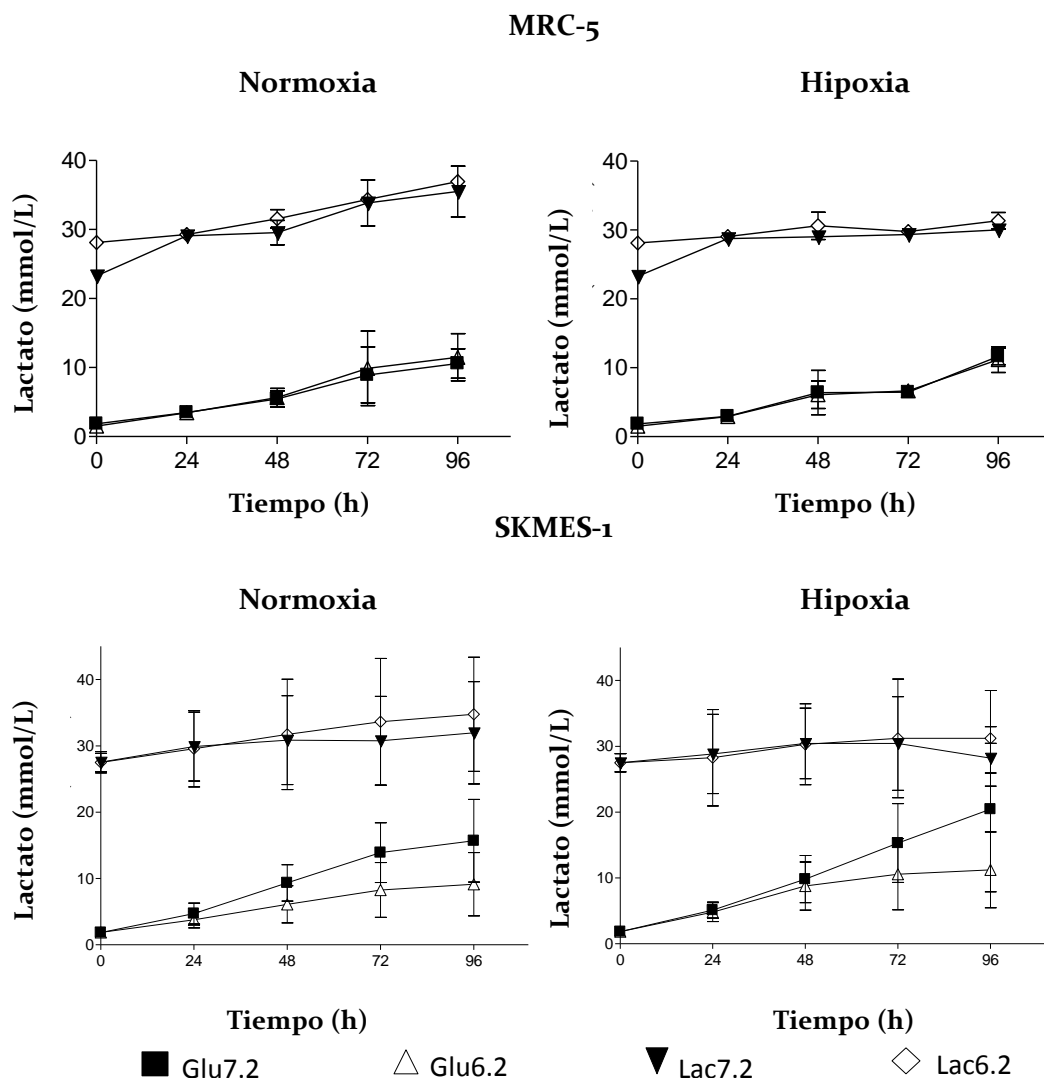


Figura 21.- Producción de lactato por MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. Se muestra la desviación estándar (\pm) de una $n=2$ para MRC-5 y una $n=3$ para SKMES-1. Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH 6.2 (6.2).

El consumo de glutamina fue mayor en lactato pH 6.2 normoxia

Las células tumorales emplean vías alternas a la glicólisis para generar intermediarios del ciclo de Krebs, aminoácidos, purinas entre otros.

Tanto en las células MRC-5 como en las células SKMES-1, el consumo de glutamina fue mayor en el medio con lactato pH 6.2 en normoxia (Figura 21 y Tabla 4).

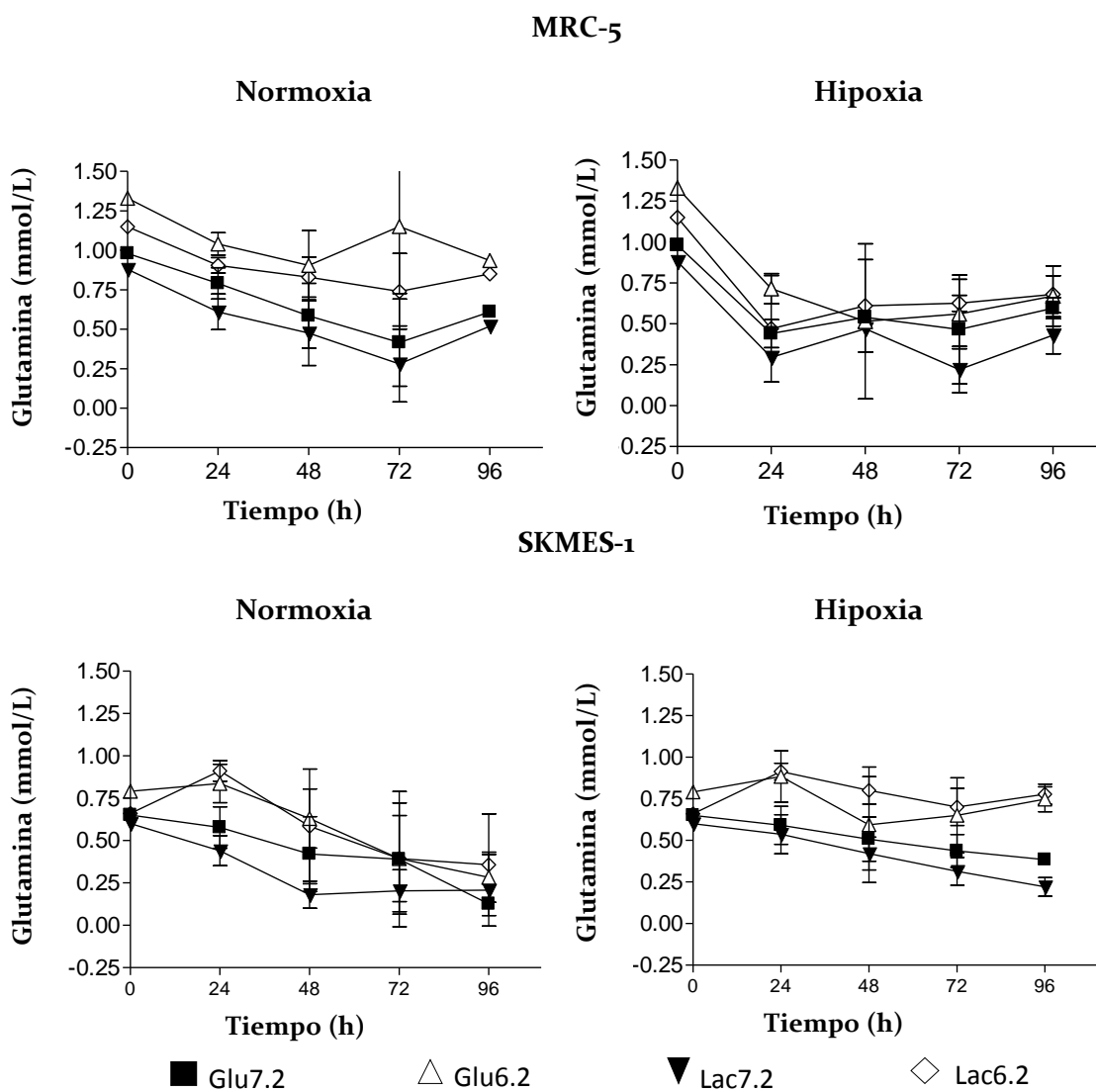


Figura 22.- Consumo de glutamina de las células MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. Se muestra la desviación estándar (\pm) de una $n=2$ para MRC-5 y una $n=3$ para SKMES-1. Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH 6.2 (6.2).

Tabla 4.- Consumo de glutamina y producción de glutamato de las células MRC-5 y SKMES-1 bajo diferentes condiciones de cultivo.

| Línea celular | Normoxia | | Hipoxia | |
|----------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | Consumo de glutamina* | Porcentaje** | Consumo de glutamina* | Porcentaje** |
| MRC-5 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.038 | 100 | -0.0709 | -187 |
| GlupH6.2 | 0.0281 | 74 | 0.0563 | 148 |
| LacpH7.2 | 0.0262 | 69 | *** | *** |
| LacpH6.2 | 0.0951 | 251 | -0.706 | -186 |
| SKMES-1 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.0286 | 100 | 0.0202 | 71 |
| GlupH6.2 | 0.0225 | 79 | 0.0216 | 75 |
| LacpH7.2 | 0.0521 | 182 | 0.0424 | 148 |
| LacpH6.2 | 0.0472 | 165 | -0.0549 | -19 |
| | Producción de glutamato* | Porcentaje** | Producción de glutamato* | Porcentaje** |
| MRC-5 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.0116 | 100 | -0.0398 | -335 |
| GlupH6.2 | 0.0174 | 150 | -0.0907 | -78 |
| LacpH7.2 | -0.581 | -50 | -0.0517 | -445 |
| LacpH6.2 | 0.0138 | 113 | -0.0471 | -406 |
| SKMES-1 | | | | |
| GlupH7.2 | 0.0794 | 100 | 0.0483 | 65 |
| GlupH6.2 | 0.0656 | 88 | 0.0416 | 55 |
| LacpH7.2 | 0.0739 | 99 | 0.0516 | 76 |
| LacpH6.2 | 0.0103 | 137 | 0.0375 | 50 |

* Velocidad de consumo en micromol/1, 000,000cels*h

**Respecto al control (Glu7.2N)

*** Se presentó muerte celular

La producción de glutamato fue menor en hipoxia

En MRC-5 se encontró que en hipoxia no se observa producción de glutamato.

En la línea SKMES-1 se encontró que solo bajo normoxia el medio con lactato a pH 6.2 era el único que incrementó la producción de glutamato mientras que el resto de las condiciones en normoxia e hipoxia disminuyeron la producción (Figura 22 y Tabla 4).

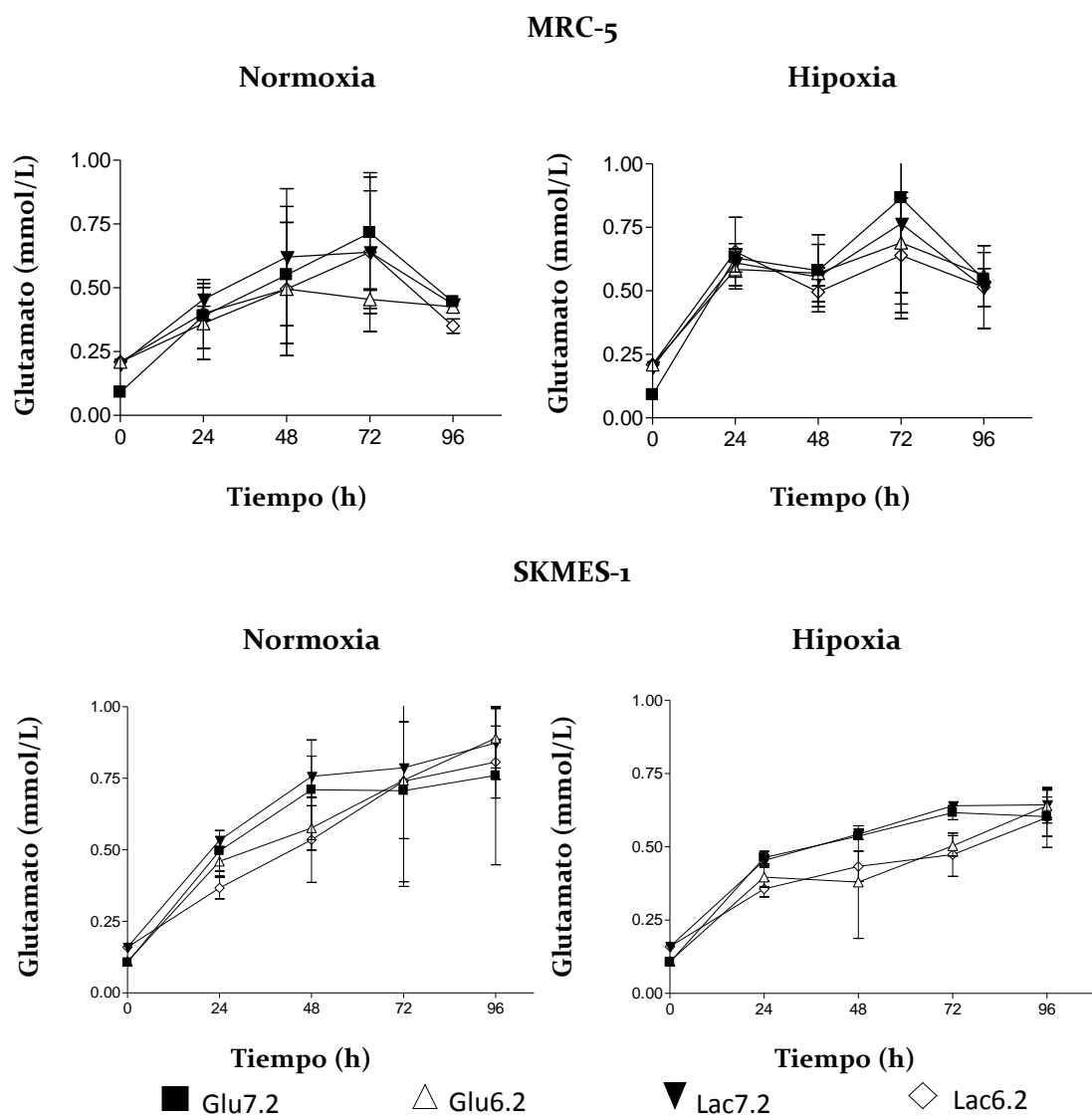


Figura 23.- Producción de glutamato de MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. Se muestra la desviación estándar (\pm) de una n=2 para MRC-5 y una n=3 para SKMES-1. Glucosa (Glu), Lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH 6.2 (6.2).

La masa mitocondrial disminuyó cuando las células se cultivaron con lactato e hipoxia

En este estudio se evaluó si la masa mitocondrial de los fibroblastos de pulmón MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 se modificaba de acuerdo a las condiciones de estrés metabólico. Para ello se empleó la tinción de Mitotracker Green con yoduro de propidio. El yoduro de propidio nos permitió discriminar a las células muertas de las viables (Figura 23).

De las células viables de cada condición se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (MFI) de Mitotracker Green. Se consideró a la MFI del control (Glu7.2N) como el 100 por ciento y se obtuvo el porcentaje correspondiente de cada condición respecto al control (Figura 24). Las células MRC-5 mostraron una baja viabilidad después de recolectarlas para su análisis por citometría de flujo en todas las condiciones, posiblemente debido a que el proceso de desprendimiento comprometió la membrana celular. No obstante, la mayor cantidad de células muertas se observó en la condición de lactato e hipoxia en ambas condiciones de pH.

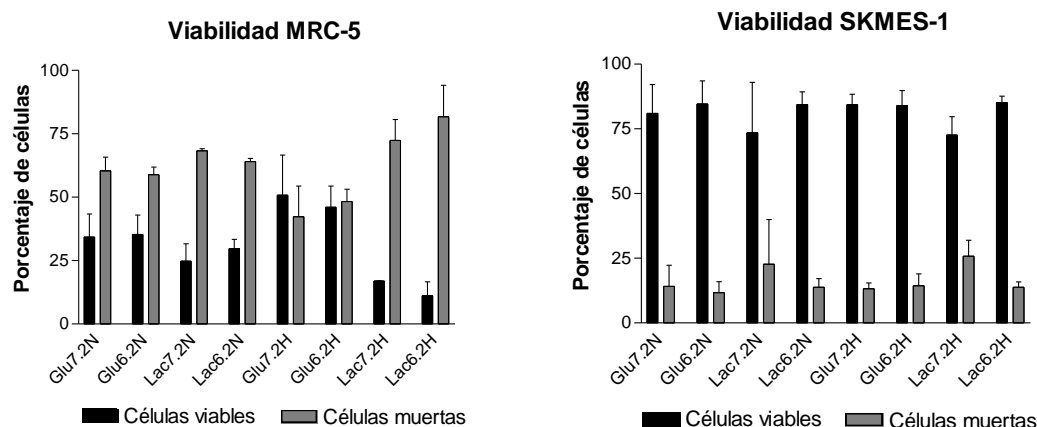


Figura 24.- Análisis de viabilidad por Tinción de Yoduro de Propidio. Porcentaje de células viables (yoduro de propidio negativas) y muertas (yoduro de propidio positivas) bajo diferentes condiciones de cultivo en las líneas MRC-5 y SKMES-1. En donde glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH (6.2). Normoxia (N) e Hipoxia (H).

Se encontró que, en las células MRC-5 tratadas bajo las diferentes condiciones la masa mitocondrial no disminuyó significativamente con respecto a la MFI del control (Glu7.2N). Aunque bajo condiciones de hipoxia se observó que la masa mitocondrial tiene una tendencia a disminuir, esta disminución no fue significativa (Figura 23).

En la línea SKMES-1 se encontró que bajo hipoxia la masa mitocondrial disminuyó con respecto al control, hubo diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$) en los medios con lactato.

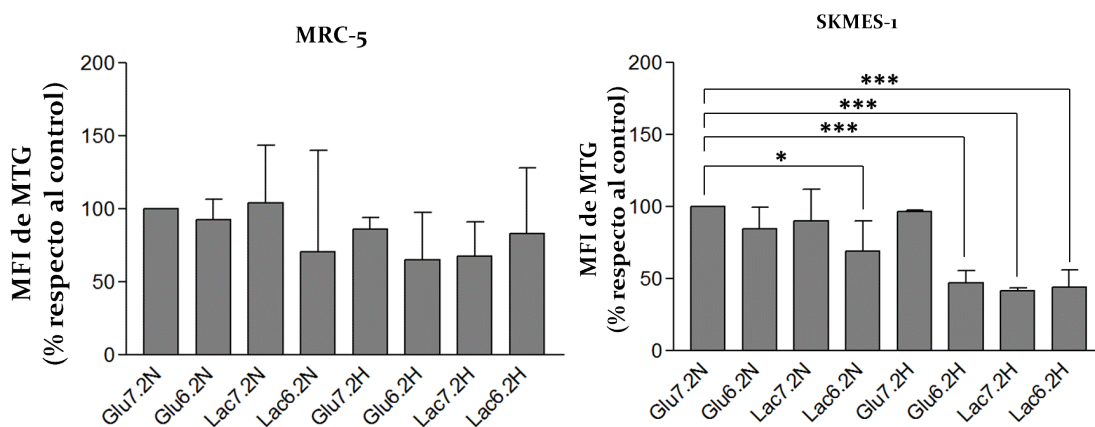


Figura 25.- Análisis de la masa mitocondrial en las células MRC-5 y SKMES-1 bajo diferentes condiciones de cultivo. Las barras representan el porcentaje de la MFI de Mitotracker Green de cada condición respecto al control. (* $p < 0.05$ vs Glu7.2N), (***) $p < 0.001$ vs Glu7.2N). En donde glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH (6.2). Normoxia (N) e Hipoxia (H).

La capacidad reductora celular incrementó en los medios con acidosis y lactato tanto en SKMES-1 como en MRC-5

La capacidad reductora celular se evaluó a través del ensayo con Alamar Blue(resorufina). De cada condición se obtuvo el número de células viables y la fluorescencia emitida por la resorufina reducida. Se realizó una relación entre la fluorescencia emitida de resorufina entre el número de células viables. La relación fluorescencia emitida/ células viables se refirió por cada 1,000 células.

En las células MRC-5 la capacidad reductora entre medios con la misma fuente de carbono y tensión de oxígeno mostró un incremento bajo acidosis, aunque esta tendencia no mostró diferencias significativas. Por el contrario, al comparar entre diferentes tensiones de oxígeno se encontró que la capacidad reductora incrementó

en los medios con lactato e hipoxia.

Con respecto a la línea SKMES-1, la capacidad reductora mostró un incremento significativo en las células cultivadas bajo normoxia a pH 6.2, la condición de hipoxia no mostró cambios con respecto a la contraparte de normoxia (Figura 25).

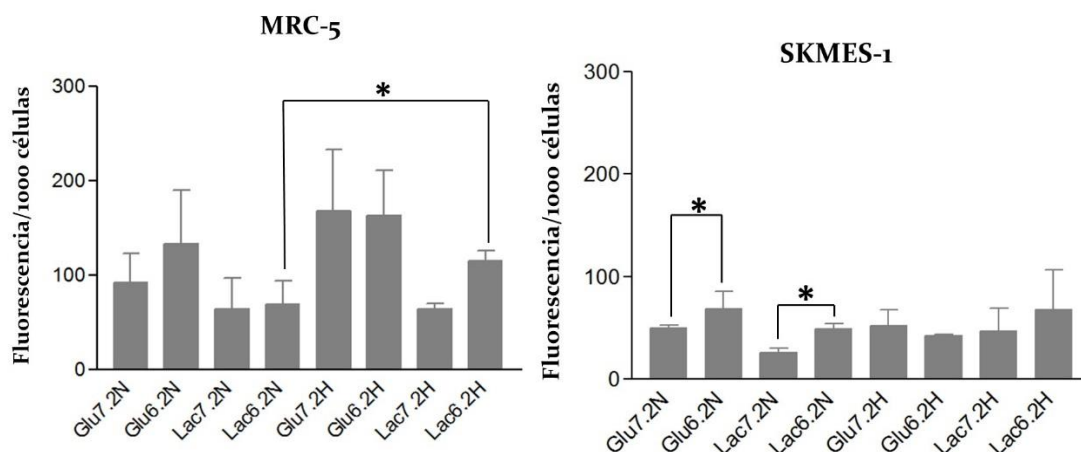


Figura 26.- Capacidad reductora celular bajo las diferentes condiciones de cultivo. La capacidad reductora se evaluó mediante el ensayo de Alamar blue. (* $p < 0.05$ vs la condición indicada). En donde glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH (6.2). Normoxia (N) e Hipoxia (H).

El potencial de membrana mitocondrial disminuyó en la línea celular SKMES-1

Debido a las variaciones presentadas en la masa mitocondrial fue importante evaluar si había un efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial, para ello se evaluó con la técnica de JC-1 los cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Como se mencionó en el apartado de materiales y métodos se añadió un disruptor de potencial de membrana mitocondrial (CCCP) como control. Como se puede apreciar en la figura 26, la emisión de JC-1 en Red disminuyó cuando las células fueron tratadas con CCCP, mientras que la emisión de JC-1 en Green es similar entre las dos condiciones.

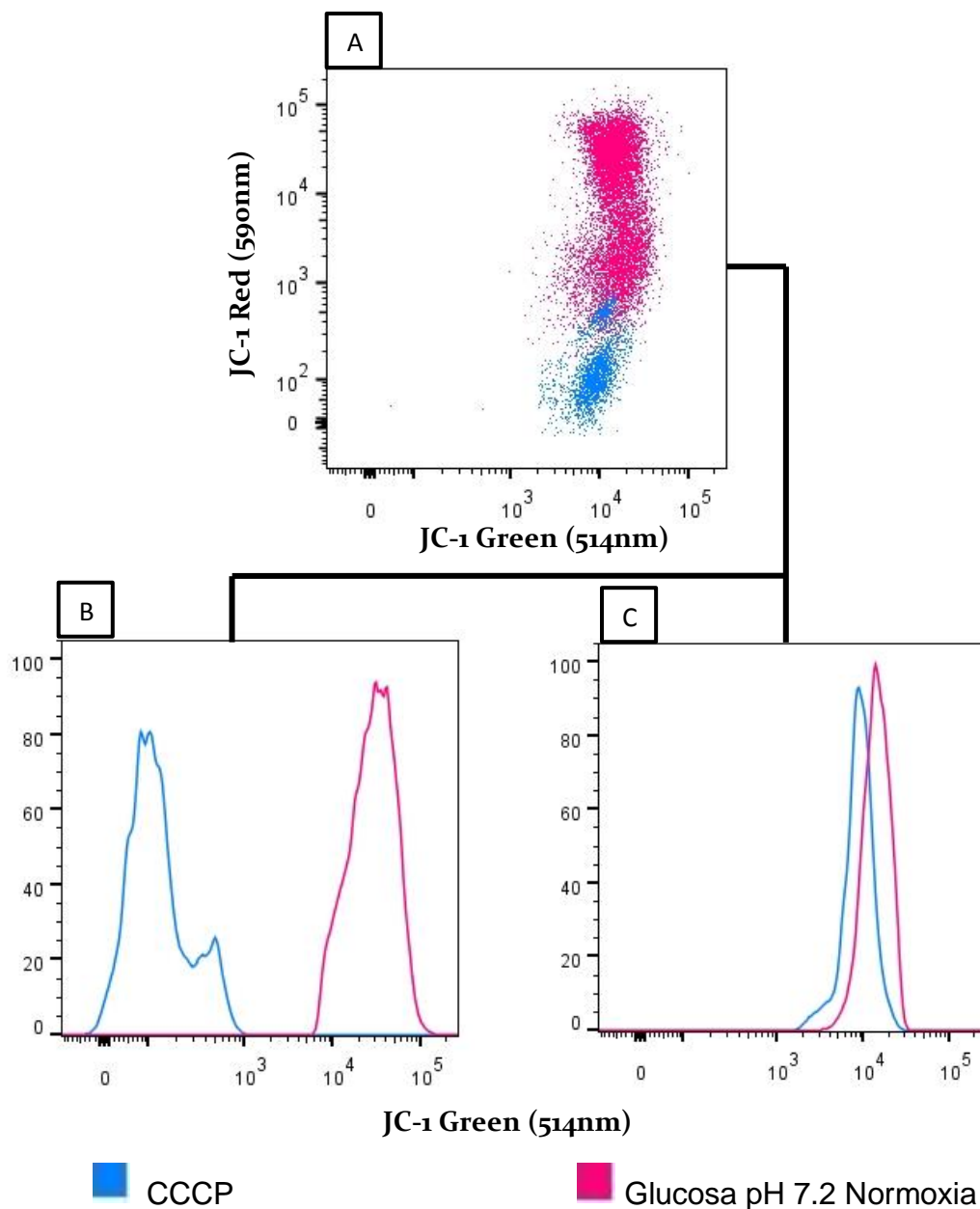


Figura 27.-Efecto del CCCP en el $\Delta\Psi_m$ de las células SKMES-1. A.-Se muestra la población de células viables en los parámetros de JC-1 Red/JC-1 Green. La población rosa corresponde a las células cultivadas en glucosa a pH 7.2 en normoxia mientras que la población en azul corresponde a las células tratadas con CCCP. De dichas poblaciones se obtuvieron los histogramas correspondientes a la longitud de onda roja (590nm), JC-1 red y verde (514nm), JC-1 green.

A la evaluación del potencial de membrana mitocondrial se acopló la técnica de Anexina V/7-AAD para discriminar a las células muertas de las viables, el porcentaje de células muertas, viables y en proceso apóptico se muestra en la Figura 27. Las células MRC-5 mostraron un menor porcentaje de células viables en las condiciones de lactato e hipoxia, concomitantemente con un incremento en el porcentaje de células en apoptosis tardía. Por el contrario, las células SKMES-1, mostraron un alto porcentaje de células viables en la mayoría de las condiciones. Estos resultados son semejantes a los obtenidos previamente (Figura 23).

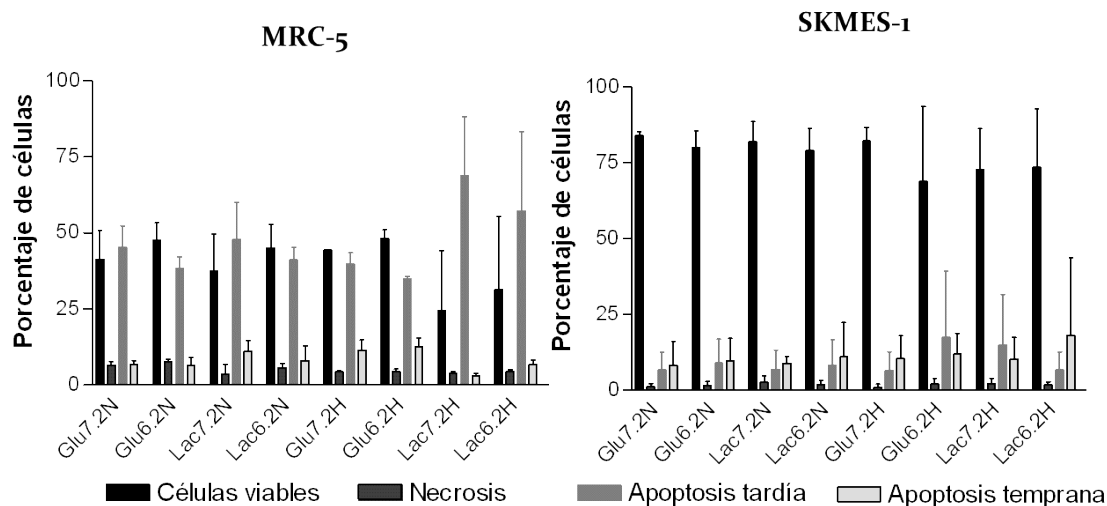


Figura 28.- Porcentaje de células viables, necróticas, apoptóticas tardías y tempranas para cada condición de cultivo de MRC-5 y SKMES-1.

Los resultados del potencial de membrana mitocondrial (cociente MFI_{590}/MFI_{514}) se muestran en la Figura 28. Se encontró que el potencial de membrana mitocondrial es diferente entre las células estudiadas, siendo mayor para los fibroblastos MRC-5 y menor para SKMES-1.

En las células MRC-5 no se encontraron diferencias significativas en el potencial de membrana mitocondrial, aunque se presentó una ligera disminución en los medios con lactato y pH 7.2 tanto en normoxia como en hipoxia (Figura 27).

En las células SKMES-1 se encontró un incremento significativo del potencial de membrana mitocondrial en la condición de Glucosa pH 6.2 e hipoxia con respecto al control (Glu7.2N) y las condiciones de Glu6.2N y Glu7.2H. Las células incubadas en medios con lactato mostraron un aumento ligero de su potencial de membrana mitocondrial, aunque no hubo diferencias significativas.

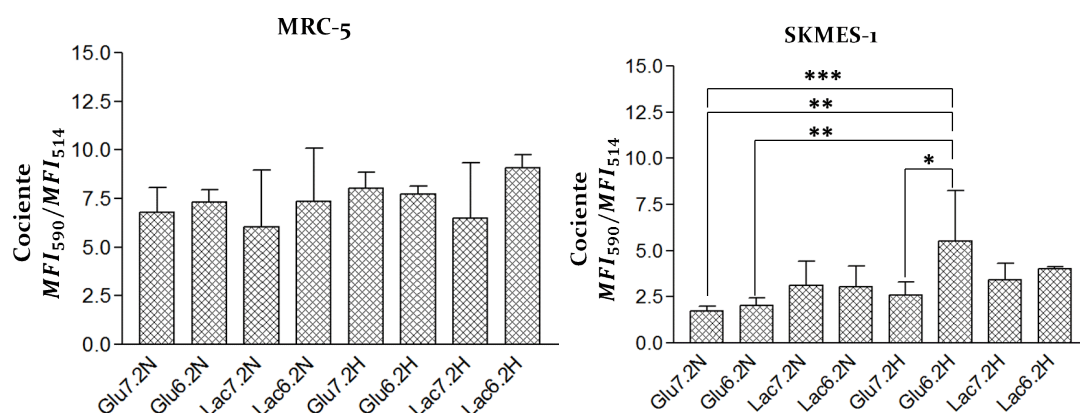


Figura 29.- Potencial de membrana mitocondrial bajo las diferentes condiciones de cultivo. Las barras representan el cociente obtenido de la MFI₅₉₀/MFI₅₁₄ de cada condición. (* p<0.05 vs las condiciones indicadas), (** p<0.01 vs las condiciones indicadas). En donde glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH (6.2). Normoxia (N) e Hipoxia (H).

En medios con lactato e hipoxia se incrementó la expresión de PDK-1 y HIF-1α

La expresión de HIF-1α y PDK-1 se evaluó en las diferentes condiciones de cultivo con el objetivo de analizar si su expresión se veía modificada entre las líneas celulares, condiciones de cultivo y si la expresión de dichas moléculas se correlacionaba con el aumento del consumo de glucosa. La expresión de HIF-1α y PDK-1 se evaluó a través de una inmunotinción doble, empleando el fluorocromo Zombie NIR para discriminar a las células viables de las muertas (al momento de la fijación).

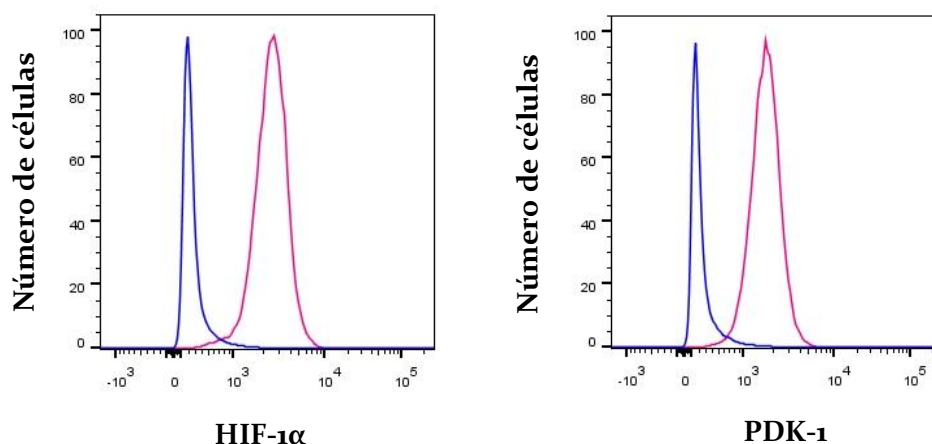


Figura 30.-Tinción intracelular de HIF-1 y PDK-1. Como control se emplearon células teñidas exclusivamente con anticuerpos secundarios (líneas azules), la tinción que emplea tanto anticuerpos primarios como secundarios se muestra en líneas rosas.

De las células viables se obtuvo la MFI de HIF-1 α y PDK-1. Se consideró a la MFI del control (Glu7.2N) como el 100 por ciento y se obtuvo el porcentaje correspondiente de cada condición respecto al control. Los resultados se muestran en la Figura 30.

En las células MRC-5 se encontró que la expresión de HIF-1 α no se modificó significativamente entre las diferentes condiciones de cultivo, aunque se observó que su expresión tendió a disminuir bajo condiciones de hipoxia. En SKMES-1 la expresión de HIF-1 α se incrementó en los medios con lactato tanto en normoxia como en hipoxia mientras que la expresión de PDK-1 se incrementó en todas las condiciones de cultivo con respecto al control.

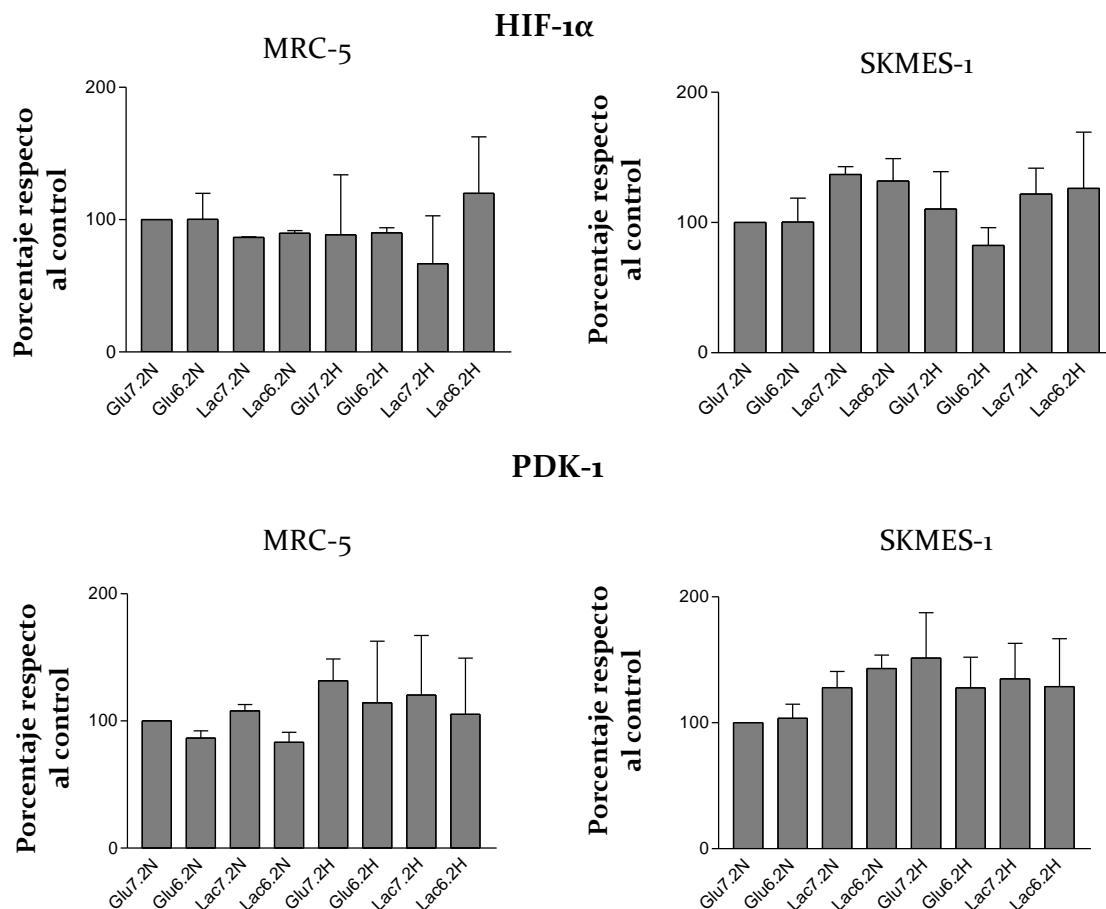


Figura 31.- Expresión de HIF-1α y PDK-1 en las líneas MRC-5 y SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. La MFI de Glu7.2N de cada marcador se consideró como la condición control. Se obtuvo el porcentaje de MFI de cada condición respecto al control. En donde glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH (6.2). Normoxia (N) e Hipoxia (H).

CD98 incrementó su expresión en SKMES-1 en los medios con lactato y pH 7.2

Se evaluó la expresión de los marcadores CD71, CD73 y CD98 involucrados en el metabolismo energético en las células SKMES-1. De las células se obtuvo la MFI correspondiente a cada marcador. Se consideró a la MFI del control (Glu7.2N) como el 100 por ciento y se obtuvo el porcentaje correspondiente de cada condición respecto al control, ver figura 31.

La expresión del transportador de aminoácidos CD98 fue similar entre las diferentes condiciones de cultivo, a excepción de los medios con lactato en la que MFI de CD98 se encontró incrementada tanto en normoxia como en hipoxia. Siendo en normoxia la única condición en la que la MFI fue significativamente mayor con

respecto al control (Glu7.2N). Por el contrario, la expresión de la ecto 5'-nucleotidasa CD73 mostró ser susceptible a las diferentes condiciones de cultivo. Se encontró que bajo normoxia, los medios con lactato incrementaron la expresión del marcador en comparación con los medios con glucosa. Dicha tendencia se vio disminuida cuando las células fueron cultivadas bajo hipoxia. Aún cuando se observan variaciones en la expresión del marcador no se encontraron diferencias significativas.

El receptor de transferrina CD71 modificó su expresión de acuerdo a las condiciones de cultivo y se encontró que éste tiene a disminuir cuando las células se cultivan bajo acidosis. Dicha tendencia se incrementó cuando las células se cultivaron bajo hipoxia. Las variaciones en la expresión del marcador CD71 no mostraron diferencias significativas.

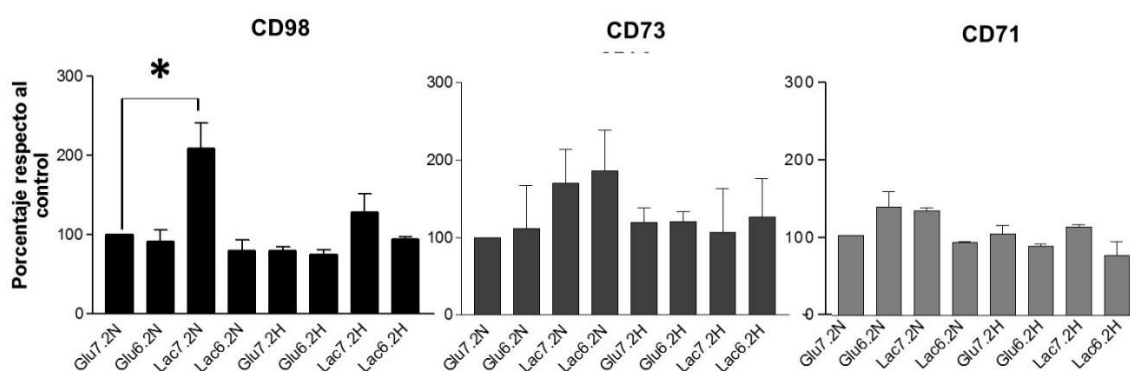


Figura 32.-Expresión de CD98, CD73 y CD71 en SKMES-1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. En las gráficas se muestra la MFI (*, $p < 0.05$ vs la condición indicada). Se consideró a glucosa 7.2 normoxia como la condición control y su MFI se consideró como el 100 por ciento, se obtuvo el porcentaje de MFI de cada condición respecto al control. En donde glucosa (Glu), lactato (Lac), pH 7.2 (7.2) y pH (6.2). Normoxia (N) e Hipoxia (H).

9. DISCUSIÓN

En el microambiente tumoral se pueden generar regiones en las que las concentraciones de glucosa, oxígeno y el pH extracelular fluctúan constantemente. En el presente estudio se evaluó el efecto de las diferentes condiciones del microambiente sobre el metabolismo y la proliferación celular tumoral.

En diferentes estudios se ha mencionado la elevada capacidad replicativa de las células tumorales en comparación con células no tumorales (Hannahn, 2011) (Villar, 2015). Al comparar la velocidad específica de crecimiento (μ) de las células MRC-5 y las células SKMES-1 encontramos que, las células tumorales SKMES-1 presentaron una mayor proliferación en relación con las células MRC-5. Marthandan y cols. evaluaron el crecimiento y la senescencia de las células MRC-5 a través de la expresión de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y el marcador de daño al DNA, γ H2A.X. Encontraron un incremento progresivo en la expresión de CDK's así como del marcador γ H2A.X. Proponen que la velocidad de crecimiento de las células MRC-5 se ve afectada por los diferentes daños acumulados en el DNA, ya que estos impiden la progresión en el ciclo celular. Por el contrario, la elevada capacidad replicativa de las células SKMES-1 no solo podría atribuirse a las diferentes mutaciones sufridas durante el proceso de tumorigenesis sino también a su capacidad de modular su metabolismo celular. Aun cuando la μ de las células SKMES-1 fue mayor para todas las condiciones de cultivo en relación con la μ de las células MRC-5, fue interesante observar que la μ de ambos tipos celulares varió al modificar las condiciones de cultivo (Figura 33).

Tanto las células MRC-5 como las células SKMES-1 disminuyeron su proliferación celular en condiciones de hipoxia (Figura 34). En diferentes estudios se ha observado que la hipoxia tiene un efecto variable de acuerdo al tipo celular estudiado (Marthandan, 2014). Diferentes reportes han mencionado que la hipoxia no inhibe el crecimiento de los fibroblastos, si no al parecer promueve su proliferación (Bradley, Ferencz). Igualmente nosotros encontramos que las células MRC-5 tienen la capacidad para proliferar en hipoxia, aunque éstas requirieron de

una fase de adaptación. Además, observamos que la acidosis fue un factor importante para la proliferación de las células MRC-5, ya que bajo condiciones de hipoxia y acidosis la μ de las células MRC-5 incrementó.

En células de cáncer de mama se observó que la acidosis fue un factor que promovió fenotipos más resistentes al aumentar la actividad mitocondrial, provocar arresto celular y restringir la biogénesis ribosomal (Gupta, 2014). Dai y cols. encontraron que las células de cáncer de mama de ratón (4T1) y humano (MCF-7) incrementaron su supervivencia del cuarto al quinceavo día cuando éstas eran cultivadas bajo acidosis láctica. Al comparar con nuestros resultados, observamos que la acidosis promovió la proliferación celular de las células SKMES-1 tanto en normoxia como en hipoxia, pero fue la combinación de acidosis láctica la que al parecer favoreció el desarrollo y supervivencia bajo hipoxia (Figura 36).

En hipoxia, las células MRC-5 y las células SKMES-1 proliferaron al incrementar su metabolismo glicolítico con un subsecuente incremento en la producción de lactato (Figura 34). Las diferencias en el consumo de glucosa pueden estar asociadas al tipo celular, debido a que las células tumorales poseen un mayor potencial replicativo, por ende, los requerimientos energéticos para sintetizar lípidos, proteínas y DNA son mayores que en células no tumorales (Lemons, 2014). Existen múltiples estudios que hablan sobre la reprogramación metabólica de las células tumorales. Las células SKMES-1 fueron capaces de modular su metabolismo y reestructurarlo de acuerdo a las variaciones de cultivo. Igualmente existen reportes en los que se menciona que los fibroblastos son capaces de reestructurar su metabolismo y mantener un flujo glicolítico elevado (Lemons, 2010; Marthandan, 2014). Lemons y cols. evaluaron las diferencias en el consumo de glucosa y glutamina entre fibroblastos de piel en proliferación y fibroblastos inducidos a la quiescencia por inhibición por contacto a través de isotopos marcados de [U- ^{13}C]-glucosa y [U- ^{13}C]-glutamina. En dicho reporte se menciona que los fibroblastos fueron capaces de mantener un elevado flujo glicolítico así como de incorporar carbonos provenientes de la glutaminólisis al flujo del ciclo de Krebs. Concluyeron que los fibroblastos capaces de proliferar empleaban extensivamente a la glucólisis

y la vía de las pentosas fosfato para producir nucleótidos y NADPH con fines biosintéticos mientras que los fibroblastos quiescentes empleaban su actividad metabólica en la síntesis de ácidos grasos y antioxidantes, anteponiendo su integridad celular sobre la proliferación celular. Marthandan y cols. proponen que, cuando las células MRC-5 son incapaces de completar sus procesos de reparación, las células se vuelven senescentes, provocando que solo una parte de la población sea activa proliferativamente. Al conjuntar dichos estudios con nuestros resultados podemos proponer que las células MRC-5 podrían mantener un elevado consumo de glucosa para la síntesis de nuevas células. Sin embargo, al estar expuestas a las diferentes condiciones que recrean el microambiente tumoral se acumulan daños que no les permiten dividirse por lo que es necesario redirigir la energía metabólica hacia la reparación y autopreservación.

Se ha demostrado que diferentes líneas celulares tumorales pueden utilizar al lactato como un sustrato alternativo para sobrevivir a la heterogeneidad del microambiente tumoral (Phipps, 2014; Silva, 2012; Van, 2017). Nosotros encontramos que tanto las células MRC-5 así como las células SKMES-1 presentaron un incremento progresivo en las concentraciones de lactato en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 35). Dichos resultados muestran que ambos tipos celulares no consumen el lactato y por tanto no emplean el mecanismo propuesto por la teoría de la simbiosis metabólica, por lo que es posible que empleen vías alternativas para sostener su metabolismo y permitir una proliferación celular sostenida.

Al evaluar la expresión de moléculas de respuesta a hipoxia y a los marcadores de metabolismo encontramos que las diferencias metabólicas entre las células MRC-5 y las células SKMES-1 pueden estar asociadas con la expresión de éstos.

En este estudio encontramos que las células SKMES-1 cultivadas bajo acidosis láctica incrementaron la expresión de las moléculas HIF-1 α y PDK-1 en comparación con las otras condiciones de cultivo. Estos resultados son interesantes ya que sugieren que la expresión de HIF-1 α en las células tumorales SKMES-1 no parece estar asociada a una disminución en la tensión de oxígeno, sino a la

presencia de ácido láctico en los cultivos. Nuestros resultados concuerdan con diferentes estudios en los que se ha postulado que el lactato sirve como estabilizador de HIF-1 α bajo normoxia (Doherty, 2013; De Saedeleer, 2012). Se ha mencionado que dicha adaptación celular no solo incrementa el metabolismo glicolítico, sino al parecer ayuda a modular los cambios en las concentraciones de amonio y el pH generados por la glutaminólisis (Kapler, 2012), que muestra la capacidad tumorigénica que posee el lactato. Las células SKMES-1 podrían estar estabilizando a HIF-1 α a través del lactato, lo cual ayudaría a las células a adaptarse a las condiciones de cultivo a través de la expresión de diferentes moléculas transportadoras y enzimas, entre las que se incluyen CD71, CD73 y CD98 de los cuales HIF-1 es un regulador positivo (Prior, 2014; Tak, 2016; Yoshioka, 2012)(Figura 35).

Nosotros encontramos una tendencia a incrementarse la expresión de los marcadores CD73 y CD98 cuando las células SKMES-1 fueron cultivadas en medio con lactato, aún cuando estos resultados no fueron significativos sugieren que la molécula HIF-1 α no solo se encuentra estabilizada si no que al parecer es capaz de inducir la expresión de CD73 y CD98.

Un estudio con líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar A-549 y de carcinoma epidermoide Calu-1 mostró que la expresión del transportador de aminoácidos CD98 no solo es variable entre los diferentes tipos celulares, si no al parecer está asociada con la falta de glucosa en los medios de cultivo (Valencia, 2013). Por otra parte, la expresión de CD98 se ha asociado con la activación de la vía mTOR a través del intercambio de aminoácidos esenciales por glutamina (Cantor, 2010). También encontramos que en las células SKMES-1 cultivadas con lactato se incrementó tanto la expresión de CD98 como el consumo de glutamina. Lo que sugiere que las células SKMES-1 sobreviven cuando el lactato es la principal fuente de carbono, a través del catabolismo de aminoácidos, dicha adaptación no solo les permitiría mantener su metabolismo sino a su vez impulsaría la proliferación celular a través de la vía mTOR.

Aun cuando la expresión de los marcadores de metabolismo se encuentra estrechamente asociada con el factor HIF-1, encontramos que la expresión del receptor de transferrina CD71 y la 5'-ecto nucleotidasa CD73 no se modificó significativamente. Lo cual indicó que ninguno de los marcadores fue susceptible a los cambios en las condiciones de cultivo.

Por otro lado, estudios realizados en líneas celulares de glioblastoma se encontró que las células tumorales disminuyeron su masa mitocondrial de acuerdo a la tensión de oxígeno (Travis, 2011; Valencia, 2013). Del mismo modo, nosotros encontramos una disminución de la masa mitocondrial tanto en las células MRC-5 así como en las células SKMES-1 cuando las células fueron cultivadas en condiciones de hipoxia y lactato. En condiciones de hipoxia y lactato ambos tipos celulares fueron metabólicamente menos activos, debido a la falta de sustratos oxidables y del último aceptor de electrones. Estas condiciones provocaron una menor actividad de la cadena transportadora de electrones, así como una menor síntesis de las proteínas que participan en ella, lo cual llevo a una disminución de la masa mitocondrial.

Una disminución de la masa mitocondrial tiene como consecuencia directa variaciones tanto en el potencial de membrana mitocondrial($\Delta\Psi_M$), así como en la capacidad reductora celular. Nosotros encontramos que en células SKMES-1 tanto la capacidad reductora celular, así como el potencial de membrana mitocondrial se modificaron de acuerdo a la masa mitocondrial.

En células de adenocarcinoma pulmonar A-549, la disminución en la masa mitocondrial se asoció con un incrementó en la capacidad reductora celular, como consecuencia de una menor oxidación del NADH (Valencia, 2013). Igualmente nosotros encontramos que las células SKMES-1 incrementaron su capacidad reductora celular como consecuencia de la disminución de la masa mitocondrial bajo acidosis e hipoxia. La acidosis no solo se ha asociado con fenotipos más resistentes si no también se ha encontrado que promueve la generación de NADPH a través de la producción de lactato (Dai,2013; Gillies,2013). En células de cáncer de mama MCF-7, la acidosis se ha asociado con un incremento en la tasa de consumo de

glutamina (Lemons,2010). Ambos estudios sugieren que la acidosis puede promover la acumulación del poder reductor.

Aun cuando no encontramos diferencias significativas en la masa mitocondrial de las células MRC-5, estas células presentaron éstas presentan la tendencia a modular su capacidad reductora celular en función de las variaciones de la masa mitocondrial.

Por otro lado, encontramos que las células MRC-5 presentaron un mayor poder reductor que las células SKMES-1. Lemons y cols. encontraron que, en fibroblastos de piel se incrementó la generación de NADPH bajo condiciones de estrés celular, dicho incremento se asoció con la producción de glutatión para controlar a los radicales libres del medio. El incremento en las concentraciones de NADPH como respuesta al estrés celular podría explicar el elevado poder reductor presentado por las células MRC-5.

Existen diferentes reportes en los cuales se menciona que las células tumorales presentan un elevado potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_M \approx -220\text{mV}$) en relación a las células no tumorales ($\Delta\Psi_M \approx -140\text{mV}$) (Forrest, 2015 ; Chen,1988). Nuestros resultados difieren, ya que las células MRC-5 presentaron un mayor $\Delta\Psi_M$ que las células SKMES-1. Cabe resaltar que la mayoría de los reportes sobre el $\Delta\Psi_M$ en células no tumorales hacen referencia a células no proliferativas. Goldstein y cols. reportaron que fibroblastos de piel en fase exponencial presentaron una mayor fluorescencia del Rh123 en comparación con la fase de confluencia (Chen, 1988). Mientras que linfocitos incrementaron de 5 a 15 veces la fluorescencia de Rh123 cuando fueron estimulados con fitohematoglutina (PHA). Por otro lado, Darzynkiewicz y cols. reportaron que el $\Delta\Psi_M$ de células de cáncer de ovario de hámster chino (CHO), disminuyó la fluorescencia de Rh123 entre un 30 a 45% al comparar la fase de confluencia con la fase exponencial (Chen, 1988). En conjunto dichos estudios nos mencionan que las células proliferativas presentan un $\Delta\Psi_M$ mayor y que dicho potencial estará en función de la fase de crecimiento en la cual se encuentre la célula. El $\Delta\Psi_M$ de las células MRC-5 podría encontrarse elevado debido a que los estudios fueron realizados durante la fase exponencial de

crecimiento. Aún faltan elucidar los mecanismos intrínsecos que afectan el $\Delta\Psi_M$ de MRC-5, que les otorga la capacidad de hiperpolarizarse a un nivel mayor que el de las células tumorales.

Por otra parte, encontramos que el $\Delta\Psi_M$ de las células SKMES-1 se incrementó bajo hipoxia y acidosis, es posible que las células SKMES-1 empleen la función reversa de la ATP sintasa para mantener estable el $\Delta\Psi_M$, en ausencia del último aceptor de electrones. Houston y cols. han asociado las variaciones en el $\Delta\Psi_M$ de células de cáncer de colon SW480 a fenotipos más resistentes a agentes quimioterapéuticos, por lo que es posible que las células SKMES-1 exhiban un patrón similar.

Nuestros resultados muestran que en respuesta a las variaciones en el medio de cultivo las células SKMES-1 son capaces de reestructurar su metabolismo. Dicha adaptación no solo fue esencial para el crecimiento y proliferación celular de las células si no que muestra que las mitocondrias de SKMES-1 son funcionales, debido a que parte esencial del metabolismo celular biosintético involucra la participación activa de las mitocondrias. La capacidad de las células SKMES-1 de adaptarse a las diferentes condiciones de cultivo e incorporar a la glutamina a su metabolismo oxidativo en hipoxia parece ser una parte esencial que distingue a las células SKMES-1 de las células MRC-5. Por otro lado, es necesario realizar estudios que eluciden las diferencias entre el metabolismo de células no proliferativas y proliferativas ya que los mecanismos de control de ambos tipos de células pueden ser claves en el desarrollo y la progresión tumoral.

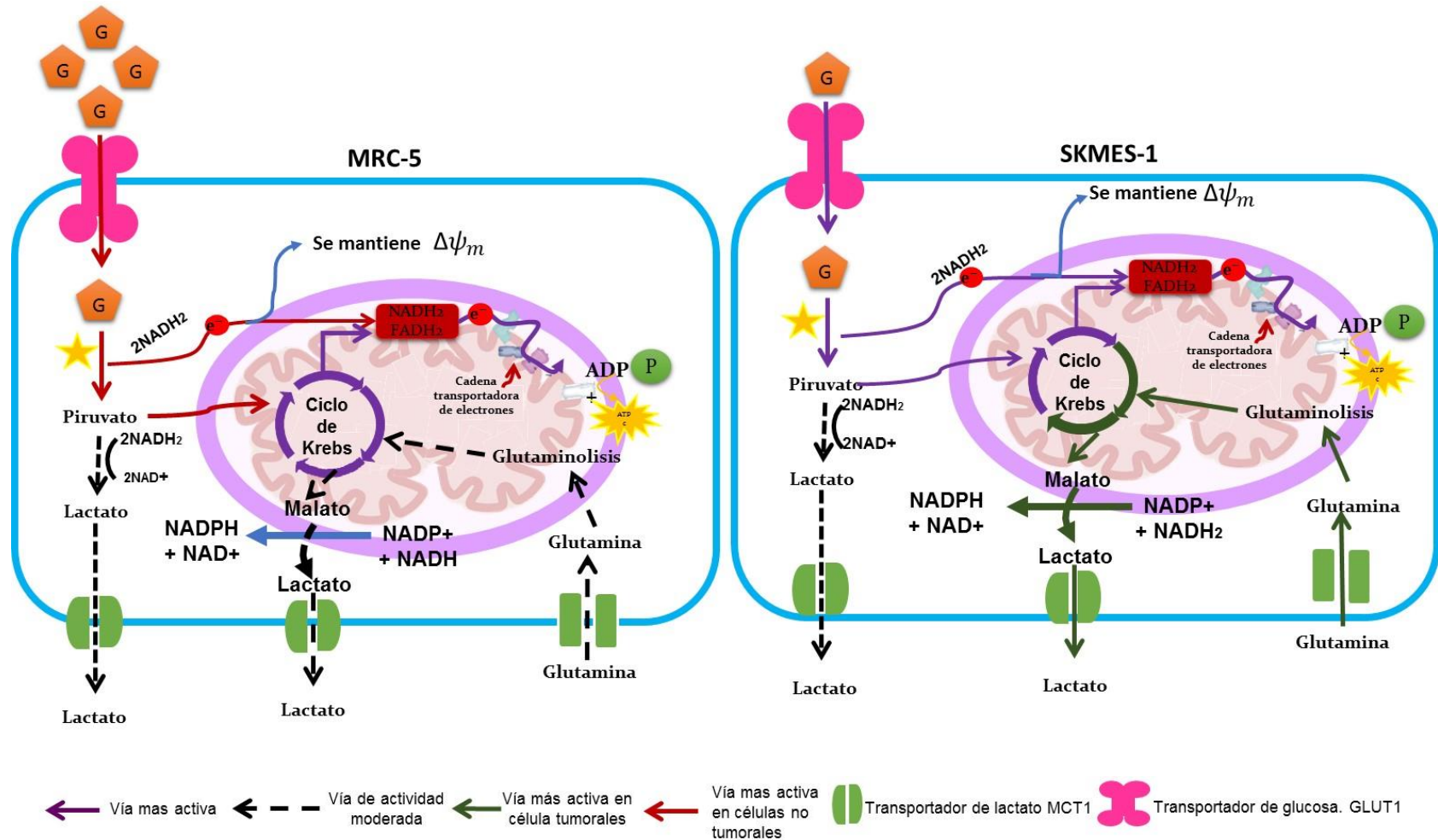


Figura 33.- Fenotipo metabólico propuesto para los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 cultivadas en medio con glucosa y normoxia.

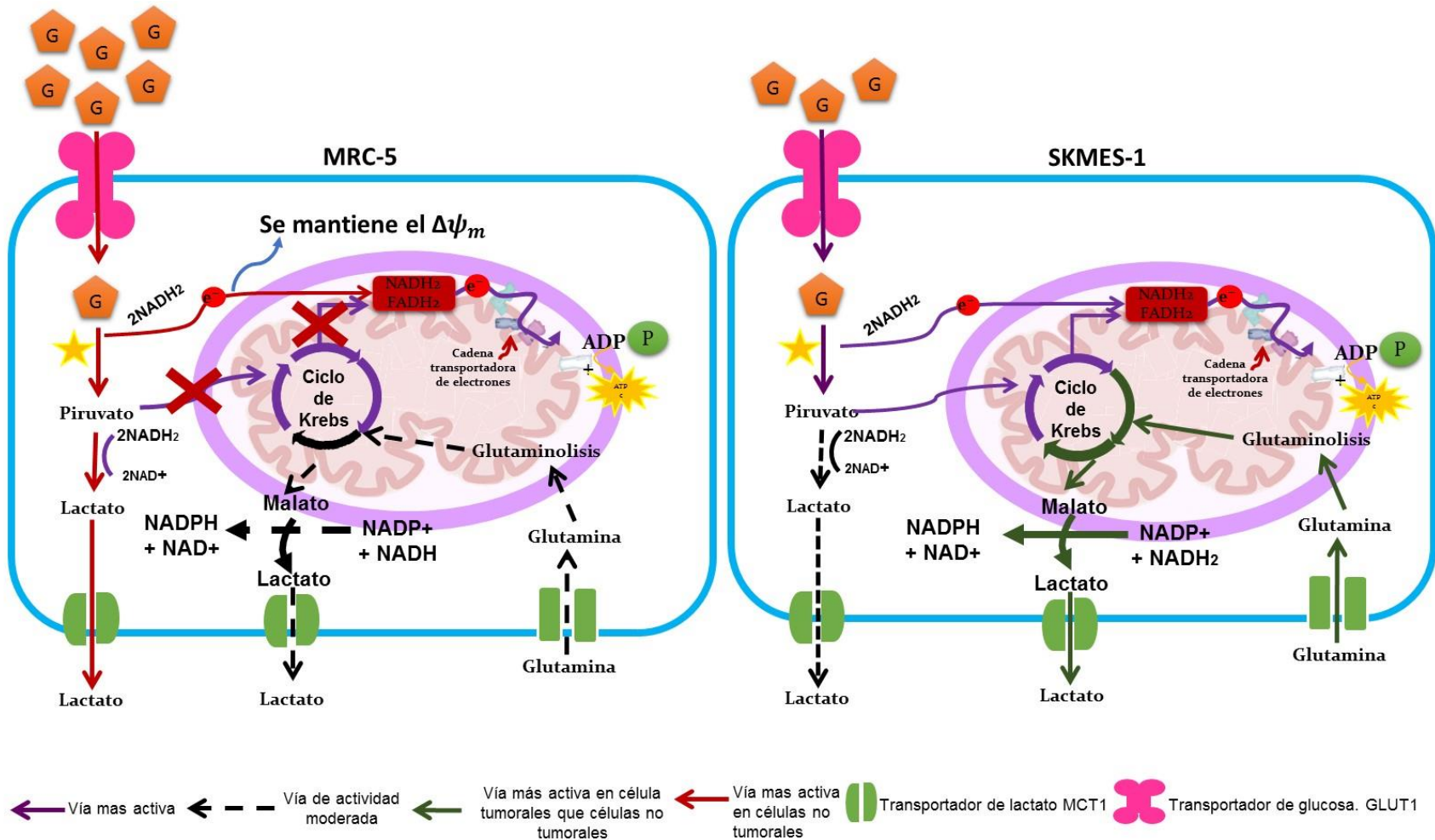


Figura 34.- Fenotipo metabólico propuesto para los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 cultivadas en medio con glucosa e hipoxia.

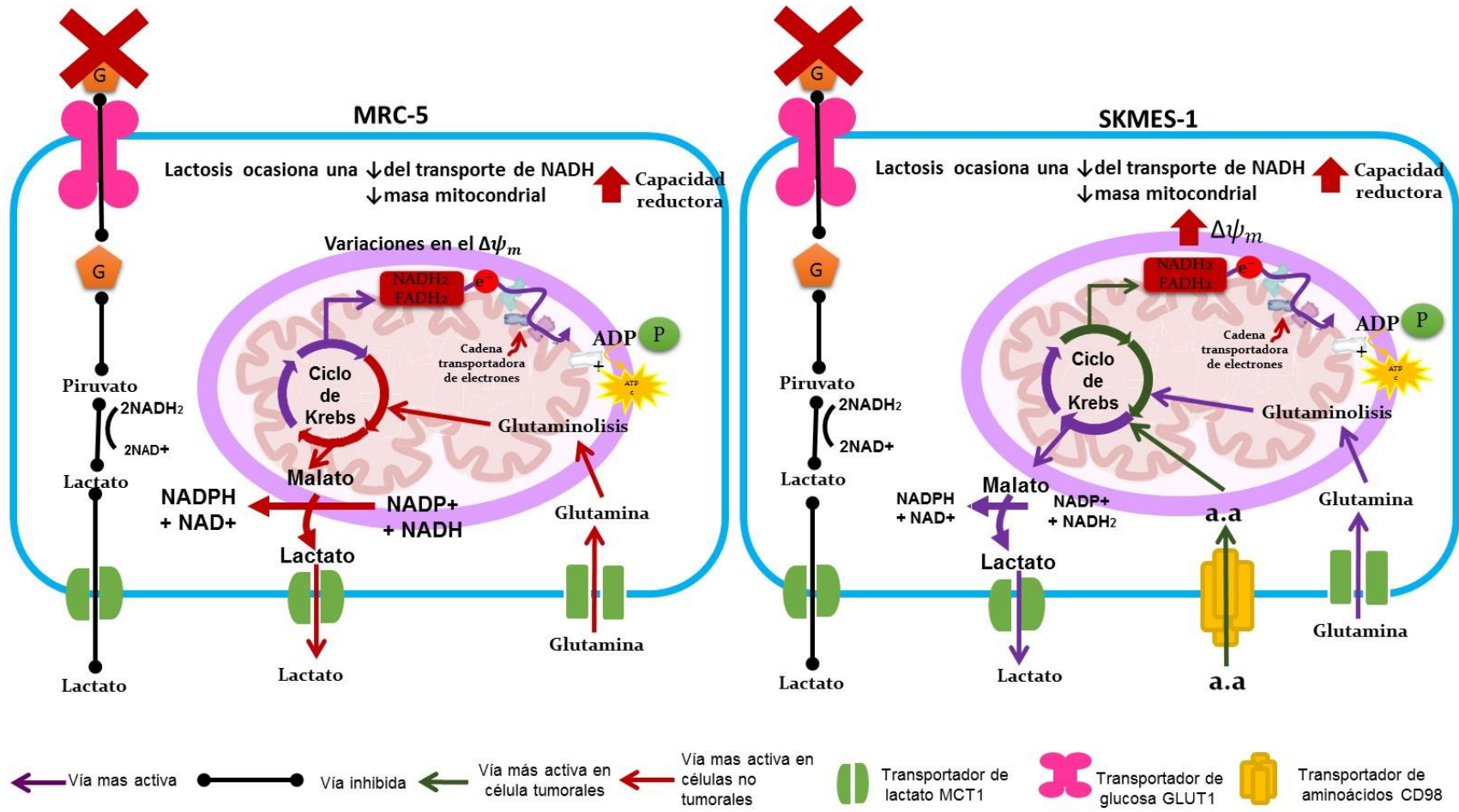


Figura 35.-Fenotipo metabólico propuesto para los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 cultivados bajo acidosis láctica y normoxia.

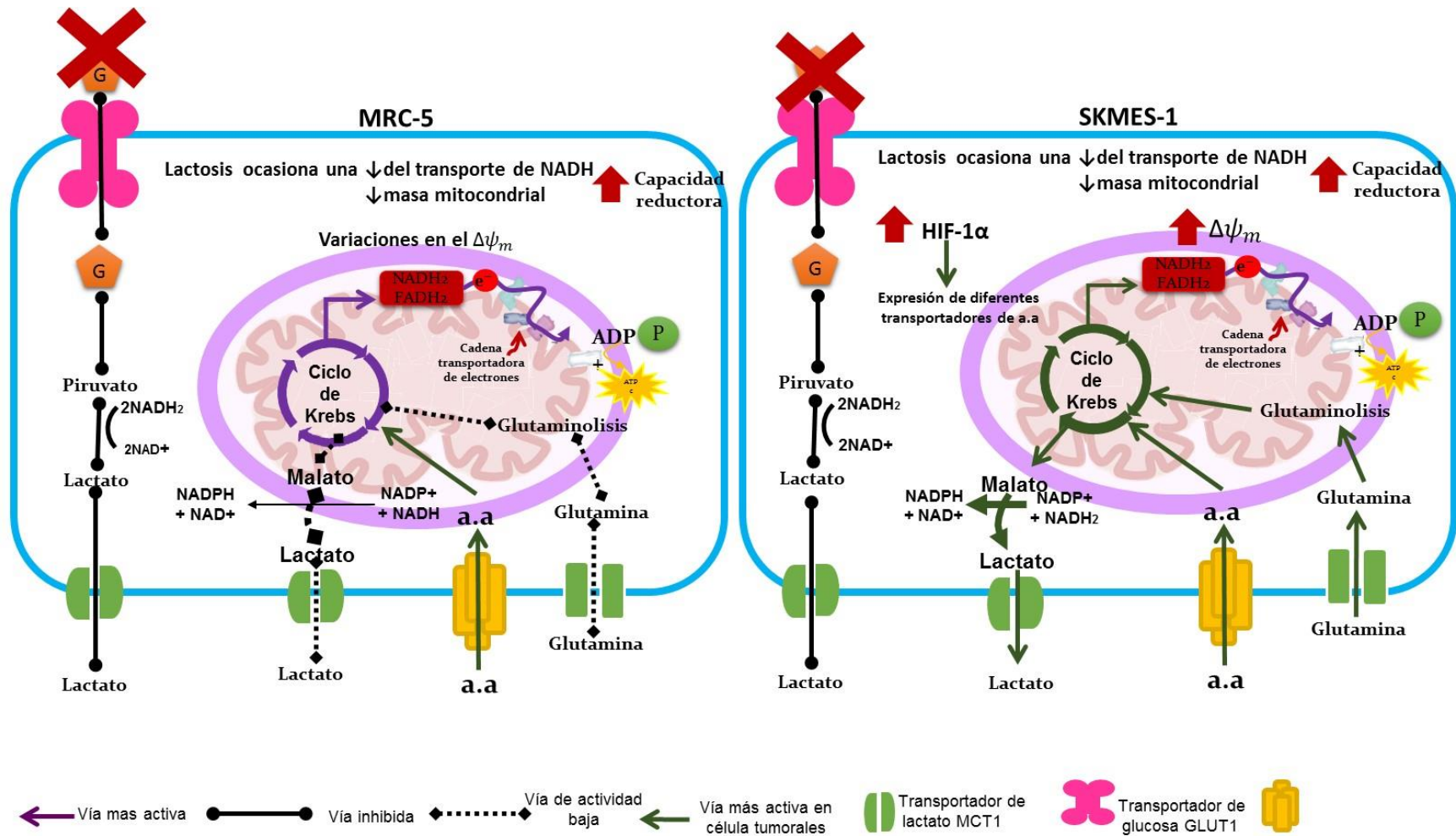


Figura 36.-Fenotipo metabólico propuesto para los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SKMES-1 cultivados bajo acidosis láctica e hipoxia.

10. CONCLUSIONES

El metabolismo energético varió entre las células MRC-5 y las células SKMES-1. El incremento progresivo en las concentraciones de lactato sugirió que las células MRC-5 y las células SKMES-1 emplearon vías alternas para su crecimiento y proliferación. Las células SKMES-1 sobrevivieron a la acidosis láctica a través de la expresión del transportador de aminoácidos CD98. Cuando las células SKMES-1 fueron cultivadas bajo hipoxia y/o en ausencia de glucosa, incorporaron a la glutamina para mantener un flujo constante de intermediarios del ciclo de Krebs. Bajo hipoxia las células MRC-5 fueron incapaces de consumir a la glutamina, al parecer esta característica, es una parte esencial que podría ser necesaria para la proliferación celular, y que distinguió a las células MRC-5 de las células SKMES-1. La proliferación celular de las células MRC-5 y SKMES-1 cultivadas con lactato e hipoxia se incrementó cuando las células fueron cultivadas en acidosis. Al disminuir la tensión de oxígeno la masa mitocondrial de las células SKMES-1 disminuyó ocasionando que la capacidad reductora celular se acumulará y el potencial de membrana mitocondrial se modulará. En conjunto estos resultados sugieren que las células SKMES-1 poseen mitocondrias funcionales, que participaron activamente en el metabolismo y permitieron a las células tumorales sobrevivir al estrés metabólico.

11. APÉNDICE

Curva de crecimiento de un microorganismo.

Representa el crecimiento de un microorganismo a través del tiempo. Con base en ella, se determina cuando se produce la mayor cantidad de biomasa o metabolitos (primarios o secundarios). Se divide en 4 fases:

- **Fase de latencia (fase lag):** Comprende el periodo de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo. Su duración depende del estado fisiológico de la célula.
- **Fase logarítmica o exponencial:** Las células se multiplican a la máxima velocidad y su crecimiento puede ser medido con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo. La velocidad de crecimiento en esta fase es constante. La fase logarítmica termina cuando los nutrientes del medio se agotan.
- **Fase estacionaria:** La velocidad de crecimiento (reproducción) es igual a la velocidad de muerte y se llega a un equilibrio celular.
- **Fase de muerte:** Esta fase inicia cuando los nutrientes del medio no son suficientes para la reproducción.

En 1950, Jacques Monod propuso una serie de ecuaciones que permiten calcular algunos parámetros cinéticos específicos. Algunos de ellos son: velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación y velocidad específica de consumo entre otros. Los parámetros evaluados en esta tesis son:

- **Velocidad específica de crecimiento:** es la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y se expresa en h^{-1} .
- **Tiempo de duplicación (t_d):** es el tiempo necesario (en minutos) para que las células se dupliquen.

Estimación de la velocidad específica de crecimiento.

La velocidad de crecimiento específica fue calculada con la ayuda del software GraphPad Prism 3.0 graficando el logaritmo de la biomasa vs el tiempo (h). La velocidad específica de crecimiento se obtuvo durante la fase de crecimiento exponencial mediante cálculo por regresión no lineal, utilizando la ecuación de

crecimiento exponencial por el método de mínimos cuadrados obteniéndose en todos los casos analizados correlaciones mayores a 0.95.

Calculo de rendimientos y velocidades de consumo de glucosa y glutamina y formación de productos.

Los rendimientos $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ y $Y_{P/X}$ durante la fase de crecimiento exponencial fueron calculados de la siguiente manera:

X_{MAX} = Biomasa producida durante la fase de crecimiento exponencial.

$$Y_{X/S} = \frac{g \text{ de Biomasa producida}(X_{MAX})}{g \text{ de azúcar consumida}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{g \text{ de Producto}}{g \text{ de azúcar consumida}}$$

$$Y_{P/X} = \frac{g \text{ de Producto}}{g \text{ de Biomasa}(X_{MAX})}$$

Calculo de la velocidad específica de consumo de glucosa y de producción de L-Lactato.

La velocidad específica de consumo de glucosa y de producción de lactato fueron calculadas para las dos fases de los cultivos: la fase exponencial y la estacionaria.

Para la fase exponencial se calculó de la siguiente manera:

$$q_P = \frac{Y_P}{\bar{X}} * \mu$$

12. REFERENCIAS

ACS 2015: <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-smallcell/detailedguide/small-cell-lung-cancer-what-is-small-cell-lung-cancer>

Adihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol.* 2003 Jan; 88(1):99-107.

Alberts B (2006) *Introducción a la biología molecular. Segunda edición.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pág. 236

Allard B, Turcotte M, Stagg J.(2012) CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *JBiomed Biotechnol.* 2012; 2012:485156. doi: 10.1155/2012/485156. Epub 2012 Oct 16.

Ameri K, Burke B, Lewis CE, and Harris, AL. (2002). Regulation of a rat VL30 element in human breast cancer cells in hypoxia and anoxia: role of HIF-1. *Br J Cancer.* 2002 Nov 4; 87(10): 1173–1181. Published online 2002 Nov 4. doi: 10.1038/sj.bjc.6600576. PMID: PMC2376195

Arias J., Aller MA., Arias JI y Lorente, L. (1999). *Fisiopatología Quirúrgica: Traumatismos, Infecciones, Tumores.* Editorial Tébar. pág. 79-81.

Bellance N, Benard G, Furt F, Begueret H, Smolková K, Passerieux E, Delage JP, Baste JM, Moreau P, Rossignol R. (2009). Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Dec; 41(12):2566-77. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.012. Epub 2009 Aug 25.

Bouzier AK, Voisin P, Goodwin R, Canioni P, Merle M. (1998). Glucose and lactate metabolism in C6 glioma cells: evidence for the preferential utilization of lactate for cell oxidative metabolism. *Dev Neurosci.* 1998; 20(4-5):331-8.

Bouzier-Sore AK, Canioni P, Merle M. (2001). Effect of exogenous lactate on rat glioma metabolism. *J Neurosci Res.* 2001 Sep 15; 65(6):543-8.

Cámara Y (2005) Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno. Facultad de Biología. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Barcelona 2005. Pág. 3-19.

Camp ER, Wang C, Little EC, Watson PM, Pirolo KF, Rait A, Cole DJ, Chang EH, Watson DK. (2013). Transferrin receptor targeting nanomedicine delivering wild-type p53 gene sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine therapy. *Cancer Gene Ther.* 2013 Apr; 20(4):222-8. doi: 10.1038/cgt.2013.9. Epub 2013 Mar 8.

Campbell, N (2007) *Biología.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pág. 160-180, 459

Chan BA and Coward IG. (2013). Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013 Oct; 5(Suppl 5): S565–S578. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.07.43 PMID: PMC3804877

Cantor JM, Ginsberg MH.(2012). CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. *J Cell Sci.* 2012 Mar 15; 125(6): 1373–1382.

Chen LB.(1988). Mitochondrial membrane potential in living cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1988. 4:155-81

Curry JM, Tuluc M, Whitaker-Menezes D, Ames JA, Anantharaman A, Butera A, Leiby B, Cognetti DM, Sotgia F, Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE.(2013) Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell Cycle.* 2013 May 1;12(9):1371-84. doi: 10.4161/cc.24092. Epub 2013 Apr 10.

Curry JM, Tuluc M, Whitaker-Menezes D, Ames JA., Anantharaman A, Butera A, Leiby B, Cognetti DM., Sotgia F, Lisanti MP. and Martinez-Outschoorn UE.(2013) MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell Cycle.* 2013 May 1; 12(9): 1371–1384. Published online 2013 Apr 10. doi: 10.4161/cc.24092. PMID: PMC3674065

Curtis, H (2008) *Biología. Séptima edición.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pág. 94-100

- Dai C, Feifei Sun, Chunpeng Zhu,1 and Xun Hu.(2013) Tumor Environmental Factors Glucose Deprivation and Lactic Acidosis Induce Mitotic Chromosomal Instability – An Implication in Aneuploid Human Tumors. PLoS One. 2013; 8(5): e63054. Published online 2013 May 10. doi: 10.1371/journal.pone.0063054. PMID: PMC3651256.
- De Saedeleer CJ., Copetti T, Porporato PE., Verrax J, Feron O, and Sonveaux P. (2012). Lactate Activates HIF-1 in Oxidative but Not in Warburg-Phenotype Human Tumor Cells. PLoS One. 2012; 7(10): e46571. Published online 2012 Oct 17. doi: 10.1371/journal.pone.0046571. PMID: PMC3474765
- Devlin, T (2006) Bioquímica. Cuarta edición. Editorial Reverté. España. Pág. 577-590
- Díaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. (2010). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. Biochim Biophys Acta. 2011 Jun; 1807(6):568-76. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010. Epub 2010 Sep 8.
- Doherty JR, Cleveland JL.(2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. J Clin Invest. 2013 Sep; 123(9):3685-92. doi: 10.1172/JCI69741. Epub 2013 Sep 3.
- Epstein T, Xu L, Gillies RJ, Gatenby RA. (2014). Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. Cancer Metab. 2014 Jun 5; 2:7. doi: 10.1186/2049-3002-2-7. eCollection 2014.
- Faduchi E, Blasco I, Romero CS, Yañez E (2010) Bioquímica:conceptos esenciales. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Pag. 197-207
- Fan Teresa WM, Lane Andrew N, Higashi Richard M, Farag Mohamed A, Gao Hong, Bousamra Michael, and Miller Donald M.(2009). Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by 13C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). Mol Cancer. 2009; 8: 41.Published online 2009 Jun 26. doi: 10.1186/1476-4598-8-41. PMID: PMC2717907
- Finley L W.S., Zhang J, Ye J, Ward PS., Craig B. Thompson. (2013). SnapShot: Cancer Metabolism Pathways. Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA
- Forrest, MD.(2015). Why cancer cells have a more hyperpolarised mitochondrial membrane potential and emergent prospects for therapy. Department of computer science, University of Warwick, Coventry, UK. 2015, Aug. 21.
- Garrido, A. y Teijón JM (2006) Fundamentos de Bioquímica Metabólica.Segunda edición. Editorial Tébar. Madrid, España. Pág. 13-33
- García-Sancho C, Fernández R, Rivera, De la Garza MS, Marina F (2012) Humo de leña como factor de riesgo de cáncer pulmonar en población hospitalizada no fumadora. Neumol Cir Toráx. Vol. 71. Núm.4:325-332
- Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA (2013) Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. J Nucl Med. 2008 Jun; 49 Suppl 2:24S-42S. doi: 10.2967/jnumed.107.047258.
- Globocan. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence in 2012. Recuperado el 10 de Enero del 2017. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Gómez Sáez JM. (2011). Diagnostic and prognostic markers in differentiated thyroid cancer. Curr Genomics. 2011 Dec; 12(8):597-608. doi: 10.2174/138920211798120826.
- Gupta C S., Singh Ramesh, Pochampally Radhika, Watabe Kounosuke, and Mo Yin-Yuan. (2014). Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF-κB pathway. Oncotarget. 2014 Dec; 5(23): 12070–12082. Published online 2014 Sep 25. PMID: PMC4322981
- Hanahan D, Weinberg RA.(2000). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2000 Jan 7 100; 57-70(5):646-74.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Heerdt BG, Houston MA, Wilson AJ, Augenlicht LH. (2003). The intrinsic mitochondrial membrane potential (Deltapsim) is associated with steady-state mitochondrial activity and the extent to which colonic epithelial cells undergo butyrate-mediated growth arrest and apoptosis. Cancer Res. 2003 Oct 1;63(19):6311-9.

- Herráez, Ángel (2012) "Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética". Segunda edición. Editorial Elsevier. España. Pág. 380-390
- Herrerías, J.M., Belmont, A. y Sáenz, M. (1996) Tratado de Hepatología. Universidad de Sevilla. España. pág.50
- Hochachka PW, Land SC, Buck LT.(1997). Oxygen sensing and signal transduction in metabolic defense against hypoxia: lessons from vertebrate facultative anaerobes. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997 Sep; 118(1):23-9.
- Höckel M, Vaupel P.(2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):266-76.
- Houston MA., Augenlicht LH., and Heerdt BG. (2011). Intrinsic Mitochondrial Membrane Potential and Associated Tumor Phenotype Are Independent of MUC1 Over-Expression. *PLoS One.* 2011; 6(9): e25207. Published online 2011 Sep 23. doi: 10.1371/journal.pone.0025207.PMCID: PMC3179472
- Hur H, Xuan Y, Kim YB, Lee G, Shim W, Yun J, Ham IH, Han SU. (2013). Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. *Int J Oncol.* 2013 Jan; 42(1):44-54. doi: 10.3892/ijo.2012.1687. Epub 2012 Nov 6.
- INEGI. Estadísticas sobre el cáncer en México 2011. Recuperado el 13 de Enero del 2017. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
- Jornayvaz FR, Shulman GI. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010; 47: 69-84. doi: 10.1042/bse0470069.
- Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. (2011) LAT1 expression is closely associated with hypoxic markers and mTOR in resected non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res.* 2011;3(5):468-78. Epub 2011 Oct 7.
- Kaira K, Sunose Y, Arakawa K, Ogawa T, Sunaga N, Shimizu K, Tominaga H, Oriuchi N, Itoh H, Nagamori S, Kanai Y, Segawa A, Furuya M, Mori M, Oyama T, Takeyoshi I. (2012). Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2012 Aug 7;107(4):632-8. doi: 10.1038/bjc.2012.310. Epub 2012 Jul 17.
- Kang MK, Hur BI, Ko MH, Kim CH, Cha SH, Kang SK. (2008). Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci.* 2008 Jan 30; 9:15. doi: 10.1186/1471-2202-9-15.
- Kann O, Kovács R.(2007). Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Feb;292(2):C641-57. Epub 2006 Nov 8.
- Kappler M, Taubert H, Schubert Js, Vordermark D, and Eckert AW. (2012). The real face of HIF1 α in the tumor process. *Cell Cycle.* 2012 Nov 1; 11(21): 3932–3936. doi: 10.4161/cc.21854.PMCID: PMC3507488
- Kennedy KM., Scarbrough PM., Ribeiro A, Richardson R, Yuan H, Sonveaux P, Landon CD., Chi JT, Pizzo S, Schroeder T, and Dewhirst MW. (2013). Catabolism of Exogenous Lactate Reveals It as a Legitimate Metabolic Substrate in Breast Cancer. *PLoS One.* 2013; 8(9): e75154. Published online 2013 Sep 12. doi: 10.1371/journal.pone.0075154 PMCID: PMC3771963
- Kennedy KM and Dewhirst MW. (2010). Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol.* Author manuscript; available in PMC 2010 Nov1. *Future Oncol.* 2010 Jan; 6 (1): 127. doi: 10.2217/fon.09.145
- Khacho M, Tarabay M, Patten D, Khacho P, MacLaurin JG., Guadagno J, Bergeron R, Cregan SP., Harper M, Park DS., and Slacka RS. (2014). Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival. *Nat Commun.* 2014 Apr 1; 5: 3550. Published online 2014 Apr 1. doi: 10.1038/ncomms4550. PMCID: PMC3988820
- Kianercy A, Veltri R, Pienta KJ. (2014). Critical transitions in a game theoretic model of tumour metabolism. *Interface Focus.* 2014 Aug 6; 4(4):20140014. doi: 10.1098/rsfs.2014.0014.
- Koolman, J (2004) Bioquímica: Texto y Atlas. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Pág. 210

- Koopman WJ, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH.(2013). OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J.* 2013 Jan 9; 32 (1):9-29. doi: 10.1038/emboj.2012.300. Epub 2012 Nov 13
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL; Tumor and Angiogenesis Research Group.(2005). Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma. *Neoplasia.* 2005 Jan;7(1):1-6.
- Krivoruchko, A., Storey, K (2010). Forever young: Mechanisms of natural anoxia tolerance and potential links to longevity. *Oxid Med Cell Longev.* 2010 May-Jun; 3(3): 186–198. doi: 10.4161/oxim.3.3.4.PMCID: PMC2952077
- LaMonte G, Tang X, Chen J, Ling-Yu, Wu J,Chien-Kuang DC, Keenan MM, Sangokoya C, Hsiu-Ni K, Ilkayeva O, Boros LG, Newgard CB, and Chi Jen-Tsan.(2013). Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. *Cancer Metab.* 2013; 1: 23. Published online 2013 Dec 23. doi: 10.1186/2049-3002-1-23. PMCID: PMC4178214
- Law M. R. (1990) Genetic predisposition to lung cancer. *Br J Cancer.* 1990 Feb; 61(2): 195–206. PMCID: PMC1971391
- Lemons JM, Feng XJ, Bennet BD, Miller A, Johnson EL, Raitman I, Pollina E, Rabitz H, Rabinowitz J, Collier H. (2010) Quiescent Fibroblast Exhibit High Metabolic Activity. *PLoS Biol* 8(10): e1000514.
- Leung K. 89Zr-Desferrioxamine B-Transferrin. 2013 Apr 1 [Updated 2013 Jun 6]. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143125/>
- Lifeng Y, Moss T, Mangala LS, Marini J, Zhao H, Wahlig S, Pena G, Jiang D, Achreja A, Win J, Roopaimoole R, Aguayo C, Uribe I, Berestein G, Liu J, Tsukamoto T, Sood A, Ram P, Nagrath D.(2014). Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. *Mol Syst Biol.* (2014) 10: 728
- Lim KS, Lim KJ, Price AC, Orr BA, Eberhart CG, and Bar EE. (2014). Inhibition of monocarboxylate transporter-4 depletes stem-like glioblastoma cells and inhibits HIF transcriptional response in a lactate-independent manner. *Oncogene.* 2014 Aug 28; 33(35): 4433–4441. Published online 2013 Sep 30. doi: 10.1038/onc.2013.390.PMCID: PMC4087088
- Lin HJ, Hsieh FC, Song H, Lin J. (2005). Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2005 Dec 12;93 (12):1372-81.
- Ling-Yu Chen J, Lucas JE., Schroeder T, Mori S, Wu Ji, Nevins J, Dewhirst M, West M, and Chi JT. (2008). The Genomic Analysis of Lactic Acidosis and Acidosis Response in Human Cancers. *PLoS Genet.* 2008 Dec; 4(12): e1000293. Published online 2008 Dec 5. doi: 10.1371/journal.pgen.1000293. PMCID: PMC2585811
- Lodish, H (2006) *Biología celular y molecular.* Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pág: 304-311
- Loisel S, André PA, Golay J, Buchegger F, Kadouche J, Cérutti M, Bologna L, Kosinski M, Viertl D, Delaloye AB, Berthou C, Mach JP, Boumsell L. (2011). Antitumour effects of single or combined monoclonal antibodies directed against membrane antigens expressed by human B cells leukaemia. *Mol Cancer.* 2011 Apr 19; 10:42. doi: 10.1186/1476-4598-10-42.
- Lui GY, Obeidy P, Ford SJ, Tselepis C, Sharp DM, Jansson PJ, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Lovejoy DB, Richardson DR. (2006). The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. *Mol Pharmacol.* 2013 Jan;83(1):179-90. doi: 10.1124/mol.112.081893. Epub 2012 Oct 16.
- Martinez-Outschoorn UE, Prisco M, Ertel A, Tsirigos A, Lin Z, Pavlides S, Wang C, Flomenberg N, Knudsen ES, Howell A, Pestell RG, Sotgia F and Lisanti MP. (2011). Ketones and lactate increase cancer cell “stemness”, driving recurrence, metastasis and poor clinical outcome in breast cancer. Achieving personalized medicine via metabolo-genomics. *Cell Cycle.* 2011 Apr 15; 10(8): 1271–1286. Published online 2011 Apr 15. doi: 10.4161/cc.10.8.15330. PMCID: PMC3117136.
- Marthandan S, Priebe S, Hemmerich P, Klement K, Diekmann S (2014) Long-term quiescent fibroblast cells transit into senescence. *PLoS One.* 2014 Dec 22;9(12):e115597. doi: 10.1371/journal.pone.0115597. eCollection 2014.
- Mascanfroni ID, Takenaka MC, Yestke A, Patel B, Wu Y, Kenison JE, Siddiqui S, Basso AS, Otterbein LE, Pardoll DM, Pan F, Priel A, Clish CB, Robson SC, Quintana FJ.(2015). Metabolic control of type 1 regulatory T

cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat Med*. 2015 Jun;21(6):638-46. doi: 10.1038/nm.3868. Epub 2015 May 25.

Masson N, Ratcliffe PJ. (2010). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab*. 2014 Feb 4;2(1):3. doi: 10.1186/2049-3002-2-3.

Matakidou A, Eisen T, and Houlston RS. (2005). Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005 Oct 3; 93(7): 825–833. Published online 2005 Sep 6. doi: 10.1038/sj.bjc.6602769 PMID: PMC2361640

McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND., Wu H, Schell MJ., Tsang TM, Teahan O, Zhou S, Califano JA., Jeoung NH, Harris RA., and Verma A. (2008). Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity Controls Metabolic and Malignant Phenotype in Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2008 Aug 15; 283(33): 22700–22708. doi: 10.1074/jbc.M801765200. PMID: PMC2504897

McHugh MK, Schabath MB, Ho CH, Liu M, DÁmelio A, Greisinger AJ, Delclos G, Spitz M, Etzel MR. (2014) Self-Reported Prior Lung Diseases as Risk Factors for Non-small Cell Lung Cancer in Mexican Americans. *J Immigr Minor Health*. 2013 Oct; 15(5): 910–917.

Melo, V y Cuatmatzi, O. (2007) *Bioquímica de los Procesos Metabólicos*. Segunda edición. Editorial Reverté. México. Pág.139-141

Menendez JA, Joven J, Cufí S, Corominas-Faja B, Oliveras-Ferreros C, Cuyàs E, Martín-Castillo B, López-Bonet E, Alarcón T, Vazquez-Martin A. (2013). The Warburg effect version 2.0: metabolic reprogramming of cancer stem cells. *Cell Cycle*. 2013 Apr 15;12(8):1166-79. doi: 10.4161/cc.24479. Epub 2013 Apr 2.

Nakajima EC., Laymon C, Oborski M, Hou W, Wang L, Grandis J R., Ferris R L., Mountz JM., and Houten BV. (2014). Quantifying Metabolic Heterogeneity in Head and Neck Tumors in Real Time: 2-DG Uptake Is Highest in Hypoxic Tumor Regions. *PLoS One*. 2014; 9(8): e102452. Published online 2014 Aug 15. doi: 10.1371/journal.pone.0102452 PMID: PMC4134191

OMS. Cáncer. Datos y cifras sobre el cáncer. Recuperado el 24 de Enero del 2017. <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>

Ortmann B, Druker J, and Rocha S. (2014) Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(18): 3569–3582. Published online 2014 May 25. doi: 10.1007/s00018-014-1645-9. PMID: PMC4143607

Parenti R, Salvatorelli L, Magro G. (2014). Anaplastic Thyroid Carcinoma: Current Treatments and Potential New Therapeutic Options with Emphasis on Tfr1/CD71. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:685396. doi: 10.1155/2014/685396. Epub 2014 Jul 1.

Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M y Baño, C (2007) *Fundamentos de bioquímica*. Editorial PUV. Pág. 239-246

Pierce, BA. (2010) “Genética: Un enfoque conceptual”. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pág. 626-627.

Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. (2013). Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*. 2013 Nov;82(2):179-89. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.07.025. Epub 2013 Aug 20.

Phipps C, Molavian H, Kohandel M. (2014). A microscale mathematical model for metabolic symbiosis: Investigating the effects of metabolic inhibition on ATP turnover in tumors. *J Theor Biol*. 2015 Feb 7;366:103-14. doi: 10.1016/j.jtbi.2014.11.016. Epub 2014 Nov 27.

Pocock, G y Richards, C (2005) *Fisiología Humana: La base de la medicina*. Segunda edición. Editorial Masson. Barcelona, España. Pág. 27

Polański R, Cassandra L, Hodgkinson, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, Trapani F, Bishop P, White A, Critchlow S, Smith P, Blackhall F, Dive C, Morrow C. (2014). Activity of the Monocarboxylate Transporter 1 inhibitor AZD3965 in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 15; 20(4): 926–937. Published online 2013 Nov 25. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2270. PMID: PMC3929348

- Prior S, Kim A, Yoshihara T, Tobita S, Takeuchi T, Higuchi M. (2014). Mitochondrial respiratory function induces endogenous hypoxia. *PLoS One*. 2014 Feb 21;9(2):e88911. doi: 10.1371/journal.pone.0088911. eCollection 2014.
- Rademakers SE, Lok J, Van Der Kogel AJ, Bussink J, and Kaanders J HAM.(2012). Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 α , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer*. 2011; 11: 167. Published online 2011 May 12. doi: 10.1186/1471-2407-11-167. PMCID: PMC3115911
- Rafelski, S. M. (2013). Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BioMedCentral*, 1741-1750.
- Romero-García S, Lopez-Gonzalez JS, Báez-Viveros JL, Aguilar-Cazares D, Prado-García H (2011) Tumor cell metabolism. An integral view. *Cancer Biology & Therapy* 12:11, 939–948
- Sánchez, R y Arboleda, G (2008) Mitocondria y muerte celular. *Publicaciones en Ciencias Biomédicas. Universidad Colegio Mayor de Dinamarca. Vol.6 Núm. 10.*
- Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F. (2010).The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. *Front Oncol*. 2013 Apr 17; 3:90. doi: 10.3389/fonc.2013.00090. eCollection 2013.
- Schilling D, Bayer C, Emmerich K, Molls M, Vaupel P, Huber RM, Multhoff G. (2012). Basal HIF-1 α expression levels are not predictive for radiosensitivity of human cancer cell lines. *Strahlenther Onkol*. 2012 Apr; 188(4):353-8. doi: 10.1007/s00066-011-0051-6. Epub 2012 Feb 10.
- Shimoda LA, Semenza GL. (2011) HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 15; 183(2):152-6. doi: 10.1164/rccm.201009-1393PP.
- Silva LS, Goncalves LG, Silva F, Domingues G, Maximo V, Ferreira J, Lam EW, Dias S, Felix A, Serpa J. (2012). STAT3: FOXM1 and MCT1 drive uterine cervix carcinoma fitness to a lactate-rich microenvironment. *Tumour Biol*. 2016 Apr;37(4):5385-95. doi: 10.1007/s13277-015-4385-z. Epub 2015 Nov 12.
- Stinchcombe TE. and Goreb EM. (2010). Limited-Stage Small Cell Lung Cancer: Current Chemoradiotherapy Treatment Paradigms. *Oncologist*. 2010 Feb; 15(2): 187–195. Published online 2010 Feb 9. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0298.PMCID: PMC3227940.
- Strese S,Fryknäs M, Larsson R, and Gullbo J.(2013). Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity. *BMC Cancer*. 2013; 13: 331. Published online 2013 Jul 5. doi: 10.1186/1471-2407-13-331.PMCID: PMC3707755
- Stewart, D (2010) *Lung Cancer: Prevention, Management and Emerging Therapies*. Human Press. New York, USA. Pág. 1 a 4.
- Stewart DJ. (2011). TUMOR AND HOST FACTORS THAT MAY LIMIT EFFICACY OF CHEMOTHERAPY IN NON-SMALL CELL AND SMALL CELL LUNG CANCER. *Crit Rev Oncol Hematol*. Author manuscript; available in PMC 2011 Sep 1. Published online 2010 Jan 4. doi: 10.1016/j.critrevonc.2009.11.006
- Stetler AR, Leak RK, Gao Y, Chen J. (2013).The dynamics of the mitochondrial organelle as a potential therapeutic target. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013 Jan;33(1):22-32. doi: 10.1038/jcbfm.2012.158. Epub 2012 Oct 24.
- Sun F, Dai C, Xie J, Hu X.(2012). Biochemical issues in estimation of cytosolic free NAD/NADH ratio. *PLoS One*. 2012; 7(5):e34525. doi: 10.1371/journal.pone.0034525. Epub 2012 May 3.
- Tak E, Jung DH, Kim SH, Park GC, Jun DY, Lee J, Jung BH, Kirchner VA, Hwang S, Song GW, Lee SG. (2016). Protective role of hypoxia-inducible factor-1 α -dependent CD39 and CD73 in fulminant acute liver failure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017 Jan 1;314:72-81. doi: 10.1016/j.taap.2016.11.016. Epub 2016 Nov 27.
- Tarin D. (2012). Clinical and biological implications of the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2012 Aug;5(2):95-112. doi: 10.1007/s12307-012-0099-6.
- Travis WD, 2011. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med*, 32, pp 669-692
- Turcotte, Parliament m, Franko A, Allalunis-Turner A (2002). Variation in mitochondrial function in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant human glioma cells. *Br J Cancer*. 2002 Feb 12; 86(4): 619–624. doi: 10.1038/sj.bjc.6600087 PMCID: PMC2375290

- Valencia A (2013) Estudio del metabolism energetico en líneas celulares de carcinoma pulmonar bajo condiciones de estres metabolico asociado al microambiente tumoral. Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México. México.
- Van Heé VF, Labar D, Dehon G, Grasso D, Grégoire V, Muccioli GG, Frédérick R, Sonveaux P. (2017) Radiosynthesis and validation of (±)-[18F]-3-fluoro-2-hydroxypropionate ([18F]-FLac) as a PET tracer of lactate to monitor MCT1-dependent lactate uptake in tumors. *Oncotarget*. 2017 Jan 17. doi: 10.18632/oncotarget.14705
- Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN. (2010) Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited. *BMC Syst Biol*. 2010 May 6; 4:58. doi: 10.1186/1752-0509-4-58.
- Verschoor, M., Ungard, R., Hartbottle, A., Jakipciak, J., Parr, R., & Singh, G. (2013). Mitochondria and Cancer.
- Verwer EE, Boellaard R, and Van Der Veldt A. (2014). Positron emission tomography to assess hypoxia and perfusion in lung cancer. *World J Clin Oncol*. 2014 Dec 10; 5(5): 824–844. Published online 2014 Dec 10. doi: 10.5306/wjco.v5.i5.824.PMCID: PMC4259945
- Villar VH, Merhi F, Mergny M, Durán R. (2015) Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy* 11:8, 1198-1208
- Voet, D (2009) Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Pág. 571-897
- What is Small Cell Lung Cancer?. Recuperado el 24 de Enero del 2017. <http://www.cancer.org/cancer/small-cell-lung-cancer/about/what-is-small-cell-lung-cancer.html>
- Wang Q, Morris ME. (2007). The role of monocarboxylate transporter 2 and 4 in the transport of gamma-hydroxybutyric acid in mammalian cells. *Drug Metab Dispos*. 2007 Aug; 35(8):1393-9. Epub 2007 May 14.
- Ward PS, Thompson CB.(2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20; 21(3): 297–308. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014. PMCID: PMC3311998
- Wiener CM, Booth G, Semenza GL. (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Aug 14;225(2):485-8.
- Yan W, Wistuba I, Emmert-Buck, M, Erickson, H (2011) Squamous cell carcinoma-similarities and differences among anatomical sites. *Am J Cancer Res* 2011;1(3):275-300
- Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiai T, Kato T.(2012). Micromanaging Iron Homeostasis: hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *J Biol Chem*. 2012 Oct 5;287(41):34110-9. doi: 10.1074/jbc.M112.356717. Epub 2012 Aug 15.
- Yu L and Hales CA. (2011). Long-term exposure to hypoxia inhibits tumor progression of lung cancer in rats and mice. *BMC Cancer*. 2011; 11: 331. Published online 2011 Aug 3. doi: 10.1186/1471-2407-11-331. PMCID: PMC3199866
- Zhao-wei G, Ke D and Hui-zhong Z. (2014). The Roles of CD73 in Cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 460654. Published online 2014 Jul 14. doi: 10.1155/2014/460654. PMCID: PMC4121992
- Zhu J, Wu YN, Wei Z, Xiao-Min Zhang, Xu Ding, Huai-Qi Li, Meiyu Geng, Zuo-Quan Xie, He-Ming Wu. (2014). Monocarboxylate Transporter 4 Facilitates Cell Proliferation and Migration and Is Associated with Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *PLoS One*. 2014; 9(1): e87904. Published online 2014 Jan 30. doi: 10.1371/journal.pone.0087904. PMCID: PMC3907573