



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Efecto de la variación en las condiciones de
crecimiento sobre la proliferación celular tumoral y
su asociación con la dinámica mitocondrial
tumoral**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

PRESENTA:

Osvaldo Rodríguez Padilla

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Aida Susana Romero García



MÉXICO D.F

Ciudad de México, 2016



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. María Teresa Corona Ortega

VOCAL: Dra. Aida Susana Romero García

SECRETARIO: Dra. María Isabel Soto Cruz

1er. SUPLENTE: Dr. Arturo Valle Mendiola

2do. SUPLENTE: Q.F.B. Adriana Hernández Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:

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

DIRECTORA DEL TEMA:

Dra. Aida Susana Romero García _____

SUSTENTANTE:

Oswaldo Rodríguez Padilla: _____

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, porque no hay otro lugar en donde me hubiera gustado estudiar.

Agradezco a mis sinodales por la asesoría y las correcciones

Agradezco también a mi directora de tesis, Dra. Aida Susana Romero García, por su asesoría, esfuerzo, constancia y dedicación.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, por la oportunidad que brinda a los estudiantes universitarios, pero sobre todo a los miembros del laboratorio de cáncer pulmonar de quienes eh aprendido durante este trabajo, gracias por su paciencia y consejos.

Dedicatorias

A mis padres, esta tesis no hubiera sido posible sin su apoyo, amor y dedicación les debo gran parte de mi formación como ser humano, y en cada uno de mis pasos siempre estarán presentes como parte de la fuerza que me permite alcanzar mis metas, los amo infinitamente.

A mi hermana, Susi, porque sin ti mi vida estaría incompleta, gracias por ser siempre mi amiga y compañera.

A toda mi familia en especial a mis tíos Isabel y Trinidad, todos ustedes me han ayudado, por toda la atención y el apoyo este trabajo también es de ustedes, Gracias.

A mis amigos, porque sin duda llenaron mi vida con recuerdos inolvidables y me ayudaron a que cada momento fuera más sencillo.

A Valeria, sin duda cada momento que has formado parte de mi vida ha estado lleno de diferentes matices, ¡muchas gracias por todo! .

ÍNDICE

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
MARCO TEÓRICO	10
Generalidades del cáncer	10
Características distintivas del cáncer	10
Señales de proliferación sostenida.....	10
Insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento	11
Inmortalidad replicativa	11
Angiogénesis.....	11
Invasión y metástasis	12
Evasión a la respuesta inmune	12
Reprogramación metabólica.....	12
Cáncer de mama	13
Cáncer de pulmón.	13
Metabolismo del carbono en las células no tumorales	14
Glucólisis.....	14
Ciclo del ácido cítrico	15
La mitocondria	15
Estructura y funciones.....	15
Producción de energía en la mitocondria	16
Cadena de transporte de electrones	17
Fosforilación oxidativa.....	17
DNA mitocondrial y función.....	18
Replicación del DNA mitocondrial (mtDNA).....	19
Antecedentes del metabolismo de las células tumorales en hipoxia	19
Antecedentes del metabolismo de las células tumorales en acidosis.....	20
Modificaciones encontradas en las mitocondrias de las células tumorales	21
Disminución en el número de copias del mtDNA.	22
Aumento en los niveles de mtDNA.....	23
Dinámica mitocondrial en células normales	24
Alteraciones en la forma y en la distribución de las mitocondrias en cáncer.	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
HIPÓTESIS	29

OBJETIVOS	30
Objetivo General	30
Objetivos particulares	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Reactivos	31
Equipos	31
Cultivo celular.....	33
Condiciones de cultivo para los ensayos.....	33
Determinación de la viabilidad.....	33
Caracterización cinética de la línea celular tumoral MCF-7	34
Determinación de la concentración de glucosa, lactato, glutamina, glutamato en los sobrenadantes usando el analizador bioquímico YSI	35
Aislamiento del DNA total (DNAg y mtDNA) de los cultivos.....	35
Cuantificación relativa del mtDNA por PCR de punto final.....	36
Tinción mitocondrial	37
RESULTADOS	39
La línea celular de cáncer de mama (MCF-7) presentó cambios en su actividad metabólica en condiciones de acidosis e hipoxia.	39
Las líneas celulares tumorales modificaron su cantidad de DNA mitocondrial (mtDNA) en respuesta a las condiciones de cultivo.	42
Las líneas celulares tumorales modificaron la forma y el tamaño, además de la posición y la cantidad de las mitocondrias en respuesta a las condiciones de cultivo.	44
<i>Microscopía de epifluorescencia en las células de fibroblastos de pulmón</i>	44
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57
ANEXO 1	62
Línea celular MRC-5	62
Línea celular MCF-7	63
Línea celular A-549	64
Línea celular A-427	65

Índice de Figuras

Figura 1 Representación de una mitocondria típica	12
Figura 2 Procesos de fusión y fisión mitocondrial	13
Figura 3 Fosforilación oxidativa	14
Figura 4 DNA mitocondrial	15
Figura 5 Camara de neubauer.....	30
Figura 6 Esquema de reacción de PCR	32
Figura 7 Esquema de trabajo.....	32
Figura 8 Estructura molecular de Mitotracker Green F.M.....	33
Figura 9 Estructura base de los colorantes Hoeschst.....	34
Figura 10 Curvas de crecimiento celular de la línea MCF-7.....	36
Figura 11 Producción de lactato consumo de glucosa y lactato de la línea MCF-7 en diferentes condiciones de pH y tensión de O ₂	37
Figura 12 Consumo de glutamina y producción de glutamato de la línea MCF-7.....	38
Figura 13 Cantidad relativa de mtDNA en células de fibroblastos y líneas celulares Tumorales	39
Figura 14 Micrografías de fluorescencia de las células de fibroblastos de pulmón MRC-5. 40	
Figura 15 Micrografías de fluorescencia de las células de fibroblastos de pulmón MRC-5. 41	
Figura 16 Micrografías de fluorescencia de la línea celular MCF-7.....	42
Figura 17 Micrografías de fluorescencia de la línea celular MCF-7.....	43
Figura 18 Micrografías de fluorescencia de la línea celular A-427	44
Figura 19 Micrografías de fluorescencia de la línea celular A-427	45
Figura 20 Micrografías de fluorescencia de la línea celular A-549.....	46
Figura 21 Micrografías de fluorescencia de la línea celular A-549.....	47
Figura 22 Bandas de amplificación de los genes b-actina y mtDNA de las células de fibroblastos, MRC-5	58
Figura 23 Bandas de amplificación de los genes b-actina y mtDNA de las células de adenocarcinoma mamario, MCF-7	59
Figura 24 Bandas de amplificación de los genes b-actina y mtDNA de las células de adenocarcinoma de pulmón A-549	60
Figura 25 Bandas de amplificación de los genes b-actina y mtDNA de las células de adenocarcinoma de pulmón, A-427	61

Índice de tablas

Tabla 1 Condiciones de cultivo	29
Tabla 2 Reactivos para una reacción de PCR de punto final.....	33
Tabla 3 Velocidades específicas de crecimiento de la línea celular MCF-7 en diferentes fuentes de carbono, tensión de O ₂ y pH.....	35

Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
mtDNA	DNA mitocondrial
HIF-1α	Factor de transcripción inducible por hipoxia
SCLC	Cáncer pulmonar de células pequeñas
NSCLC	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
FADH	Flavina adenina dinucleotido oxidado
FADH₂	Flavina adenina dinucleotido reducido
ATP	Adenosina trifosfato
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial
NRF-1	Factor respiratorio nuclear
PGC-1	Coactivador transcripcional de proliferación peroxisomal activado
SFB	Suero fetal bovino
μL	Microlitro
μmol	Micromol

RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que comparten características en común donde las células presentan un crecimiento descontrolado, y una proliferación continua. Se sabe que durante la patogénesis del cáncer, las células adquieren una serie de capacidades que se consideran necesarias para expresar los rasgos que les permiten ser tumorales y en última instancia malignas. Una de las capacidades recientemente estudiada es la de modificar sus flujos metabólicos con el objetivo de sobrevivir y mantener una alta tasa de proliferación, también conocida como reprogramación metabólica. Múltiples estudios han sugerido que las mitocondrias pueden tener un papel primordial en el proceso de reprogramación metabólica, dado que se han encontrado diversas alteraciones en estos organelos en diferentes tipos de cáncer. Por lo que recientemente los investigadores se han enfocado en estudiar como el microambiente puede afectar la forma en que el tumor crece y se disemina.

Con base en lo anterior, el objetivo de este proyecto fue determinar el efecto de la variación en las condiciones de crecimiento sobre la proliferación celular y su asociación con la dinámica mitocondrial en dos diferentes líneas de cáncer de pulmón (A-549 y A-427) así como en una línea de cáncer de mama (MCF-7). Además, se analizó el papel de las alteraciones en el mtDNA y los cambios en la distribución de las mitocondrias sobre el crecimiento celular al variar el pH del medio (6.2 y 7.2), la tensión parcial de oxígeno (normoxia e hipoxia) y la principal fuente de carbono (glucosa o lactato).

Se observó que las mitocondrias de las líneas celulares de carcinoma pulmonar A-549 y A-427 así como las células de cáncer de mama MCF-7 son capaces de responder a los cambios en su entorno, y que esto puede influir en la proliferación celular. Además todas las líneas celulares utilizadas presentaron dos poblaciones de células, una con un alto contenido mitocondrial y otra con un contenido bajo. Por último, en la línea celular MCF-7 se observó una disminución en la proliferación de las células cultivadas en medios con lactato e hipoxia, que además presentaron una disminución en sus niveles de mtDNA.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que comparten características en común donde las células de cualquier parte del cuerpo presentan un crecimiento descontrolado, y una proliferación continua⁽¹⁾. En este trabajo nos enfocamos en estudiar el cáncer de mama y el cáncer de pulmón debido a su alta tasa de incidencia y mortalidad lo que los convierte en problemas de salud a nivel mundial.

Todos los tumores se constituyen por células normales, células tumorales, vasos sanguíneos que rodean al tumor y moléculas producidas por los diferentes linajes celulares. (microambiente tumoral) En éste microambiente pueden también encontrarse bajos niveles de oxígeno (hipoxia), privación de energía, hipertensión intersticial, altos niveles de lactato y acidosis extracelular⁽⁴⁾.

Actualmente existe una problemática en cuanto al papel que tienen las mitocondrias en la progresión y desarrollo del cáncer, dado que algunas investigaciones apoyan la hipótesis de que las células tumorales no poseen mitocondrias funcionales, mientras que algunas otras apuntan a que las mitocondrias en células tumorales son funcionales. Este trabajo nace a partir de este debate acerca del papel que tienen las mitocondrias en las células tumorales, y se enfoca en la interacción entre la célula tumoral y las condiciones encontradas en su microambiente (pH, carbohidrato y concentración de oxígeno).

Es por eso que el principal objetivo de este trabajo es determinar que efecto tienen diferentes condiciones de cultivo sobre la dinámica mitocondrial y la proliferación celular con el fin de encontrar si existe alguna asociación entre ambas.

En este trabajo se abordaran una a una las características generales del cáncer (proliferación sostenida, inmortalidad replicativa, angiogénesis sostenida, evasión a la respuesta inmune, reprogramación metabólica insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento invasión y metástasis), así como las características principales del metabolismo en células no malignas y el papel que tienen la mitocondria en este sentido. Por último se expondrán las principales alteraciones encontradas en las células tumorales que servirán como antecedentes a este trabajo.

MARCO TEÓRICO

Generalidades del cáncer

El desarrollo y progresión del cáncer, se conoce como carcinogénesis, este proceso se divide en iniciación, promoción y progresión. La iniciación ocurre cuando una mutación no es reparada adecuadamente, las mutaciones pueden ser causadas por errores durante la división celular, por algunos virus y por exposiciones ambientales prolongadas con agentes químicos que actúan directamente sobre el DNA. Con el tiempo las mutaciones adquiridas ocasionan una proliferación descontrolada dando origen a una población de células dañadas, a esto se le conoce como promoción. Por último, cuando una población de células adquiere mutaciones que le confieren alguna ventaja, y ésta se vuelve dominante se habla de progresión tumoral ⁽²⁾. Es importante mencionar que dentro de los tumores existe una población de células del 0.1-1% capaz de regenerar el tumor por completo, a estas células se les conoce como células troncales de cáncer (del inglés CSC) y se sabe que estas células presentan un fenotipo de transición epitelio-mesenquima, tienen una proliferación celular lenta, una mayor cantidad de proteínas antiapoptóticas y bombas de expulsión de fármacos ⁽³⁾.

Características distintivas del cáncer

Durante la patogénesis del cáncer, las células adquieren una serie de capacidades que se consideran necesarias para expresar los rasgos que les permiten ser tumorales y en última instancia malignas. Estas capacidades incluyen: La inmortalidad replicativa, mantenimiento de señales proliferativas, insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento, angiogénesis sostenida, resistencia a la muerte celular, metástasis, la evasión a la respuesta inmune y la reprogramación metabólica ⁽⁵⁾.

Señales de proliferación sostenida.

El control sobre la proliferación, además de mantener la arquitectura de los tejidos y los órganos, permite un desarrollo multicelular funcional. Este control en células normales se logra mediante la producción y liberación de factores de crecimiento que al unirse a su receptor específico inician la activación de diferentes cascadas de transducción de señales. Sin embargo, las células tumorales mantienen activas las vías de señalización encargadas de la proliferación, mediante la producción de ligandos que se unen a factores de crecimiento y a sus receptores, o por la estimulación de las células del estroma para

que liberen al microambiente factores de crecimiento, o a través de daños en los mecanismos de regulación de señales ^(5,6).

Insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento

Los mecanismos que inhiben la proliferación celular suelen estar relacionados con genes llamados genes supresores de tumor. Se conocen alrededor de 30 genes supresores, que desaceleran la división celular, reparan errores en el DNA y dirigen los procesos de muerte programada; éstos genes suelen estar alterados en células tumorales debido a su capacidad de inhibir el desarrollo tumoral y a su rol crucial en la supervivencia celular en respuesta a estrés, ejemplo de estos genes son los genes p53 y pRB ^(5,7,8).

Inmortalidad replicativa

Las células normales tienen la capacidad de crecer y dividirse un número limitado de veces, después entran en un estado de senescencia y posteriormente en crisis donde la mayoría de la población muere. Sin embargo, una de las principales características de las células tumorales es su capacidad de permanecer en un proceso de proliferación constante. Esta capacidad podría deberse a la actividad de la enzima telomerasa que se correlaciona con una resistencia a la inducción de la senescencia y de la apoptosis ⁽⁵⁾.

Resistencia a la muerte celular

De acuerdo a sus características morfológicas existen alrededor de 11 tipos de muerte celular, de los cuales 10 son programadas genéticamente. Se ha observado que las células tumorales tienen la habilidad de escapar a los mecanismos de muerte celular programada, esto se ha relacionado con alteraciones encontradas en miembros de la familia Bcl-2 denominados "anti-apoptóticos". Por ejemplo Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1, así como daños en los genes p53, MYC y BH3 ^(5, 9,10).

Angiogénesis

Se denomina angiogénesis a la capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, esta capacidad tiene un papel vital para el crecimiento de los tumores mayores a 2–3 mm ⁽¹¹⁾.

En la mayoría de los tumores sólidos se ha encontrado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor clave en el mantenimiento de la angiogénesis, se encuentra sobre-expresado. Otras proteínas identificadas como activadoras de la angiogénesis en diferentes tumores son el factor de crecimiento para fibroblastos básico

(bFGF), la angiotensina, el factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF α y TGF β), el factor de necrosis tumoral (TNF α), la interleucina-8, el factor de crecimiento de hepatocitos, entre otros ^(11,12).

Invasión y metástasis

La característica más letal de las células tumorales es su habilidad para invadir. La invasión requiere de cambios secuenciales en el fenotipo y la morfología celular, además de modificaciones en el ambiente circundante. Los principales cambios morfológicos durante el proceso de invasión ocurren en células epiteliales, que se transforman en células no polarizadas, móviles y con forma alargada, parecida a la de los fibroblastos; a esto se le conoce como transición Epitelio-Mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) ⁽¹³⁾. Adicionalmente, durante esta transición en algunos tumores se pierde E-cadherina, la cual es una glicoproteína implicada en las interacciones célula a célula mediante complejos dependientes de Ca⁺², su pérdida favorece aún más la invasión y la metástasis. Por otra parte, las células tumorales son capaces de alterar el microambiente, mediante una degradación proteolítica de la matriz extracelular (directamente), o mediante inducción de la secreción de proteasas por células cercanas (indirectamente) ⁽¹⁴⁾.

Evasión a la respuesta inmune

Algunos componentes del sistema inmunológico innato (células NK) y adaptativo (Linfocitos T CD8⁺ y TCD4⁺) tienen la capacidad de detectar y eliminar células inmunológicamente vulnerables ⁽¹⁵⁾. Sin embargo, las células tumorales son capaces de escapar a la destrucción inmunológica mediante la producción y liberación de factores derivados de tumor (TDFs por sus siglas en inglés) como son: TGF β , VEGF, IL10 y PGE2, además de la reducción de la eficiencia del reconocimiento inmunológico (pérdida de antígenos de superficie), la supresión del sistema inmune mediante la estimulación de células Treg, células mieloides supresoras (MDSCs) y macrófagos asociados a tumor. Además, la constante interacción entre el sistema inmune y el tumor promueve la aparición de células más agresivas en un proceso llamado inmunoedición ⁽¹⁶⁾.

Reprogramación metabólica

Se refiere a la capacidad de las células tumorales de modificar sus flujos metabólicos, con el objetivo de sobrevivir y mantener una alta tasa de proliferación. En 1920 mientras estudiaba la glucólisis, el científico alemán Otto Warburg observó que las células tumorales

producían grandes cantidades de lactato aunque el oxígeno disponible era suficiente para que las células oxidaran completamente la glucosa hasta CO₂ y agua ⁽¹⁷⁾. Además de esta alteración metabólica, las células también presentan alteraciones en el metabolismo de los lípidos, de los aminoácidos y otras rutas metabólicas ⁽¹⁸⁾.

Cáncer de mama

La glándula mamaria contiene grasa, tejido conectivo, nódulos linfáticos y vasos sanguíneos, está formada por glándulas llamadas lóbulos, que pueden generar leche, además de túbulos estrechos llamados ductos, que transportan la leche desde los lóbulos hacia el pezón. Cuando cualquiera de las células del tejido mamario comienza a crecer de manera descontrolada se habla de cáncer de mama. Sin embargo, los tipos más frecuentes son los que nacen en los lóbulos (lobular) y en los ductos (ductal) ⁽¹⁾. La línea celular MCF-7 de adenocarcinoma mamario mantiene varias características del epitelio mamario diferenciado. Por ejemplo, la habilidad de procesar estradiol a través de receptores citoplasmáticos de estrógenos y la capacidad de formar domos (agruparse en capas) estas células tienen un tiempo de duplicación de 29h, expresan el oncogén WNT7B y receptores de estrógenos ⁽¹⁹⁾.

De acuerdo con datos de GLOBOCAN 2012 el cáncer de mama se posiciona en el segundo lugar de incidencia a nivel mundial, con 1.67 millones de nuevos casos en mujeres en ese año, lo que equivale a una incidencia del 25% .Con respecto a la mortalidad por esta enfermedad, ésta se estimó en 15.4% en las áreas más desarrolladas y en 14.3 % para las zonas menos desarrolladas económicamente ⁽²⁰⁾.

Cáncer de pulmón.

El cáncer de pulmón es el crecimiento descontrolado de células transformadas en uno o ambos pulmones, estas células no son capaces de llevar a cabo sus funciones normales por lo que interfieren con el funcionamiento de este órgano. En 2012 GLOBOCAN estimó 1.8 millones de nuevos casos de esta enfermedad a nivel mundial, cifra que representa una incidencia del 13%, esta elevada incidencia se encuentra asociada con factores de riesgo como el tabaquismo, la exposición a asbestos, arsénico, hidrocarburos aromáticos policíclicos y altos niveles de contaminación ambiental. En cuanto a mortalidad el cáncer pulmonar ocupa el primer lugar en hombres y el cuarto en mujeres, esto cuando solo se considera la mortalidad por cáncer a nivel mundial. ^(1,21)

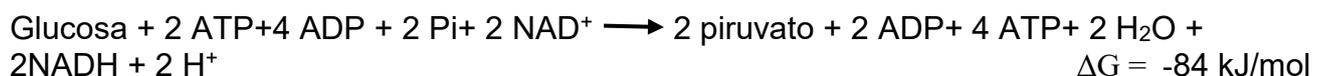
El cáncer pulmonar puede dividirse en dos grupos clínicamente importantes: el cáncer pulmonar de células pequeñas (del inglés, SCLC) y el cáncer pulmonar de células no pequeñas (del inglés, NSCLC). El cáncer de pulmón de células pequeñas es el subtipo de cáncer pulmonar más agresivo y mortal, representa el 13–20% de los casos de cáncer de pulmón, y considerándolo independientemente del cáncer pulmonar de células no pequeñas es la quinta causa de muerte por cáncer ⁽²²⁾. Por su parte, el cáncer de pulmón de células no pequeñas representa el 85-90% de los casos de cáncer de pulmón, en la mayoría de los pacientes el diagnóstico de esta enfermedad ocurre en un estadio avanzado de la enfermedad lo que conlleva a un mal pronóstico. Este tipo de cáncer pulmonar se divide en: adenocarcinoma, cáncer de células escamosas epidermoide y carcinoma de células grandes ⁽²³⁾.

Metabolismo del carbono en las células no tumorales

Todas las células llevan a cabo procesos de consumo de energía, la reparación del DNA, la transcripción y la traducción de DNA, el reemplazo de proteínas y el tráfico de vesículas, debido a esto las células necesitan extraer energía a partir de nutrientes o de la luz del sol de manera continua con el fin de mantener la homeostasis celular. Las principales vías involucradas en la generación de energía a partir de glucosa son: la glucólisis y el ciclo de Krebs. La vía de las pentosas fosfato está involucrada en la generación de reductores (NADPH) para los procesos biosintéticos y el mantenimiento del potencial redox que protege en contra del estrés oxidativo, así como con la generación de esqueletos de carbono para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos aromáticos y sus derivados ^(24,25).

Glucólisis

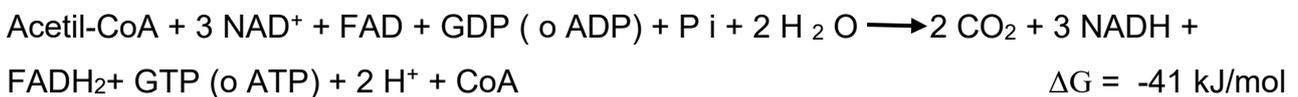
La glucólisis o vía Embden-Meyerhof consiste en la obtención de piruvato a partir de glucosa [Ecuación 1], mediante diferentes reacciones consecutivas. El piruvato obtenido puede ser transportado desde el citosol al interior de la mitocondria y ser completamente oxidado hasta CO₂ y agua, o en condiciones muy bajas de oxígeno puede ser convertido en lactato. ⁽²⁵⁾.



[Ecuación 1. Obtención de ATP y potencial reductor NADH a partir de glucosa]

Ciclo del ácido cítrico

En este ciclo se oxidan las moléculas de acetil-CoA provenientes de carbohidratos, ácidos grasos y algunos aminoácidos hasta CO_2 y agua, produciendo NADH y FADH que son sustratos para la fosforilación oxidativa, e intermediarios para la biosíntesis de aminoácidos y porfirinas [Ecuación 2] ⁽²⁶⁾.



[Ecuación 2. Oxidación de Acetil-CoA]

Todas las enzimas necesarias para el ciclo se encuentran en la matriz mitocondrial a excepción de la succinato deshidrogenasa, que forma parte de la membrana interna mitocondrial ⁽²⁵⁾.

La mitocondria

Este organelo celular fue descrito por primera vez en 1840 ⁽²⁷⁾. Se encuentra ubicado en el citoplasma de todas las células eucariontes, y es responsable de aproximadamente el 70% de la energía utilizada en condiciones normales ⁽²⁸⁾.

Estructura y funciones

La mitocondria posee forma alargada y cilíndrica con un diámetro de aproximadamente $0.5\text{--}1 \mu\text{m}$ ⁽²⁹⁾. Se compone de una doble membrana que da origen a dos compartimientos (Fig. 1). El primero, la matriz mitocondrial es el sitio donde se localiza el material genético de este organelo, además de las enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo. La membrana interna posee numerosas invaginaciones (crestas), en donde se localizan los complejos que conforman la cadena respiratoria y dan origen a la fosforilación oxidativa; el segundo compartimento es el espacio intermembranar que está rodeado por la membrana externa y la membrana interna ⁽³⁰⁾.

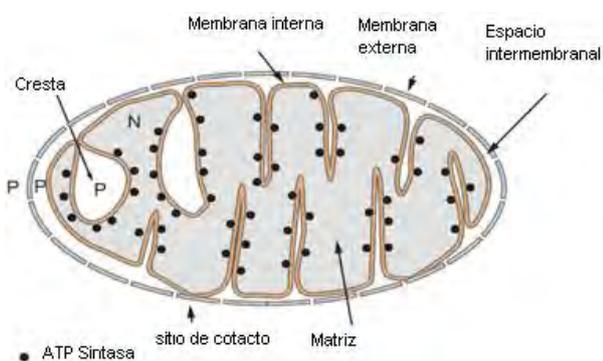


Fig. 1 Representación de una mitocondria típica. Modificado de Bioenergetics ⁽³¹⁾.

Las mitocondrias participan en la producción de ATP mediante la reoxidación de NADH y FADH₂ producido en la cadena respiratoria, la oxidación de los ácidos grasos y en la biosíntesis del grupo hemo. Además, participan en diversos mecanismos de regulación, como la homeostasis del calcio, la producción de especies reactivas de oxígeno y la vía intrínseca de la apoptosis ⁽²⁵⁾. Las mitocondrias son muy dinámicas y tienen la capacidad de responder al estrés celular mediante cambios en su masa total, interconexión y en la localización subcelular (Fig. 2) ⁽³²⁾.

Debido a esta plasticidad, la cantidad de mitocondrias por célula se modifica dependiendo de su requerimiento energético, por ejemplo, en estudios realizados en ovocitos de ratón típicos (MII) se ha reportado un número de alrededor de 1500 mitocondrias por célula ⁽³²⁾. En el caso de células de músculo esquelético de ratón se ha reportado que existen alrededor de 150 mitocondrias por célula. Por otra parte, en fibroblastos humanos se han reportado alrededor de 300 mitocondrias por célula ⁽³⁴⁾.

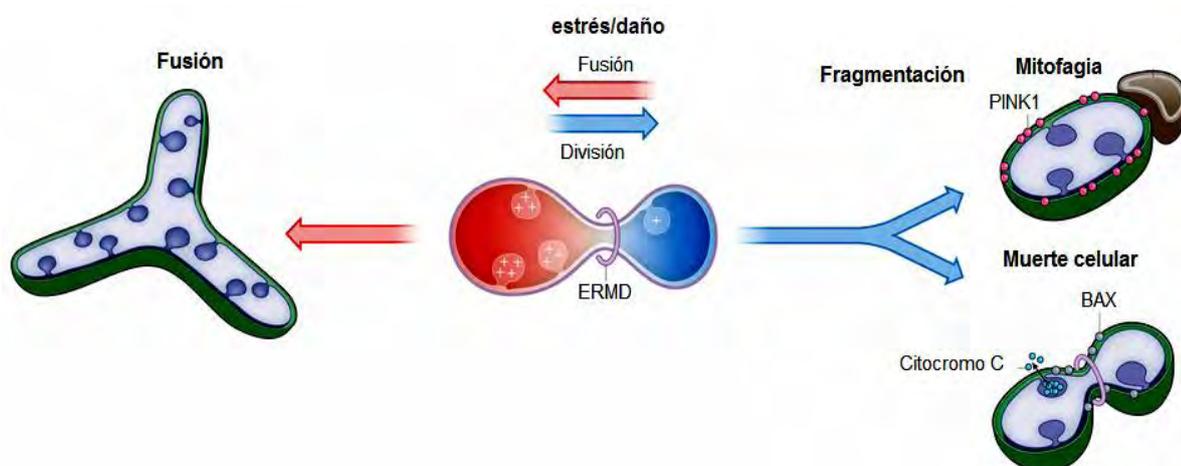


Figura 2. Procesos de fusión y fisión mitocondrial. Modificado de Mitochondrial form and function ⁽³⁵⁾. La fusión mitocondrial es promovida por las proteínas Opa 1, mitofusina 1 y mitofusina 2; mientras que la fisión o fragmentación, requiere de Drp1 y Mff, (factor de fisión mitocondrial), este remodelamiento en la red mitocondrial toma lugar en respuesta a hipoxia, señales del ciclo celular, cambios en la demanda energética y otros tipos de estrés celular ⁽³²⁾.

Producción de energía en la mitocondria

La respiración mitocondrial es el conjunto de reacciones metabólicas y procesos que requieren oxígeno y tienen lugar en la mitocondria para convertir la energía proveniente de los macronutrientes en ATP (adenosina trifostato), el donador de energía universal en la célula ⁽³⁶⁾.

Cadena de transporte de electrones

La mitocondria maximiza la producción de ATP transfiriendo electrones desde el NADH y el FADH₂ hasta el oxígeno a través de una serie de transportadores de electrones (complejos I, II, III, IV) que son proteínas transmembranales de la membrana interna mitocondrial (excepto el complejo II), a este proceso se le conoce como cadena de transporte de electrones. El transporte de electrones a través de estos complejos genera un movimiento de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, generando un potencial eléctrico (debido a la diferencia de cargas a través de la membrana interna) y un gradiente de concentración de protones, en conjunto llamados la fuerza protón- motriz indispensable para la síntesis de ATP (Fig.3) ⁽³⁶⁾.

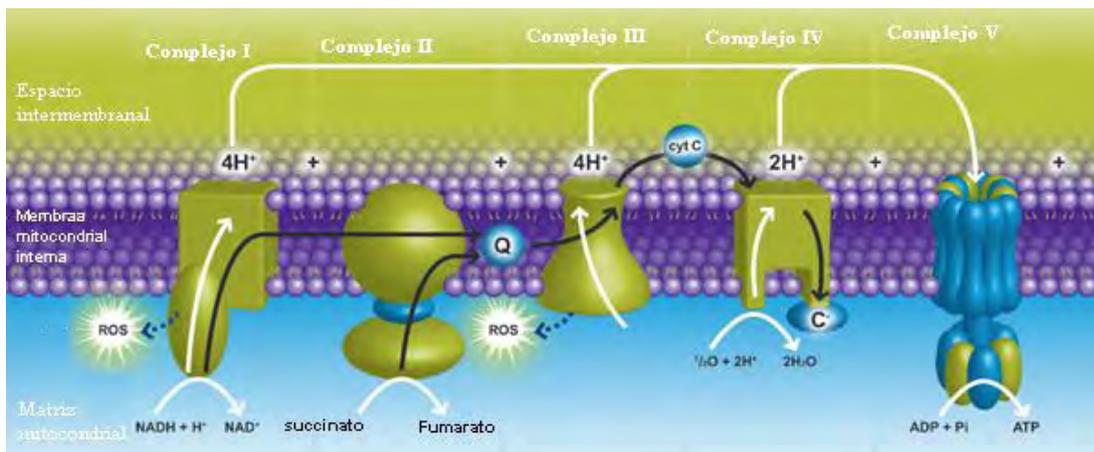


Fig.3- La fosforilación oxidativa tiene lugar en la membrana interna mitocondrial, a través de 4 complejos. Modificado de Oxidative phosphorylation ⁽³⁷⁾.

En el complejo 1, NADH deshidrogenasa, cataliza la entrada de electrones desde el NADH; en el complejo 2, succinato ubiquinona oxidoreductasa, transfiere electrones a la coenzima Q reduciéndola a ubiquinol; el complejo 3, Ubiquinol oxido reductasa, cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo C; el complejo 4, Citocromo C oxidoreductasa, recibe los electrones procedentes del citocromo y los transfiere al O₂ convirtiéndolo en H₂O y generando un gradiente electroquímico. Dicho gradiente es aprovechado por el complejo 5, ATP sintasa que sintetiza ATP a partir de ADP.

Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa (OXPHOS por sus siglas en inglés) es el proceso en el cual se sintetiza ATP a partir de ADP y Pi. La respiración celular combina la cadena de transporte de electrones con la fosforilación oxidativa para la producción de ATP mediante el movimiento de protones desde el espacio intermembranal hacia la matriz, utilizando la fuerza protón motriz (resultado de la transferencia de electrones desde el NADH o el

FADH₂ hasta el O₂) para generar ATP en el complejo V o ATP sintasa ⁽³⁸⁾. Este proceso genera alrededor de 36 de estas moléculas cuando la glucosa es completamente oxidada a CO₂ y H₂O.

DNA mitocondrial y función

El DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula de doble hebra con forma circular de aproximadamente 5µm ó 16600pb (16.6KB) (Holt, 2012), que se encuentra en múltiples copias dentro de una mitocondria ⁽³⁹⁾. Legros y cols. en 2004 encontraron un número de 2-8 copias de mtDNA organizadas en estructuras denominadas nucleoides. Sin embargo, el número de nucleoides detectados por célula depende de las propiedades del sistema óptico usado en su determinación. En 2011, utilizando una de las técnicas de microscopia más avanzadas se logró estimar que los nucleoides contenían alrededor de 1-2 copias de mtDNA ⁽⁴⁰⁾. Actualmente se considera que el valor promedio de copias de mtDNA es de 1.4 a 7.5 por nucleoide ⁽⁴¹⁾.

El mtDNA representa menos del 1% del material genético total de una célula ⁽³⁴⁾, en éste se encuentran codificados 37 genes, 22 tRNA, 2rRNA y 13 subunidades de la cadena respiratoria (Fig. 4). El mtDNA se hereda exclusivamente por vía materna y no posee intrones ⁽³⁸⁾. Esta última característica es la responsable de que el mtDNA tenga una tasa de mutación 10 veces mayor que el DNA nuclear ⁽²⁷⁾.

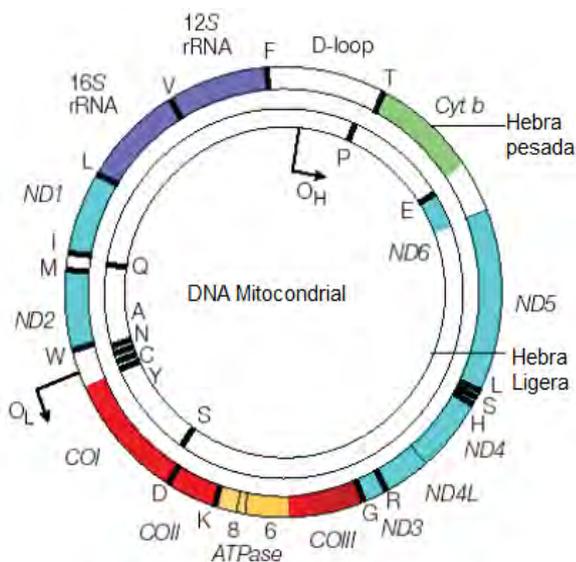


Fig. 4- Esquema del DNA mitocondrial

Modificado de Mitochondrial DNA mutations in human disease ⁽⁴²⁾.

Genes para las subunidades del complejo I (ND1-ND6) en azul, genes que codifican para el complejo III en verde, para el complejo IV (COI-COIII) en rojo, genes para las subunidades de la ATP sintasa (ATPase 6 y 8) en amarillo, RNAs ribosomales (rRNAs) 12S y 16S en púrpura, los 22 RNAs de transferencia (tRNAs) se muestran como líneas negras con su letra código al costado

D-loop. Vuelta no codificante

O_H: Origen de replicación de la hebra pesada

O_L: Origen de replicación de la hebra ligera

Replicación del DNA mitocondrial (mtDNA)

Como se mencionó anteriormente, el mtDNA se encuentra compactado en estructuras denominadas nucleoides, estas estructuras son complejos DNA-proteínas con forma ovoide y un diámetro promedio de 100nm⁽⁴³⁾. Las proteínas asociadas a los nucleoides que se han logrado determinar son las proteínas de unión al mtDNA (mtSSB), el factor de transcripción A (TFAM), DNA polimerasa G, la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT) y la helicasa Twinkle⁽⁴¹⁾. Además se sabe que estas proteínas forman parte del replisoma mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo de replicación del mtDNA aún es controversial. Actualmente, existen 3 modelos que describen este proceso: el modelo asincrónico, que sugiere que la replicación es detonada por un transcrito de la hebra L, que extiende la hebra H hasta un 70% para después exponer el origen de replicación de la hebra L y continuar la síntesis en dirección opuesta; el sincrónico que sugiere una zona de iniciación de la replicación en donde ambas cadenas se sintetizan de manera similar a la replicación del DNA de doble cadena, y el modelo RITOLS, que es muy parecido al modelo asincrónico, excepto porque sugiere que la hebra H se encuentra presente como un híbrido DNA/RNA que es sensible a la RNAsa H⁽⁴³⁾. Se considera que la replicación no coincide con el ciclo celular y ocurre independientemente de la replicación del DNA nuclear⁽³⁹⁾. Por otra parte, cómo se controla la cantidad de copias de material genético mitocondrial aún es poco claro.

Antecedentes del metabolismo de las células tumorales en hipoxia

El factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), que se estabiliza en hipoxia, es un regulador global de genes involucrados en la eritropoyesis (como la eritropoyetina EPO), la angiogénesis (por ejemplo factor de crecimiento endotelial vascular VEGF), la glucólisis anaeróbica (transportador de glucosa 1 (GLUT-1) y enzimas glucolíticas), la homeostasis celular (ejemplo la anhidrasa carbónica-9 (CA-9), la supervivencia y muerte celular⁽⁴⁴⁾.

Se ha reportado que en hipoxia aumenta el consumo de glucosa y su procesamiento por vía de la glucólisis en células de tumor mamario de ratón (EMT6/Ro) cultivadas a pH 7.25, debido a que el metabolismo oxidativo necesita de O₂ como aceptor de electrones para la producción de energía⁽⁴⁵⁾. En estudios realizados en células de feocromocitoma de rata (PC12) se observó que tras cultivar estas células en 1% de O₂ durante 24h, y medir los niveles de glutamina y glutamato a nivel celular, los niveles de glutamina en estas células incrementaban significativamente, mientras que los niveles de glutamato disminuían debido

a que la hipoxia aumenta la expresión de las enzimas glutamina sintasa (GS) y glutamato descarboxilasa (GAD) en estas células, esto provoca que aumenten los niveles de glutamina y el consumo de glutamato respectivamente. ⁽⁴⁶⁾. Por el contrario, se ha observado en células carcinoma renal (RCC4) que la estabilización de HIF1 α es suficiente para inhibir la oxidación de la glutamina ya que al cultivar estas células en 0.5% de O₂ se observó una disminución en los niveles de α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGPH), enzima que cataliza la conversión de α -cetoglutarato a succinil CoA ⁽⁴⁷⁾.

Con respecto al papel que juega la hipoxia en la proliferación de las células tumorales, se ha reportado que al cultivar las células de tumor mamario de ratón (EMTG/Ro) en una atmosfera con 2.3% de O₂, la proliferación de estas células aumentó con respecto a lo observado en normoxia ⁽⁴⁵⁾. Además en otros estudios realizados con las células de cáncer de páncreas (BxPC-3), en donde se bloqueó la expresión de HIF1 α , se observó que la proliferación de estas células se inhibió en hipoxia ⁽⁴⁴⁾. También se ha observado en células de fibroblastos de pulmón de hámster (CCL39), cáncer de cérvix (HeLa) y cáncer de colon (LSI174, DLDI) cultivadas en 1% de O₂, que la hipoxia protege de la muerte celular causada por acidosis ⁽⁴⁸⁾. Estos estudios evidencian el importante papel que tiene la hipoxia y HIF-1 α en la proliferación de las células tumorales.

Antecedentes del metabolismo de las células tumorales en acidosis

Se ha observado en cultivos de células tumorales que la acidosis láctica (disminución del pH causada por la acumulación de ácido láctico) activa la señalización del calcio, la expresión de genes relacionados con la angiogénesis (VEGF) y estabiliza a HIF-1 α ⁽⁴⁹⁾. Sin embargo, aún falta por conocer más acerca de la respuesta celular a la acidosis y las altas concentraciones de lactato en las células tumorales.

Se llevaron a cabo experimentos en donde se cultivaron líneas celulares humanas de carcinoma mamario (Bcap37), carcinoma de colon (RKO), cáncer de mama (MCF-7), carcinoma de colon (HCT116) y cáncer gástrico (SGC7901), así como la línea de cáncer de mama de ratón (4T1), en medios con bajas concentraciones de glucosa (3mM) en combinación con una de las siguientes condiciones: acidosis láctica (medio de cultivo con ácido láctico, concentración de 20mM, pH 6.7), lactosis (medio de cultivo con lactato de sodio, concentración de 20mM, pH 7.4) o acidosis (medio de cultivo con HCl, pH final de 6.7). Se observó que las células 4T1 cultivadas en medios con bajas concentraciones de

glucosa y lactosis ácida presentaron un consumo bajo de glucosa sin generación neta de lactato, lo que implica un aumento en la eficiencia de la utilización de glucosa. Por otra parte, se observó que tras agotarse la glucosa, la acidosis láctica incrementó el tiempo de supervivencia de las líneas tumorales utilizadas en comparación con la condición control. Además, se observó que cuando se cultivó en lactosis sin acidosis no se extendió el tiempo de supervivencia de las células, mientras que al cultivar en acidosis si se prolongó el tiempo de vida de las células, aunque no de manera tan potente como en la condición de acidosis láctica. Por último, los autores observaron que la acidosis láctica causa arresto de las células tumorales en la fase G0/G1. Concluyendo que la acidosis láctica es un potente factor de supervivencia que permite a las células desarrollar resistencia a la falta de glucosa ^(50,51).

Por otro lado, estudiando el efecto de la acidosis (pH 6.7) sobre el metabolismo de la glucosa y glutamina en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, ZR-75-1, T47D, MDA-MB231, MDA-MB-157) se observó que la acidosis incrementó la producción CO₂ mientras que disminuyó la producción de lactato y la síntesis de ribosas a partir de glucosa en comparación con las células cultivadas en la condición control (pH 7.4). Además, cuando se cultivaron estas mismas células en medio con glutamina y acidosis se encontró que disminuyó la producción de lactato e incrementó la síntesis de ácidos ribonucleicos a partir de glutamina. Concluyendo que la acidosis disminuye el metabolismo de la glucosa, pero incrementa el uso del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la glutaminólisis desarrollando una mayor dependencia del metabolismo mitocondrial ⁽⁵²⁾.

Modificaciones encontradas en las mitocondrias de las células tumorales

De acuerdo con Otto Warburg, la elevada producción de lactato por parte de las células tumorales es producto de un daño permanente en la función mitocondrial. Sin embargo, en diversos estudios se ha encontrado que la función mitocondrial en algunos tumores está intacta ^(28, 53,54). A pesar de que, en estudios realizados en una amplia variedad de tumores, se han encontrado alteraciones como cambios en el tamaño, forma y funcionabilidad de las mitocondrias, el mtDNA mitocondrial puede presentar más de 270 mutaciones puntuales; además de rearrreglos (deleciones, duplicaciones e inversiones) y modificaciones en el número de copias de mtDNA ^(55,56). Las alteraciones en el mtDNA y los cambios en la distribución de las mitocondrias tienen un impacto directo sobre la funcionalidad mitocondrial y en la homeostasis celular ⁽⁵⁷⁾. Sin embargo, los mecanismos

mediante los cuales contribuyen en la patogénesis del cáncer aún se encuentran en estudio.

Disminución en el número de copias del mtDNA.

Se sabe que el número de copias de mtDNA para un mismo tipo de tejido tiene un valor constante ^(39, 58). Sin embargo, se han encontrado niveles disminuidos de esta molécula en muestras de tejido tumoral proveniente de pacientes con cáncer renal, gástrico, de mama, laringe, hepático, cáncer de pulmón de células no pequeñas y sarcoma de Erwin, al comparar la cantidad de mtDNA presente en el tejido tumoral contra la cantidad de mtDNA de células vecinas sanas ^(59,60,61,62,63,64,65,66;67).

Experimentos en donde se ha eliminado el mtDNA de las células tumorales A-549, MCF-7, y células no tumorales de músculo esquelético murino (C2C12) mediante tratamiento con bromuro de etidio, se observó un aumento en la expresión del ARNm y proteína de los marcadores de la tumorigénesis, L-catepsina y TGF β en las células tumorales C2C12 también se observó un aumento en el grado de invasión en ambas líneas. Además, la resistencia a tamoxifen, un fármaco anti-estrógenos, aumentó en la línea de cáncer de mama MCF-7. Concluyendo que el estrés mitocondrial induce cambios fenotípicos de carácter invasivo, la expresión de marcadores tumorales y la resistencia a apoptosis. Además, los autores pudieron relacionar la expresión de L-catepsina con la invasión tumoral durante condiciones de estrés mitocondrial genético y metabólico ^(57,68,69).

Lo anterior concuerda con estudios realizados en cáncer de laringe, colorrectal y gástrico en donde se estudió el papel del mtDNA en la progresión y metástasis del tumor. Se comparó el número de copias de mtDNA en muestras de tejido tumoral con diferentes estadios de la enfermedad respecto a la cantidad de mtDNA en tejido sano del mismo individuo. En estos estudios se ha encontrado una cantidad menor de mtDNA en estados avanzados del cáncer, encontrando una correlación negativa entre el número de copias de mtDNA y el grado de invasión ^(61,62).

A pesar de todos los estudios anteriores el origen de la disminución en la cantidad del mtDNA aún es controversial. En un estudio se compararon los niveles de expresión de las proteínas de la biogénesis mitocondrial PGC-1, NRF-1, mtTFA, mtssB, el número de copias de mtDNA y las mutaciones encontradas en la región D-loop del mtDNA presentes en muestras de tejido con carcinoma hepatocelular comparando estos parámetros en tejido

sano circundante. Se encontró que con excepción de NRF-1, mtTFA y mtssB la expresión de las demás proteínas de la biogénesis mitocondrial estaba disminuida. También se encontró que alrededor del 39.3% de los casos de carcinoma hepatocelular estudiados poseían mutaciones en la región D-loop, y que el número de copias de mtDNA estaba significativamente reducido en el 70% de los tumores que presentaban este tipo de mutaciones. Con base en esto los autores sugirieron que mutaciones en la región D-loop, un número reducido de copias de mtDNA y daños en la biogénesis mitocondrial son eventos importantes durante el proceso de carcinogénesis ⁽⁶⁴⁾.

Por otra parte se ha estudiado la relación entre el riesgo de padecer cáncer y la cantidad de mtDNA en pacientes con cáncer colorrectal y de mama, comparando la cantidad de mtDNA presente en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer obtenidas antes y después del diagnóstico de la enfermedad, contra la cantidad de mtDNA en sangre proveniente de sujetos sanos. Estos estudios sugieren que niveles bajos de mtDNA están asociados con el riesgo a padecer cáncer ^(70, 71).

Aumento en los niveles de mtDNA.

Contrario a lo descrito anteriormente, algunos autores han encontrado un incremento en la cantidad de mtDNA en muestras de tejido con adenocarcinoma de endometrio, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar y tiroideo en comparación con su contraparte sin cáncer ^(65,72,73,74). Los mecanismos moleculares por los que esta molécula se incrementa aún son poco claros. Sin embargo, se ha propuesto que este incremento podría ser el resultado de la exposición prolongada a condiciones de estrés y mutaciones en el mtDNA a través del tiempo ^(70,75). En estos estudios se observó un aumento en el mtDNA de las células pre-apopticas de la línea de cáncer de pulmón A-549 y de carcinoma nasofaríngeo HNE2 cuando se trataron con cisplatino y doxorubicina ⁽⁷⁶⁾. Además al eliminar el mtDNA de las líneas antes mencionadas, así como el de la línea de glioma (DBTRG.05MG) y la línea de mama (MCF-7) mediante un tratamiento con bromuro de etidio o mediante el bloqueo la expresión de TFAM con plásmidos, se observó una disminución en la capacidad de invasión de estas células tumorales y un incremento en la sensibilidad a quimioterapia ⁽⁷⁶⁾.

Por otra parte, en muestras de tejido con adenocarcinoma de endometrio se ha encontrado un incremento del doble de la cantidad de mtDNA en comparación con muestras de endometrio normal; observando que en los casos en donde se tenía una mutación (par

303) en mtMSI (Mitochondrial Microsatellite Instability) en donde la cantidad de mtDNA fue significativamente mayor en los casos en que la mutación no se tenía ⁽⁷³⁾.

Por otra parte, estudios donde se ha evaluado la asociación entre la cantidad de mtDNA en sangre periférica y el riesgo a padecer cáncer han demostrado que un alto contenido de mtDNA en sangre periférica puede estar asociado con cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de mama y linfoma no-Hodking; tras la comparación de los valores de mtDNA en sangre periférica, antes y después del diagnóstico de cáncer respecto a los valores obtenidos en muestras de sangre periférica de pacientes sanos ^(77,78,79,80,81).

Dinámica mitocondrial en células normales

Las mitocondrias son organelos altamente dinámicos. Mediante los procesos de fusión y fisión pueden existir como parte de una extendida red reticular, o de manera individual con diferentes morfologías ⁽⁸²⁾. Los procesos de fusión y fisión mitocondrial están regulados por las moléculas Mfns (mitofusinas) y Drp1 (dynamin related protein 1), respectivamente ⁽⁸³⁾. (Las mitocondrias están ancladas al citoesqueleto y se mueven a través de los microtúbulos con ayuda de proteínas motor ⁽⁸²⁾. Las proteínas motor pertenecen a las superfamilias de la quinesina y dineina, que en neuronas llevan a cabo los procesos de transporte anterógrado y transporte retrogrado ⁽⁸⁴⁾.

En células no invasivas, las mitocondrias suelen existir como una red de tubos interconectados. Sin embargo, las mitocondrias de las células metastásicas se encuentran produciendo energía por lo que necesitan ser distribuidas a las regiones con altas demandas de energía. Una dinámica mitocondrial alterada se ha relacionado con una fisiología mitocondrial alterada y funciones celulares anormales, que están implicadas en varias enfermedades humanas. El desbalance entre las fusión y fisión desregula eventos clave en los procesos celulares que potencialmente contribuyen a la tumorigénesis ⁽⁸³⁾.

Alteraciones en la forma y en la distribución de las mitocondrias en cáncer.

Evidencia creciente indica una relación entre la producción de energía y la organización de la red mitocondrial. Se ha reportado que al cultivar a la línea tumoral HeLa, en medio con galactosa, las mitocondrias se encontraban formando una red reticular mientras que, al cultivarla en un medio rico en glucosa la morfología mitocondrial era más tubular ⁽⁸⁵⁾. Por el contrario, al cultivar en galactosa a las células no transformadas MRC-5 no se observaron

cambios en su morfología mitocondrial pero proliferaron menos. En el mismo estudio, al cultivar en galactosa a la línea tumoral HeLa se encontró un incremento en la expresión de las subunidades de la cadena respiratoria (CIV5a, CI20, CI30, CV, CII), la expresión de citrato sintasa, la piruvato deshidrogenasa subunidad 1 y la porina; mientras que la cantidad de mtDNA, la expresión de las enzimas de la glucólisis HK I, HK II y el transportador Glut1 no se modificaron en comparación con los cultivos en glucosa. Concluyendo que la línea celular tumoral HeLa puede adaptarse y generar ATP por fosforilación remodelando sus mitocondrias, además proponen que esto podría ser un fenómeno general de las células tumorales ⁽⁸⁵⁾.

También se ha evaluado la morfología de las mitocondrias en las líneas de cáncer pulmonar (A-549, H1993, Hcc827, H358) cultivadas en medios RPMI-1640 ó F12-K suplementados con 10% de suero fetal bovino, también se evaluó la morfología mitocondrial de células no tumorales procedentes de las vías respiratorias (hSAEC), de los bronquios (hBEC) y de arteria pulmonar (hPAEC). En estas condiciones se observó que las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón presentan una fragmentación mitocondrial mayor, en comparación con las células no tumorales. Este fenómeno se asoció con dos distintas anomalías: la primera, una disminución en los niveles de expresión del mediador de la fusión Mfn-2; y la segunda, un incremento en la expresión del regulador de la fisión Drp-1. Ya que al bloquear Drp-1 o al aumentar la expresión de Mfn-2 se restableció la formación de la red mitocondrial en las células tumorales de pulmón; ocasionando un incremento en la apoptosis y una reducción tanto en la proliferación de las líneas celulares como en la progresión tumoral *in vivo*. Sin embargo, en imágenes de tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) no se observó una disminución significativa en el consumo de glucosa de las células tumorales después de reestablecer la red mitocondrial ⁽⁸⁶⁾. En este estudio, los autores remarcan que es necesario mejorar las terapias dirigidas contra el metabolismo de las células tumorales, estableciendo terapias que favorezcan la fosforilación oxidativa, aumenten la apoptosis y la formación de la red mitocondrial en las células tumorales.

En otro estudio, se observó que al bloquear la expresión de Drp-1 mediante siRNA las mitocondrias de las células HeLa presentaron una forma parecida a ramas, que no presentaron las células en donde no se bloqueó la expresión de Drp-1. Además se

encontró que al bloquear Drp-1, la proliferación de la línea celular tumoral HeLa en medios con glucosa disminuyó, mientras que en medios sin glucosa estas mismas células fueron incapaces de proliferar. En este mismo estudio, se llevó a cabo la caracterización de la red mitocondrial en células no tumorales MRC-5 cultivadas en galactosa y glucosa al ser tratadas con diferentes concentraciones de rotenona. Cuando se cultivó a MRC-5 en galactosa, se observó que las mitocondrias se volvieron circulares y comenzaron a morir a concentraciones de 4-6 ng/ μ l de rotenona mientras que a concentraciones mayores a 6ng/ μ l se observó un aumento en la muerte celular y fragmentación de la red mitocondrial; por el contrario, cuando MRC-5 se cultivó en glucosa estos eventos se observaron con mayores concentraciones del fármaco, concluyendo que la morfología de la red mitocondrial está relacionada con la producción mitocondrial de energía (capacidad de crecer en medios de cultivo sin glucosa) y puede modificarse como consecuencia de la funcionabilidad de OXPHOS como un mecanismo compensatorio, sugiriendo que la morfología circular de las mitocondrias puede ser un signo de estrés metabólico, mientras que la fragmentación de la red mitocondrial está más relacionada con la muerte celular ⁽⁸⁷⁾.

En un estudio muy extenso se investigó cómo alteraciones en el proceso de fusión afectan la cantidad de mtDNA y la funcionalidad mitocondrial. En éste los autores bloquearon los genes para Mfn1 y Mfn2, que codifican para mitofusinas, en músculo esquelético de ratones MLC-cre, encontrando que cuando se eliminaban ambos genes (MLC-cre/dm), los ratones morían después de 6-8 semanas y su peso era solo del 30-50% respecto a los controles. Además estos ratones presentaban bajos niveles de glucosa en sangre y altos niveles de lactato en suero lo que sugería que tenían un alto consumo de glucosa para producir energía, incrementando la glicólisis en vez de utilizar la fosforilación oxidativa. Al analizar muestras del músculo esquelético de los ratones MLC-cre/dm, se encontró que tenían un menor tamaño en comparación con los controles y un incremento en la masa mitocondrial, que se asoció con la fragmentación mitocondrial. Adicionalmente, se utilizaron tinciones para los complejos de la cadena respiratoria y el citocromo C oxidasa (COX) (codificados por el mtDNA) y para la succinato deshidrogenasa SDH (codificada por el DNA nuclear) observando una disminución de COX en los ratones MLC-cre/dm; esto concordó con un menor número de copias de mtDNA en estos ratones en comparación con ratones no tratados. Además, los ratones MLC-cre/dm tenían 5 veces más mutaciones puntuales y 14 veces más deleciones en el mtDNA en comparación con los animales

control. Con esto, los autores concluyeron que la fusión mitocondrial salvaguarda la función del mtDNA a través de distintas vías ⁽⁸⁸⁾.

En otro estudio, evaluando el proceso de fisión mitocondrial, bloquearon la expresión de Drp1 (dynamin related protein 1), mediante siRNAs en tres líneas de cáncer de mama dos líneas con potencial invasivo (MDA-MB-231, MDA-MB-436) y una línea no invasiva (MCF-7) lo que ocasionó que las mitocondrias se volvieran tubulares y elongadas. Al evaluar la invasión, ésta disminuyó del 50% al 70% en las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-436. Más, al transfectar las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-436 para que sobre-expresaran la proteína Mfn1, se observó que la migración y la invasión de estas células disminuyó del 25% al 50%. Adicionalmente, se analizó la presencia de la proteína Drp1 mediante la técnica de inmunohistoquímica en muestras de tejido con cáncer de mama y se comparó con lo encontrado en tejido no tumoral adyacente, observando que la intensidad de tinción para esta proteína era mayor en zonas de metástasis a los nódulos linfáticos ⁽⁸³⁾. Estos resultados sugieren que el proceso de fisión está relacionado con la metástasis mientras que la fusión está relacionada con fenotipos no invasores.

En otro estudio, con el fin de conocer la relación entre la distribución de las mitocondrias, los microtúbulos y la quinesina kif5B, se eliminó la expresión del gen kif5B en embriones de ratón lo que fue letal. En estas condiciones y al teñir microtúbulos y mitocondria, se observó que la distribución de los microtúbulos no correspondía totalmente con la distribución de las mitocondrias, las cuales se encontraban en una distribución perinuclear, por lo que concluyen que la expresión de kif5B es esencial para la dispersión mitocondrial y lisosomal. Por otra parte, para examinar como las mitocondrias están ancladas a los microtúbulos, se obtuvieron células de embrión sin el gen Kif5B para su cultivo y se trataron con nocodazol, un fármaco despolimerizador de los microtúbulos, cuando los microtúbulos fueron completamente despolimerizados se observó que las mitocondrias, antes ubicadas en la región perinuclear, se dispersaron por el citoplasma. De acuerdo con los autores, estos datos sugieren que las mitocondrias están ancladas a los microtúbulos aún sin la proteína KIF5B. Sin embargo, argumentan que las mitocondrias pueden estar ancladas a otras proteínas como los motores del microtúbulo o proteínas no motores asociadas al microtúbulo ⁽⁸⁹⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de pulmón y el cáncer de mama ocupan los primeros lugares tanto en incidencia como en mortalidad a nivel mundial. Actualmente, el estudio del metabolismo de las células tumorales ha cobrado gran interés, después de que varios reportes cuestionan el efecto Warburg.

El científico alemán Otto Warburg observó que las células tumorales presentaban un incremento en la glucólisis para la obtención de energía con una elevada producción de ácido, aún cuando el oxígeno disponible era suficiente para llevar a cabo la oxidación de la glucosa (Efecto Warburg), este fenómeno lo relacionó con una disminución en la capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa posiblemente debido a un daño en las mitocondrias de estas células. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la funcionalidad mitocondrial permite a las células tumorales sobrevivir y adaptarse al microambiente, también se propone que puede ser la clave para encontrar tratamientos con mayor probabilidad de éxito. Es por esto que en este trabajo el papel en la dinámica mitocondrial y su relación con la supervivencia celular en líneas celulares de cáncer de pulmón y de mama cuando se cultivan en diferentes condiciones de estrés.

HIPÓTESIS

Si se cultiva a las células tumorales A-549, A-427 y MCF-7 en diferentes condiciones de estrés metabólico; entonces, se modificará la proliferación de las células tumorales y la dinámica mitocondrial de manera distinta a un modelo de células no tumorales (fibroblastos MRC-5).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de la variación en las condiciones de crecimiento sobre la dinámica mitocondrial y la proliferación celular. Con el fin de encontrar una posible asociación entre ambas.

Objetivos particulares

- Llevar a cabo la cinética de crecimiento de la línea tumoral MCF-7 en diferentes condiciones de crecimiento variando la fuente de carbono, el pH y la concentración de oxígeno.
- Evaluar la cantidad de mtDNA en las líneas celulares A-549, A-427, MCF-7 y de fibroblastos de pulmón (MRC-5) en diferentes condiciones de fuente de carbono (glucosa o lactato), pH (6.2 y 7.2) y tensión parcial de oxígeno (normoxia e hipoxia).
- Observar la distribución mitocondrial en las líneas celulares A-549, A-427, MCF-7 y de fibroblastos de pulmón (MRC-5) en diferentes condiciones de fuente de carbono (glucosa o lactato), pH (6.2 y 7.2) y tensión parcial de oxígeno (normoxia e hipoxia).
- Establecer si las condiciones de cultivo modifican de manera simultánea la cantidad de mtDNA y la distribución de las mitocondrias de las líneas tumorales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

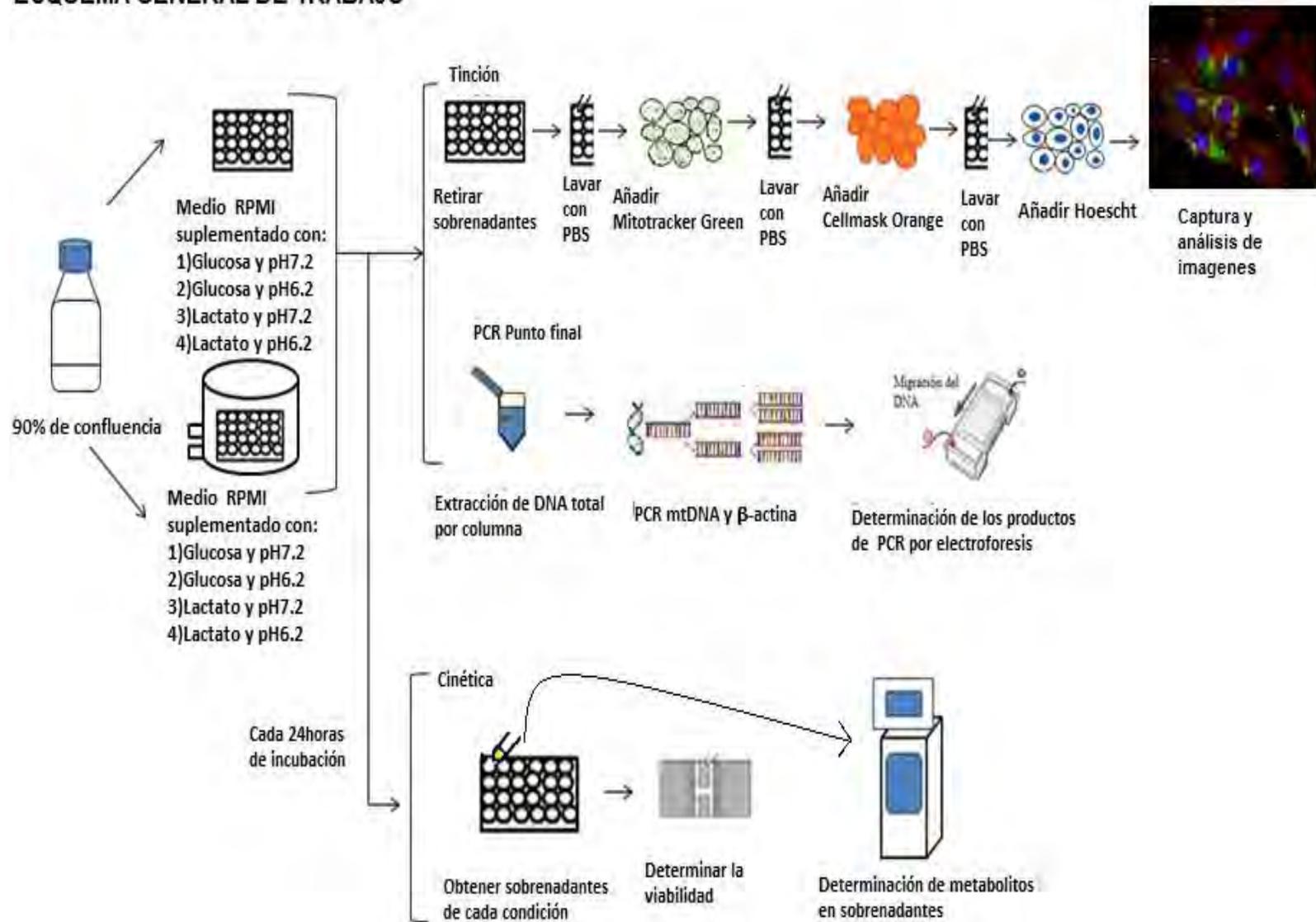
Se utilizaron medios de cultivo RPMI-1640 con glucosa y sin glucosa (Sigma-Aldrich, st. Louis, MO USA). Al medio RPMI-1640 sin glucosa se le agregó L-lactato (30 mmol/L). Ambos medios fueron suplementados con una solución de antibióticos 10000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomina (Sigma-Aldrich, st. Louis, MO USA). Los medios se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Thermo scientific, Logan, Utah, USA). Se utilizó una solución de Tripsina al 0.05% y Verseno al 0.05% libre de calcio y magnesio (In vitro, D.F, México). También se utilizó azul tripano (Sigma-Aldrich, st. Louis, MO USA) para determinar la viabilidad. Para la extracción de DNA total (nuclear y mitocondrial) se utilizó el kit ZR-Duet DNA/RNA miniprep (Zymo Research, Irvine, CA. USA).

Con el fin de identificar las mitocondrias, se utilizó el fluorocromo Mitotracker Green (Invitrogen, Carlsbad California, USA) el núcleo se tiñó con Hoechst (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) y la membrana plasmática con Cellmask Orange (life technologies, Carlsbad California, USA)

Equipos

Para la cuantificación de mtDNA se usó el termociclador Mastercycler® ep (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Para la cuantificación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato se utilizó el analizador bioquímico YSI 2900 (Life Sciences, Ohio, USA). Para el cultivo de las líneas celulares en condiciones de normoxia se usó la incubadora Panasonic Sterisonic MCO-19AIC CO₂/O₂ (Panasonic Healthcare Corporation, Wood Dale, USA), mientras que para incubar en condiciones de hipoxia se utilizó una cámara de incubación modular (Billups-Rothenberg, San Diego, USA). Para observar el crecimiento celular se utilizó un microscopio invertido digital EVOS FL Imaging System (Thermo scientific, Logan, Utah, USA).

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de pulmón A-549 y A-427, la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y células de fibroblastos MRC-5. Todas fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection). Las líneas celulares fueron cultivadas en cajas T25 con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino y antibióticos e incubadas en una atmósfera de 5% de CO₂ y 21% de O₂ a una temperatura de 37°C.

Condiciones de cultivo para los ensayos

Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos usando una concentración de 100 000 células/ml utilizando las condiciones de cultivo establecidas en la siguiente tabla.

Normoxia (21% de O ₂ y 5 % de CO ₂)		Hipoxia (2% de O ₂ , 5 % de CO ₂ y 93% de N ₂)	
Fuente de carbono	pH	Fuente de carbono	pH
Glucosa	7.2	Glucosa	7.2
Glucosa	6.2	Glucosa	6.2
Lactato	7.2	Lactato	7.2
Lactato	6.2	Lactato	6.2

Tabla 1. Condiciones de cultivo

Determinación de la viabilidad

La viabilidad de las células tumorales se midió utilizando el método de azul tripano. Este es un colorante ácido que contiene 2 grupos azo y se encuentra cargado negativamente. Esta característica le permite reaccionar con la región interna de las células cuando la membrana celular se encuentra dañada. Las células muertas que incorporan el colorante se observan de color azul, mientras que las células viables permanecen sin teñir ⁽⁹⁰⁾.

Cuando las células llegaron a confluencia, se retiró el medio de cultivo mediante vacío y las células se desprendieron incubándolas con aproximadamente 1ml de tripsina a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se inactivó la tripsina utilizando el medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, st. Louis, MO USA). Por último, una alícuota de la suspensión celular se mezcló con una solución de azul tripano en una proporción 1:1 (vol.

/vol.) y se contaron las células en la cámara de Neubauer, distinguiendo entre vivas y muertas. Al finalizar se calculó el porcentaje de viabilidad de la siguiente manera.

$$\% \text{ de células vivas} = \# \text{ células vivas} \times 100 / \text{Cuenta total de células.}$$

Caracterización cinética de la línea celular tumoral MCF-7

Las células tumorales MCF-7 se cultivaron en las 8 diferentes condiciones de estrés (Tabla. 1) durante 48 horas, pasado este tiempo se desprendieron de las placas de 24 pozos de la siguiente manera. Primero se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se almacenó en tubos eppendorf para su posterior análisis; a cada pozo se añadieron 4 gotas de tripsina a las células y se incubaron durante 2:30 min. a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. Pasado este tiempo se inactivó la tripsina con 1ml de medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino y antibióticos (Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA). La suspensión celular obtenida se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml. Por último, los pozos donde se encontraban las células se lavaron con 500µl de PBS, los cuales se adicionaron junto con la suspensión celular en el tubo eppendorf.

Las células provenientes de cada una de las 8 condiciones se tiñeron con una solución de azul tripano en relación 1:1, y se contaron en una cámara de Neubauer. El conteo de las células se llevó a cabo en los cuatro cuadrantes para linfocitos (Fig. 5). Además se calcularon las velocidades específicas de crecimiento de la línea celular MCF-7 esto se llevó a cabo utilizando el tiempo que duró la primera fase exponencial de crecimiento en cada condición de cultivo; se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) mediante la fórmula $\mu = \ln 2 / \text{tiempo de duplicación}$.

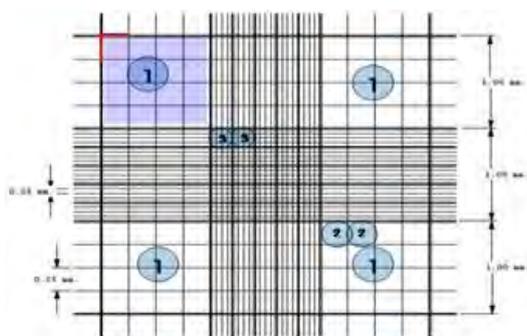


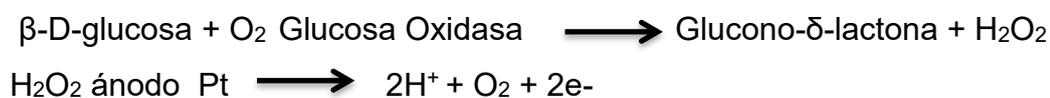
Figura 5. Cámara de Neubauer. Las células tumorales se contaron el área marcada con el número 1, las células que caían dentro de los ejes marcados con rojo se consideraron dentro de la cuenta

Por último, se determinó la cantidad de células vivas mediante la siguiente fórmula:

$$\# \text{ Células por ml} = \frac{(\# \text{ células vivas})}{(\# \text{ Cuadrantes contados})} \frac{(\text{Factor de dilución})}{(\text{Volumen en mL})}$$

Determinación de la concentración de glucosa, lactato, glutamina, glutamato en los sobrenadantes usando el analizador bioquímico YSI

La determinación de los metabolitos arriba mencionados se llevó a cabo utilizando el analizador bioquímico YSI 2900 (Life Sciences, Ohio, USA). Este analizador utiliza enzimas del tipo oxidasa inmovilizadas dentro de una membrana, para generar H₂O₂ que posteriormente es oxidado por un ánodo de platino con el fin de producir un flujo de electrones [Ecuación 3].



[Ecuación 3. Reacciones en la membrana del analizador bioquímico YSI para la cuantificación de glucosa]

Antes de determinar la concentración de glucosa y lactato se preparó un calibrador con 2.5g/L de glucosa y 0.5g/L de lactato disueltos en buffer YSI 1X, mientras que, en el caso de la determinación de glutamina y glutamato se prepararon de forma separada calibradores de glutamina 8mmol/L y de glutamato 10mmol/L cada uno disuelto en buffer YSI 1X. El buffer YSI 1X contiene: EDTA (65g), Benzoato de sodio (1.3g), Fosfato de disódico (1.6g), fosfato de monosódico (7.7g) y cloruro de sodio (3g).

Para determinar la concentración de los diferentes metabolitos primero se cargaron los calibradores necesarios, y se calibró el equipo. Posteriormente los sobrenadantes de cada una de las 8 condiciones se descongelaron, se agitaron ligeramente y se centrifugaron. Inmediatamente después se cargaron 125µl de cada sobrenadante por pozo en una placa de 96 pozos que después se introdujo en el equipo YSI 2900 para su lectura.

Aislamiento del DNA total (DNAg y mtDNA) de los cultivos

Después de incubar las células durante 48h en las condiciones arriba mencionadas (Tabla 1), se obtuvo el DNA total de la siguiente manera.

Se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se adicionó 1mL del buffer de lisis directamente sobre la monocapa celular, la solución resultante se transfirió a una columna zymo-spin III, y se centrifugó (13,000 rpm durante 1 min). El siguiente paso fué adicionar 200µL de DNA prep buffer y centrifugar. Después se añadieron 200µL de DNA pre-wash y se centrifugó nuevamente, se adicionaron 500 µL de g-DNA Wash Buffer a la columna, que en esta ocasión se centrifugó primero a 13,000 rpm durante 1 min, y después a la misma velocidad durante 2 min.

Finalmente se añadieron 50 µL de agua libre de RNAsas y DNAsas directamente en la matriz de la columna, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a velocidad máxima durante 30 seg. El material genético obtenido fue almacenado a -20°C.

Cuantificación relativa del mtDNA por PCR de punto final

La técnica de PCR utiliza una DNA polimerasa termoestable para generar varias copias de una secuencia específica de DNA, mediante ciclos alternados de altas y bajas temperaturas (Fig. 6) ^(91,92).

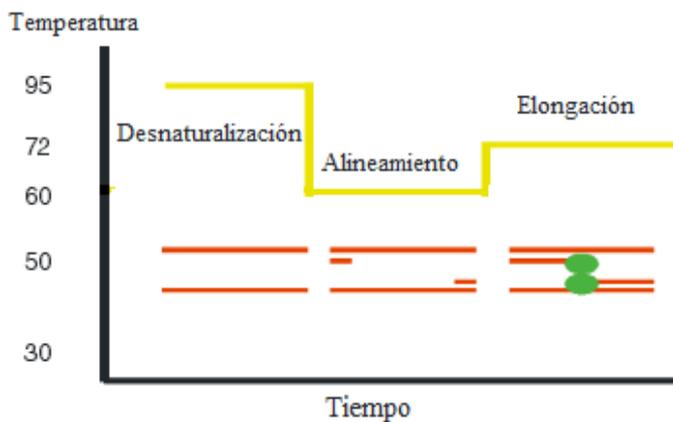


Figura 6 Esquema de reacción de PCR. Las altas temperaturas separan las hebras de DNA y, a continuación, las bajas temperaturas permiten la unión de los primers específicos, un último aumento de temperatura permite que la polimerasa continúe copiando el DNA.

Modificado de Real-time polymerase chain reaction⁽⁹²⁾.

Durante la determinación de mtDNA se utilizó al gen endógeno β-actina como control. Primero, se prepararon dos mezclas de reacción una para mtDNA y otra para β-actina, cada mezcla se preparó como lo muestra la Tabla 2, excepto el templado. Las mezclas se homogenizaron y centrifugaron con el fin de transferir alícuotas de 24 µL en tubos

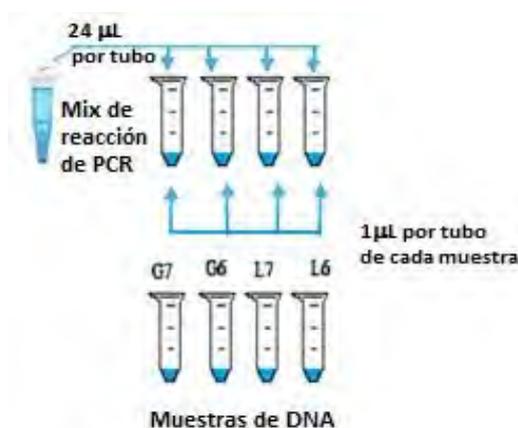


Figura 7. Esquema de trabajo. Durante los ensayos de PCR. En cada condición se realizaron 2 reacciones, una para mtDNA y otra para β-actina

ependorf. Después se agregó 1µL de DNA procedente de cada condición en los diferentes tubos, tal y como se esquematiza en la Figura 7. Por último, se realizó la electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa 1.2x usando 4 µL de bromuro de etidio para detectar el DNA, el bromuro de etidio se intercala en las hebras de DNA y cuando se expone a la luz UV emite fluorescencia.

Reactivo	Concentración del stock	Volumen para una reacción de PCR
PCR Buffer libre de magnesio.	10X	2.5 µL
MgCl ₂	50mM	1 µL
dNTP's	25 mM	0.2 µL
Primer Forward	5nM	1.5 µL
Primer Reverse	5nM	1.5 µL
Taq Polimerasa	-----	0.25µL
H ₂ O estéril	-----	-----
Templado	-----	1 µL
	Volumen final	25 µL

Tabla 2. Reactivos para una reacción de PCR de punto final.

Tinción mitocondrial

Las mitocondrias se observaron de un color verde debido a que el fluorocromo utilizado (Mitotracker Green) es un colorante que se oxida en el ambiente lipídico mitocondrial adquiriendo un grupo tiol, este grupo funcional le permite adherirse a la membrana mitocondrial tiñendo a las mitocondrias de color verde; Por otra parte el colorante Hoechst que es un derivado del bisbenzimidazol se utilizó debido a que una vez dentro del núcleo tiñe los ácidos nucleicos ricos en adenina y timina, que dan al núcleo una coloración azul; Por último, el fluorocromo Cellmask Orange posee una parte lipófilica que le permite atravesar la membrana plasmática y una parte hidrofílica que le permite anclarse a la membrana celular, logrando dar una coloración naranja a la membrana celular.

Primero, se prepararon 800 μL de Mitotracker Green (250 nM), Cellmask Orange (1X) y de Hoechst (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectivamente. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de los cultivos, se lavaron las células con 500 μL de PBS y se agregaron 100 μL /pozo de MitotrackerGreen para teñir las mitocondrias, se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después, nuevamente se lavaron las células con 500 μL de PBS y se agregaron 100 μL de Cellmask Orange, que se incubó durante 5 minutos a 37°C. Por último las células se lavaron nuevamente y se adicionaron 100 μL de colorante Hoechst que se incubó durante 10 minutos a 37°C. Inmediatamente después de la incubación, las células fueron observadas en el microscopio EVOS FL Imaging System.

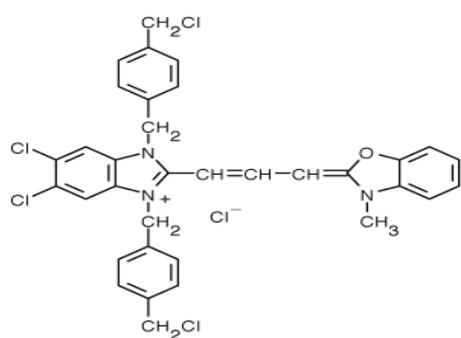


Figura.8 Estructura molecular de MitotrackerGreen FM. El grupo cloro metil en la estructura de MitotrackerGreen reacciona para formar un tiol, una vez que la molécula sufre oxidación en el ambiente mitocondrial.

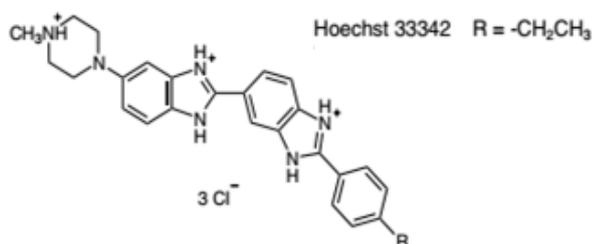


Figura. 9 Estructura base de los colorantes Hoechst.

RESULTADOS

La línea celular de cáncer de mama (MCF-7) presentó cambios en su actividad metabólica en condiciones de acidosis e hipoxia.

Se sabe que uno de los factores que contribuyen a la evolución y adaptación de las células tumorales son las condiciones a las que están expuestas en el microambiente tumoral. Diversos autores han estudiado el microambiente tumoral en los tumores sólidos y han encontrado que este ambiente se encuentra caracterizado por bajas tensiones de oxígeno, acidez extracelular y altas concentraciones de lactato como consecuencia del aumento en el consumo de glucosa (93).

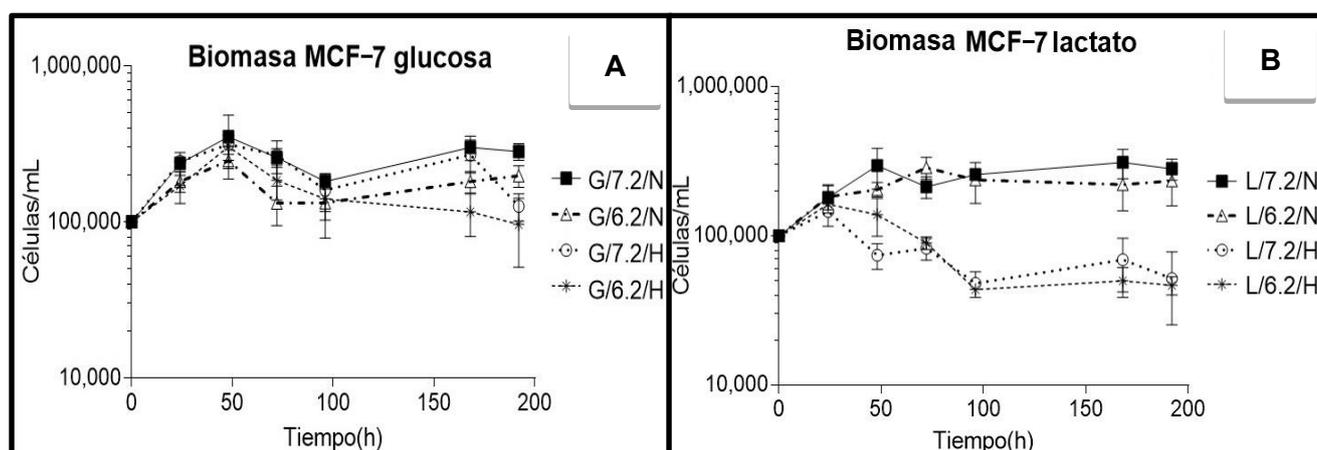


Figura 10.- Curvas de crecimiento celular de la línea MCF-7 en glucosa (A) y lactato (B). Se llevó a cabo el conteo de las células viables usando el colorante de exclusión azul tripano. G: glucosa, L: lactato, N: normoxia, H: Hipoxia, 7: pH 7.2, 6: pH 6.2. La barra representa el SEM de al menos dos cultivos independientes.

Al utilizar glucosa como fuente de carbono se observó que a pH 7.2 las células proliferaron de manera similar en condiciones de normoxia e hipoxia durante las primeras 48h. De forma interesante se observó que durante el crecimiento de MCF-7 en medio con glucosa se observaron dos fases de crecimiento (excepto en la condición G/pH6.2/H), la primera duró hasta las primeras 48h y la segunda inició después de 96h (fig. 10 A). Por último, cuando se utilizó lactato como fuente de carbono se observó que las células proliferaron más en normoxia en comparación con hipoxia.

Al calcular la velocidad específica de crecimiento (μ), observamos que la línea celular crece más rápido en medios con pH 7.2 en condiciones de normoxia, o en condiciones de hipoxia en medios con pH 6.2. De forma interesante encontramos que esta línea celular crece con

la misma velocidad usando glucosa ($\mu=0.02228$) o lactato ($\mu=0.02177$) en condiciones de normoxia.

Condiciones	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})			
	G 7.2	G 6.2	L 7.2	L 6.2
Normoxia	0.02228 (48h)	0.01704 (48h)	0.02177 (48h)	0.01246 (72h)
Hipoxia	0.01916 (48h)	0.02342 (48h)	0.01573 (24h)	0.0204 (24h)

Tabla 3. Velocidades específicas de crecimiento de la línea celular MCF-7 en diferentes fuentes de carbono, tensión de oxígeno y pH. Estos valores se calcularon utilizando el tiempo que duró la primera fase exponencial de crecimiento en cada condición de cultivo. G: glucosa, L: lactato, 6: pH6.2, 7: pH 7.2

Una característica metabólica común de las células tumorales es que consumen grandes cantidades de glucosa, que es convertida principalmente en lactato aún en presencia de oxígeno (Efecto Warburg). Además, las células tumorales pueden presentar otras alteraciones en importantes vías metabólicas como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la glutaminólisis, la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la vía de las pentosas fosfato ⁽⁹⁴⁾. Por lo anterior, se determinó como las células de cáncer de mama (MCF-7), consumían la glucosa, lactato, glutamato y glutamina presentes en el medio de cultivo en las ocho diferentes condiciones de crecimiento.

En los medios con glucosa se observó que el consumo de este carbohidrato, fue ligeramente mayor en la condición G/pH7.2/H durante las primeras 96h. Sin embargo, pasado este tiempo se observó que el consumo de glucosa se detuvo en prácticamente todas las condiciones excepto en la condición G/pH7.2/N en donde los niveles de glucosa descendieron hasta cerca de cero (Fig. 11 A).

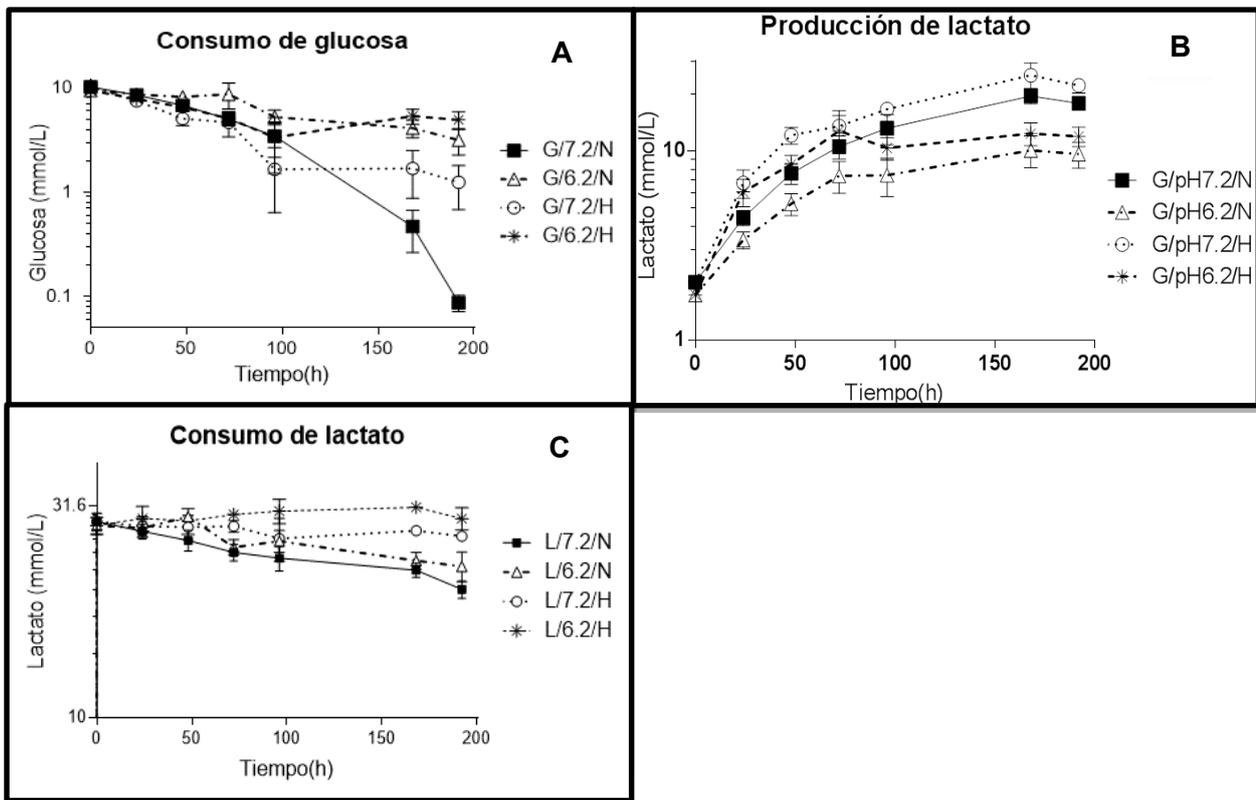


Figura 11. Cinéticas de, consumo de glucosa y lactato, y producción de lactato de la línea MCF-7.. Consumo de glucosa (A), producción de lactato (B) y consumo de lactato (C). G: glucosa, L: lactato, N: normoxia, H: Hipoxia, 7: pH 7.2, 6: pH 6.2. La barra representa el SEM de al menos dos cultivos independientes.

Por otra parte, la producción de lactato a partir de glucosa fue mayor en la condición G/pH7.2/H, por lo contrario fue menor en la condición G/pH6.2/N (Fig. 11 B). Cuando se cultivó en los medios con lactato como principal fuente de carbono, se observó que el consumo de esta fuente de carbono fue mayor en la condición L/pH7.2/N, de forma interesante en los cultivos en hipoxia los niveles de lactato prácticamente no disminuyeron hasta después de pasadas 162h (Fig. 11 C).

Por último se observó que la línea celular tumoral MCF-7 consumió más glutamina en las condiciones G/pH7.2/N y L/pH7.2/N (Figs. 12 A y B). Sin embargo, la producción de glutamato sólo se observó en las condiciones L/pH7.2/H y L/pH6.2/H (Figs. 12 C y D).

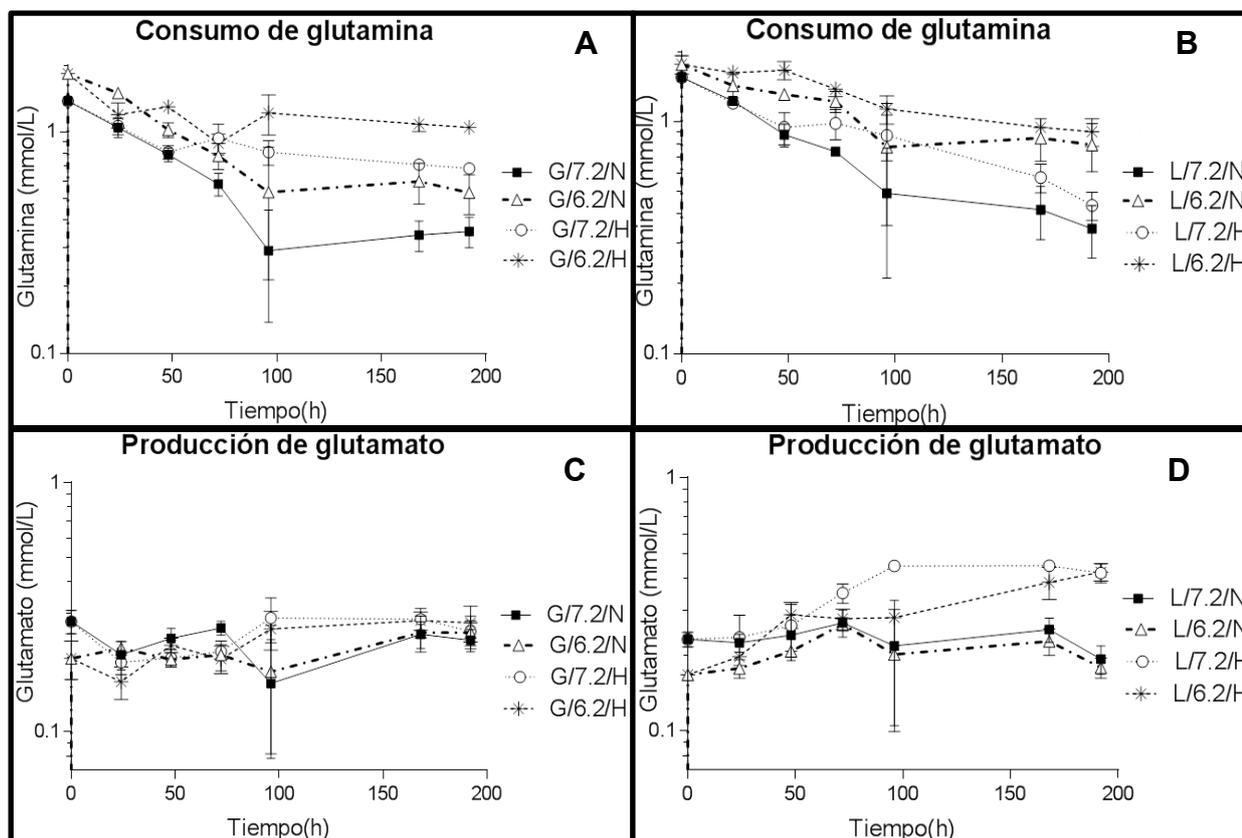


Figura 12.- Cinéticas de consumo de glutamina y producción de glutamato de la línea MCF-7. Consumo de glutamina (A y B), producción de glutamato (C y D) G: glucosa, L: lactato, N: normoxia, H: Hipoxia, 7: pH 7.2, 6: pH 6.2. La barra representa el SEM de al menos dos cultivos independientes.

Las líneas celulares tumorales modificaron su cantidad de DNA mitocondrial (mtDNA) en respuesta a las condiciones de cultivo.

El proceso de biogénesis mitocondrial (formación de nuevas mitocondrias) involucra la síntesis coordinada de proteínas codificadas por el núcleo y por el mtDNA, la replicación de este último así como de procesos de fusión y fisión⁽⁹⁵⁾. Recientemente varios autores han reportado que los tumores presentan alteraciones en su cantidad de mtDNA. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al papel que esta diferencia juega en el proceso de carcinogénesis. En este proyecto evaluamos la cantidad de mtDNA relativa a la cantidad de β -actina en diferentes líneas de cáncer cultivadas en diferentes condiciones de crecimiento.

Después de llevar a cabo el PCR de punto final y la electroforesis de los productos de amplificación para mtDNA y β -actina, se observaron las bandas de amplificación en el foto documentador (Ver Anexo 1). Este equipo permite hacer un análisis por densitometría, de manera que hace un cálculo de la intensidad de las bandas dando un valor numérico. Después de hacer este análisis se calculó la relación mtDNA/ β -actina, misma que se graficó en la Figura 13. El análisis estadístico se realizó con el método de ANOVA utilizando el programa Prism Graphpadv.7.

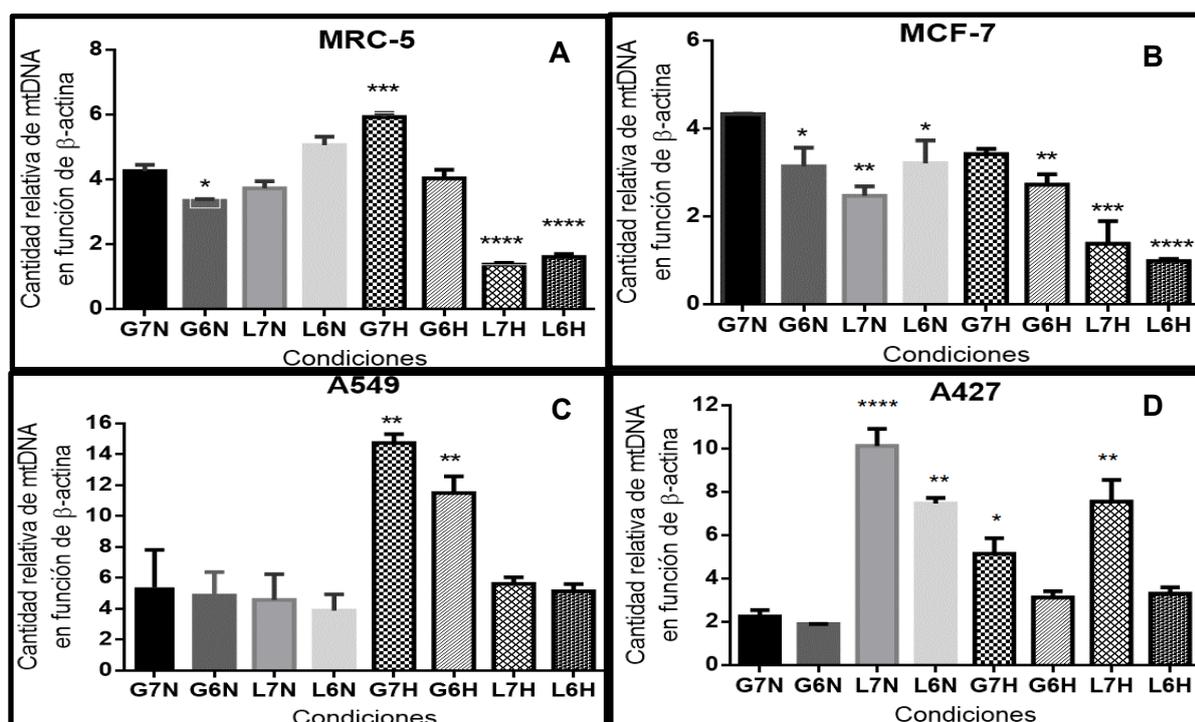


Figura 13.-Cantidad relativa de mtDNA en células de fibroblastos y en las líneas celulares de cáncer. Fibroblastos de pulmón (A), línea celular de adenocarcinoma mamario, MCF-7 (B), adenocarcinoma de pulmón A-549 (C) y A-427 (D). G7N (glucosa, pH7.2, normoxia), G6N (glucosa, pH6.2, normoxia), L7N (Lactato, pH7.2, normoxia), L6N (lactato, pH6.2, normoxia), G7H (glucosa, pH7.2, hipoxia), G6H (glucosa, pH6.2, hipoxia), L7H (lactato, pH7.2, hipoxia), L6H (lactato, pH6.2, hipoxia). Asterisco (*) diferencia significativa en la prueba de ANOVA con un factor con $P < 0.05$ con respecto a la condición G/pH7/N. La barra representa el SEM de dos cultivos independientes.

Las células de adenocarcinoma de pulmón A-549 y A-427 incrementaron la cantidad de mtDNA en las condiciones G/pH7.2/H, G/pH6.2/H respecto a la condición G/pH7.2/N. Únicamente A-427 incrementó la cantidad de mtDNA en las condiciones L/pH7.2/N y L/pH6.2/N. De forma interesante se observó que mientras las líneas de cáncer de pulmón A-549 y A-427 pudieron incrementar hasta casi 3 veces la cantidad de mtDNA respecto a

la condición G/pH7.2/N (Figs. 13 C y D); en las células de cáncer de mama MCF-7 se observó una disminución significativa de su cantidad relativa de mtDNA en todas las condiciones respecto a la condición G/pH7.2/N (Fig. 13 B).

Las líneas celulares tumorales modificaron la forma y el tamaño, además de la posición y la cantidad de las mitocondrias en respuesta a las condiciones de cultivo.

Microscopía de epifluorescencia en las células de fibroblastos de pulmón

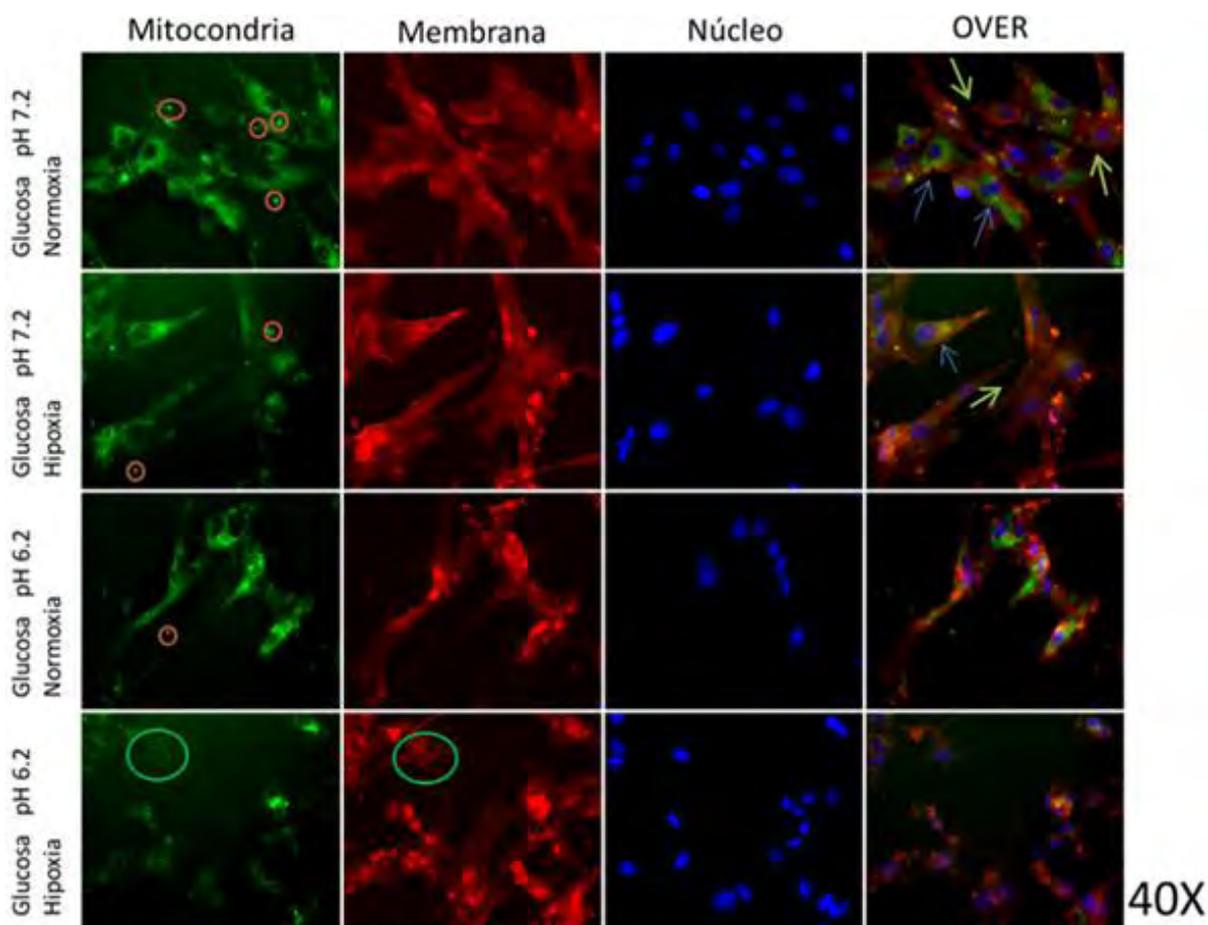


Figura 14. Micrografías de fluorescencia de las células de fibroblastos de pulmón, MRC-5. Las células fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono a pH de 7.2 y 6.2, en condiciones de normoxia e hipoxia, durante 48h. Mitocondrias teñidas con Mitotracker Green (verde), núcleo teñido con Hoechst (azul) y membrana plasmática teñida con Cellmask Orange (rojo). Aumento: 40X

Cuando las células de fibroblastos MRC-5 se cultivaron en G/pH7.2/N se observaron alargadas y uniformes con escasas prolongaciones citoplasmáticas y un núcleo grande y ovoide. Cuando se cultivaron en la condición G/pH6.2/N, las células se volvieron más delgadas y alargadas con núcleos aparentemente más pequeños; mientras que en

G/pH6.2/H, las células presentaron una gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas irregulares, por lo que el tamaño de las células varió (círculo verde).

Cuando se utilizó lactato como fuente de carbono (L/pH 7.2/N), el núcleo cubrió la mayor parte del citoplasma; mientras en L/pH7.2/H, las células MRC-5 tenían una mayor relación núcleo: citoplasma y eran más alargadas, pero no irregulares. En L/pH 6.2/N, las células se volvieron delgadas con núcleos diminutos y en ocasiones alargados. Por último en la condición L/pH6.2/H, las células MRC-5 presentaron una morfología celular completamente modificada tanto en su forma como en tamaño (Figs. 14 y 15).

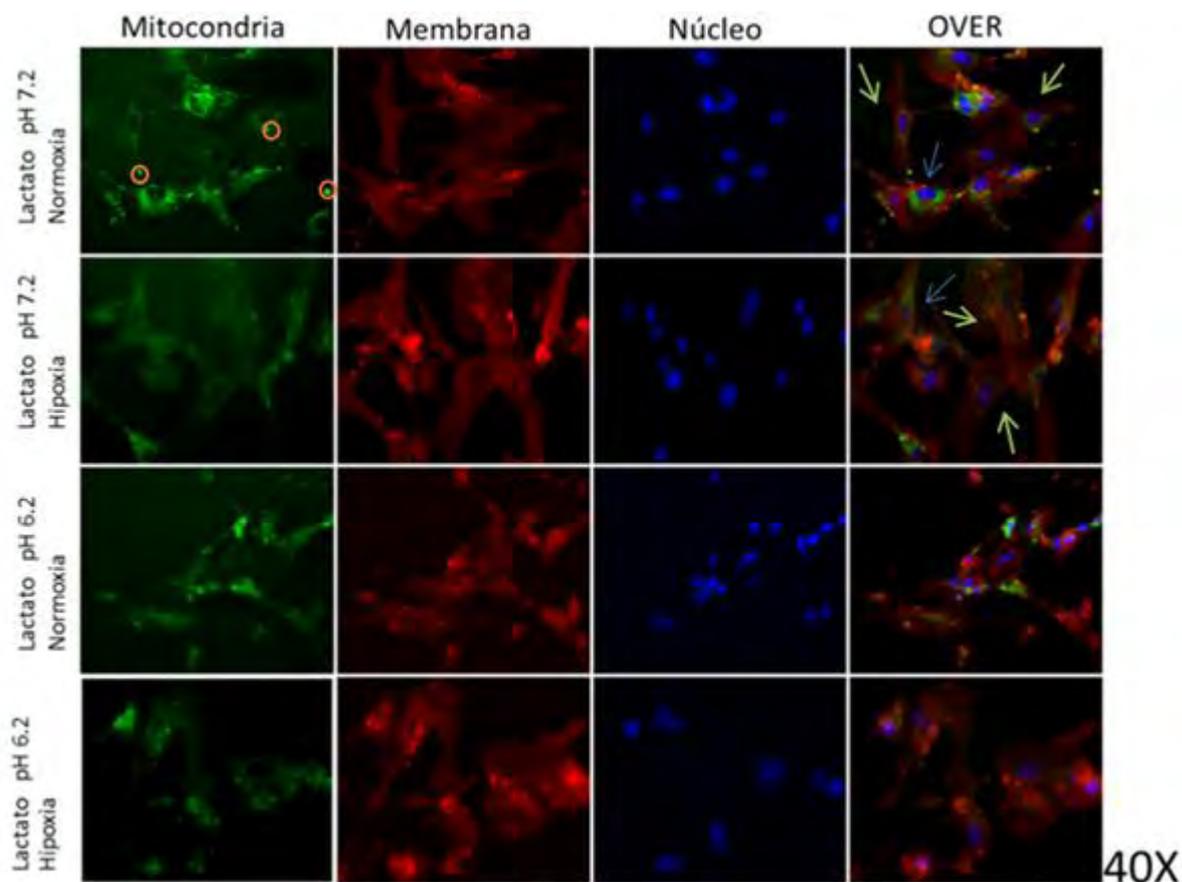


Figura 15. Micrografías de fluorescencia de las células de fibroblastos de pulmón, MRC-5. Las células fueron cultivadas en lactato como fuente de carbono a pH de 7.2 y 6.2, en condiciones de normoxia e hipoxia, durante 48h. Mitocondrias teñidas con Mitotracker Green (verde), núcleo teñido con Hoechst (azul) y membrana plasmática teñida con Cellmask Orange (rojo). Aumento: 40X

De hecho en condiciones con pH neutro como las condiciones G/pH7.2/H, L/pH7.2/N y L/pH7.2/H, se observó el mismo fenómeno (Figs. 14 y 15). Por el contrario en la condición L/pH6.2/H, no se observaron mitocondrias. De forma interesante se observó que en las

condiciones G/pH7.2/N y G/pH6.2/N, G/pH7.2/H y L/pH7.2/N, se observaron puntos de color verde fuera de las células (círculos rojos) que posiblemente podrían ser lo que varios autores han reportado como vesículas mitocondriales ⁽⁹⁶⁾, que parecen estar implicadas en los procesos de autofagia (Figs. 14) ⁽⁹⁷⁾. Por último, cuando se cultivó a las células MRC-5 en condiciones ácidas tales como G/pH6.2/N, G/pH6.2/H, L/pH6.2/N y L/pH6.2/H, se observó una disminución de la densidad celular y la cantidad de mitocondrias respecto a la condición G/pH7.2/N

Microscopía de epifluorescencia en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7)

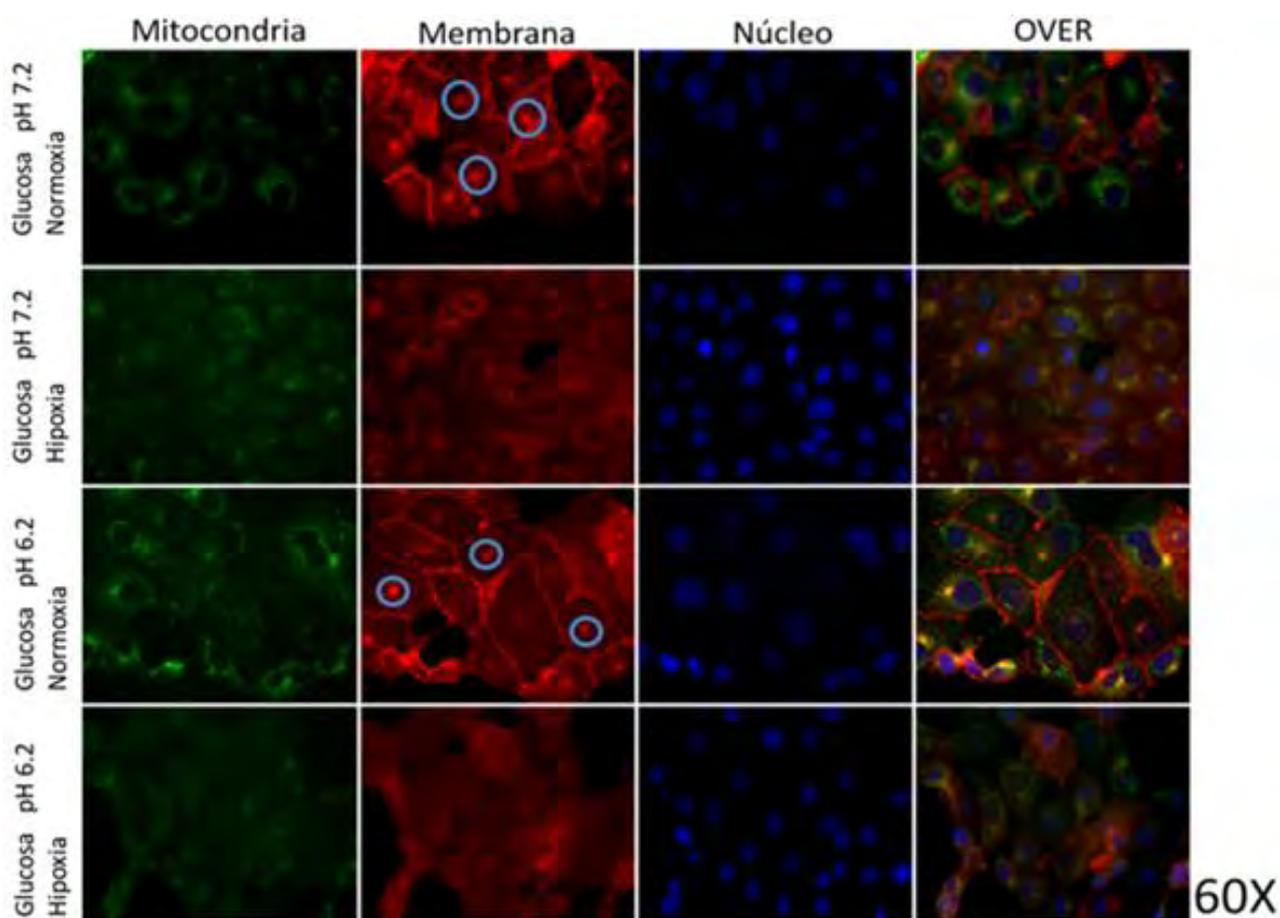


Figura 16. Micrografías de fluorescencia de la línea celular MCF-7. Las células fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono a pH de 7.2 y 6.2, en condiciones de normoxia e hipoxia, durante 48h. Mitocondrias teñidas con Mitotracker Green (verde), núcleo teñido con Hoechst (azul) y membrana plasmática teñida con Cellmask Orange (rojo). Aumento: 60X

Las células tumorales de cáncer de mama (MCF-7) son células grandes de aproximadamente 24 μm que mantienen características del epitelio mamario. ⁽⁹⁸⁾ Cuando las células MCF-7 se cultivaron en condiciones de normoxia, pH 7.2 en glucosa o lactato (G/pH7.2/N y L/pH7.2/N) no se observó un cambio en el tamaño y la forma celular; mientras que cuando se cultivaron en hipoxia en condiciones tales como G/pH7.2/H, G/pH6.2/H y L/pH7.2/H se observó una disminución en el tamaño de las células. En contraste, al cultivarse en las condiciones G/pH6.2/N y L/pH6.2/H se observó un aumento en el tamaño de las células. De forma interesante en las condiciones L/pH7.2/N, G/pH6.2/N y G/pH7.2/N, se observaron puntos teñidos con CellMask Orange en el centro de las células, esto podría deberse a vacuolas que contienen membrana recién sintetizada (circulo azul) (Figs. 16 y 17).

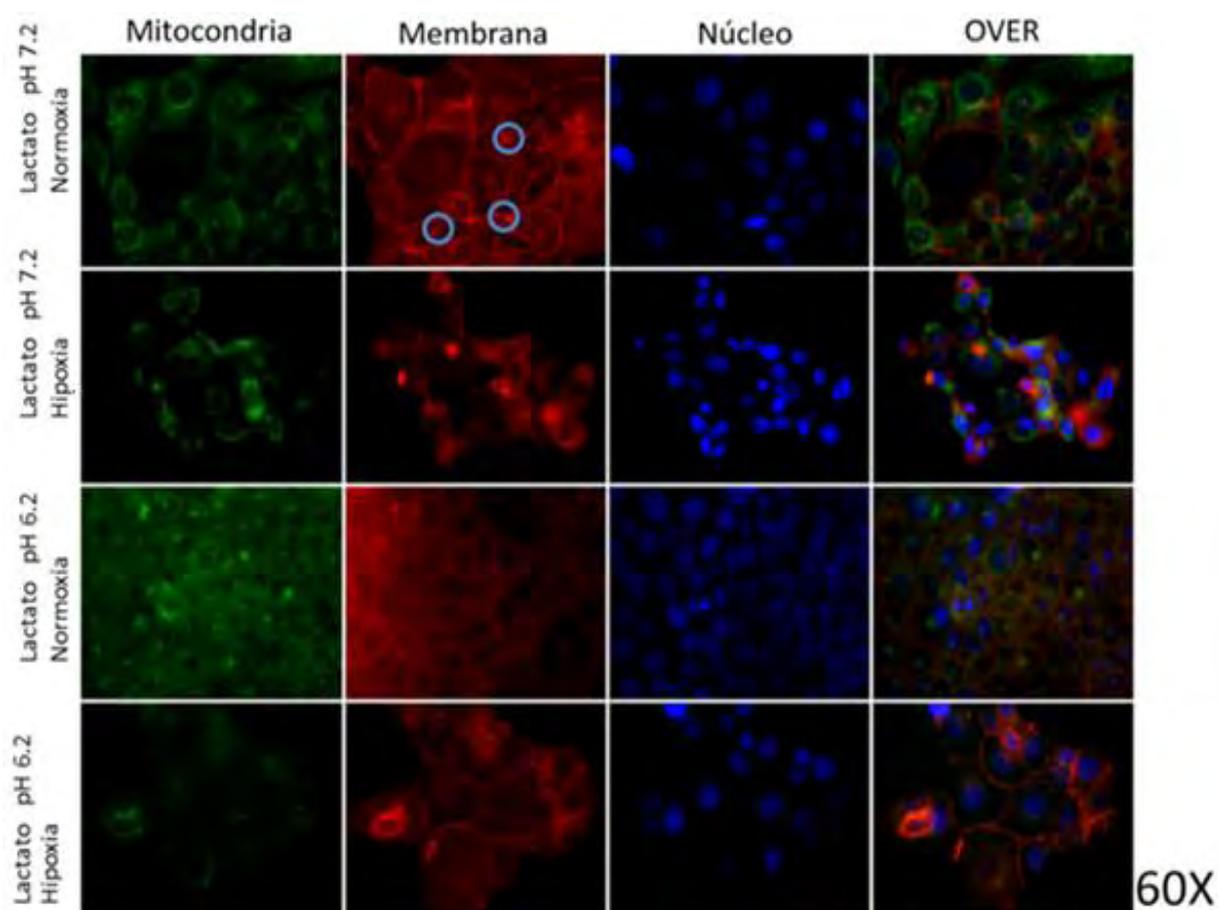


Figura 17. Micrografías de fluorescencia de la línea celular MCF-7. Las células fueron cultivadas en lactato como fuente de carbono a pH de 7.2 y 6.2, en condiciones de normoxia e hipoxia, durante 48h. Mitocondrias teñidas con Mitotracker Green (verde), núcleo teñido con Hoechst (azul) y membrana plasmática teñida con Cellmask Orange (rojo). Aumento: 60X

Cuando la línea celular MCF-7 se cultivó en normoxia en las condiciones G/pH7.2/N, G/pH6.2/N y L/pH7.2/N, las mitocondrias de MCF-7 se observaron en forma de puntos abundantes y dispersos por todo el citoplasma (Figs. 16 y 17); mientras que en hipoxia en las condiciones G/pH7.2/H, G/pH6.2/H y L/pH7.2/H se observó una baja concentración de este orgánulo, y en la condición L/pH6.2/H no se observaron mitocondrias (Figs. 16 y 17).

Microscopía de epifluorescencia en la línea celular de cáncer de pulmón (A-427)

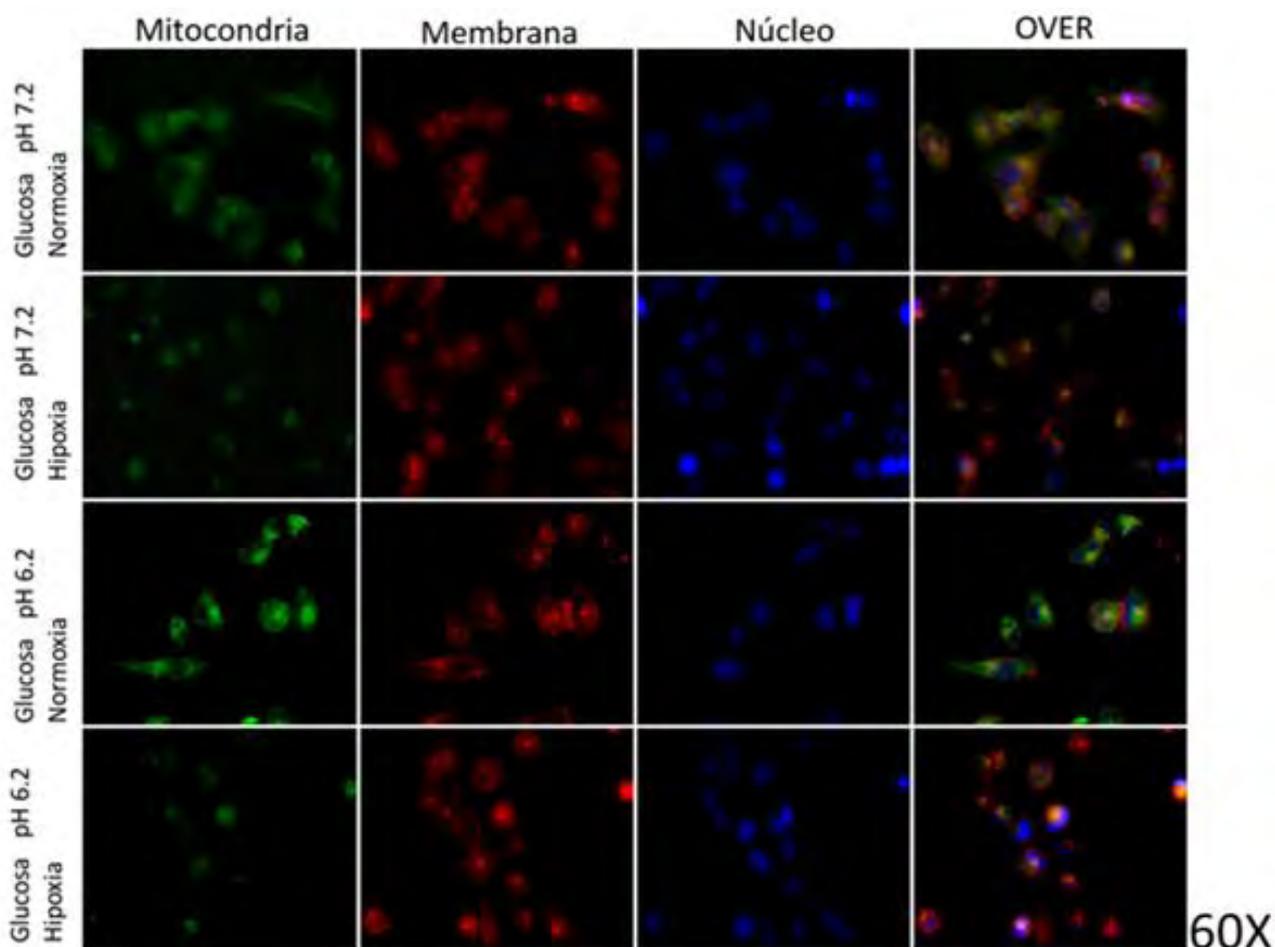


Figura 18. Micrografías de fluorescencia de la línea celular A-427. Las células fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono a pH de 7.2 y 6.2, en condiciones de normoxia e hipoxia, durante 48h. Mitocondrias teñidas con Mitotracker Green (verde), núcleo teñido con Hoechst (azul) y membrana plasmática teñida con Cellmask Orange (rojo). Aumento: 60X

Cuando las células de la línea celular tumoral A-427 se cultivaron en las condiciones G/pH7.2/H, G/pH6.2/H, L/pH7.2/H y L/pH6.2/H, G/pH7.2/N se observó que las células tenían un aspecto redondeado y núcleos que abarcaban casi la totalidad de la célula.(Figs. 18 y 19); mientras que cuando se cultivaron en normoxia en las condiciones L/pH7.2/N y L/pH6.2/N, las células tenían una morfología redonda pero con un aumento en el tamaño

del citoplasma, con núcleos alargados en la condición ácida. Por último en la condición G/pH6.2/N se observaron dos morfologías celulares: alargadas y redondas (Fig. 18).

Por otra parte, cuando las células de A-427 se cultivaron en las condiciones de hipoxia tales como G/pH7.2/H, G/pH6.2/H, L/pH7.2/H, L/pH6.2/H y L/pH7.2/N, su contenido mitocondrial se observó disminuido; por el contrario, en la condición G/pH6.2/N, su contenido mitocondrial aumentó y se extendió a lo largo del citoplasma. En la condición L/pH6.2/N se observó que las mitocondrias se encontraban por todo el citoplasma, pero se observaron dos poblaciones una con alta cantidad de mitocondrias (flecha azul) y una sin mitocondrias (flecha verde) (Figs. 18 y 19).

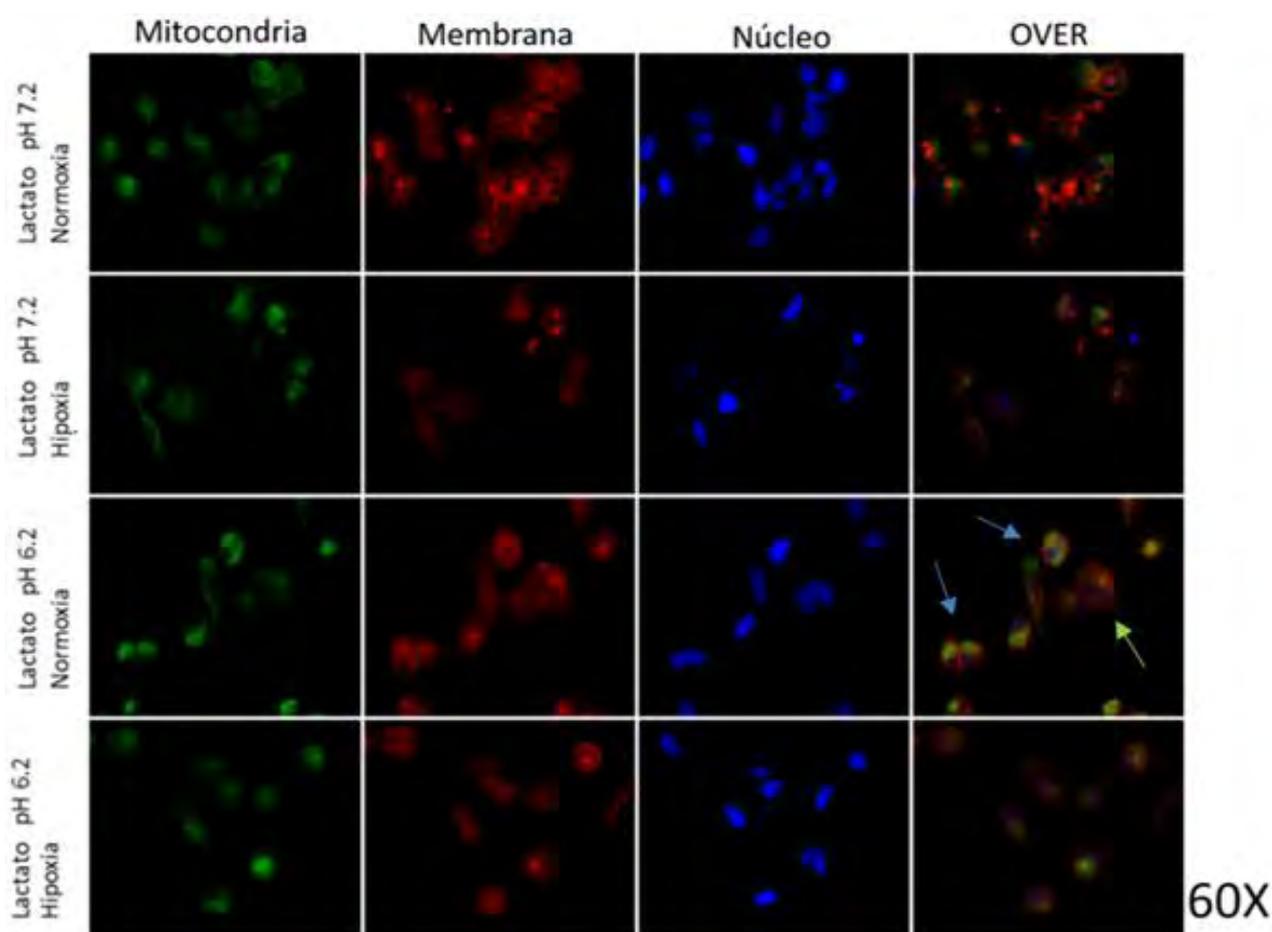


Figura 19. Micrográficas de fluorescencia de la línea celular A-427. Las células fueron cultivadas en lactato como fuente de carbono a pH de 7.2 y 6.2, en condiciones de normoxia e hipoxia, durante 48h. Mitocondrias teñidas con Mitotracker Green (verde), núcleo teñido con Hoechst (azul) y membrana plasmática teñida con Cellmask Orange (rojo). Aumento: 60X

Microscopía de epifluorescencia en la línea celular de cáncer de pulmón (A-549)

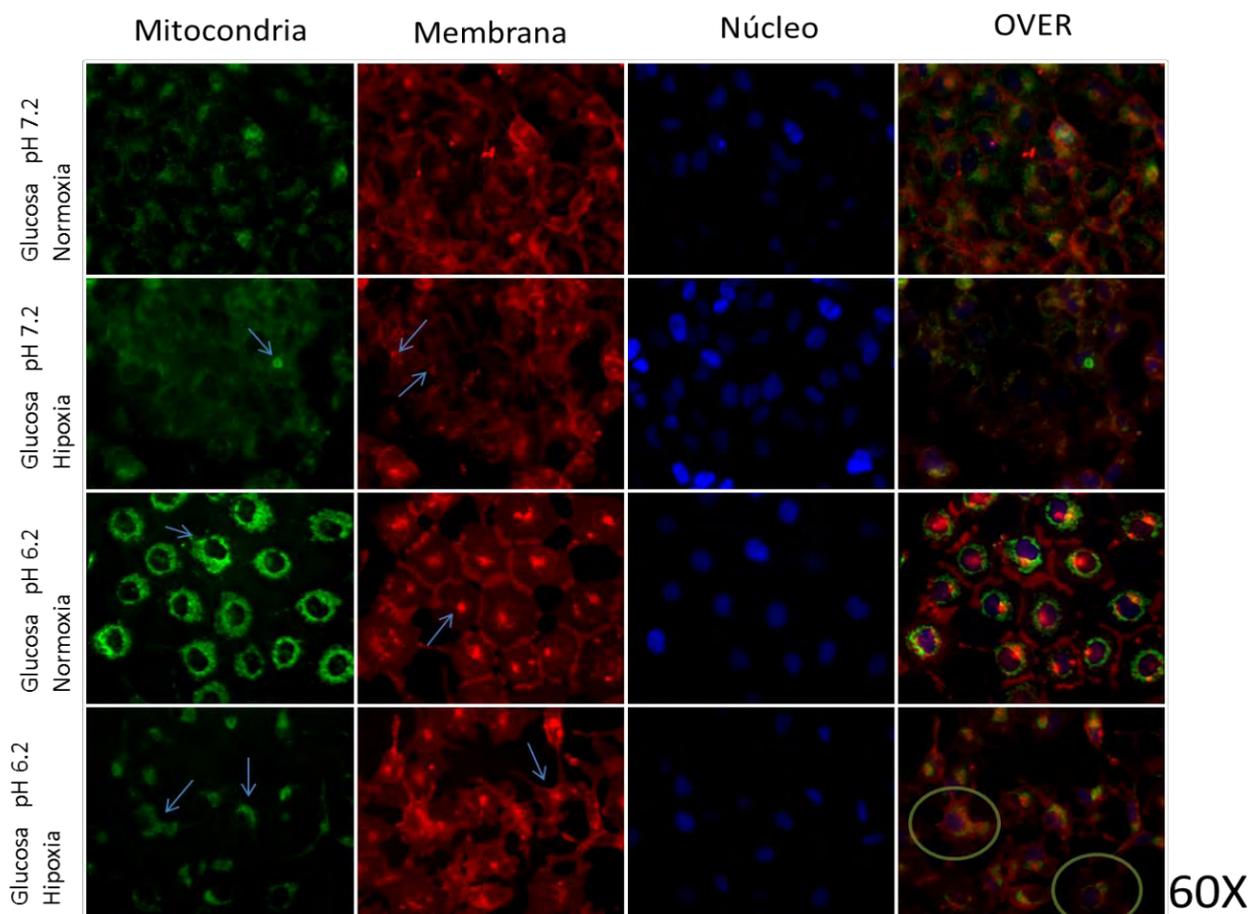


Figura 20. Micrografías de fluorescencia de la línea celular A-549. Las células fueron cultivadas en glucosa como fuente de carbono a pH de 7.2 y 6.2, en condiciones de normoxia e hipoxia, durante 48h. Mitocondrias teñidas con Mitotracker Green (verde), núcleo teñido con Hoechst (azul) y membrana plasmática teñida con Cellmask Orange (rojo). Aumento: 60X

Cuando la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A-549 se cultivó en las condiciones G/pH7.2/N y G/pH7.2/H presentó una relación núcleo: citoplasma baja, en donde los núcleos ocupaban la mayor parte del citoplasma de la célula, en ambos casos la cantidad de mitocondrias fue baja. Por otra parte, en las condiciones G/pH6.2/H y L/pH6.2/H, las células fueron pequeñas, alargadas y con abundantes prolongaciones irregulares, además la cantidad de mitocondrias fue prácticamente nula (Figs. 20 y 21).

Cuando las células de A-549 se cultivaron en normoxia tales como G/pH6.2/N, L/pH6.2/N y L/pH7.2/N, se observó que un aumento en el tamaño de estas células que tenían una morfología circular. De forma interesante, se observó una distribución perinuclear de las mitocondrias ya que se agruparon muy cerca de la región del núcleo (Figs. 20 y 21).

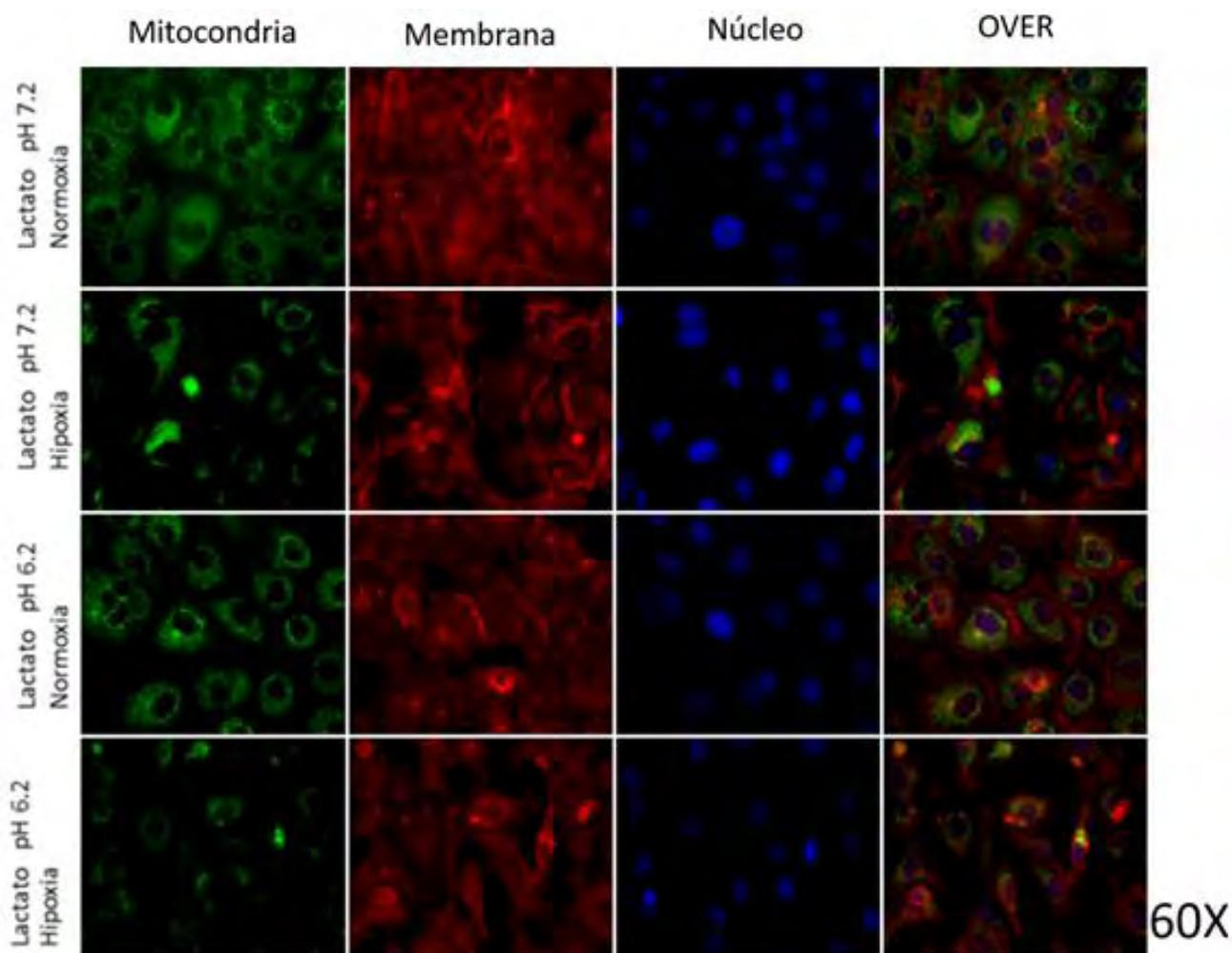


Figura 21. Micrografías de fluorescencia de la línea celular A-549 Las células fueron cultivadas en lactato como fuente de carbono a pH de 7.2 y 6.2, en condiciones de normoxia e hipoxia, durante 48h. Mitocondrias teñidas con Mitotracker Green (verde), núcleo teñido con Hoechst (azul) y membrana plasmática teñida con Cellmask Orange (rojo). Aumento: 60X

Por último, cuando las células tumorales de A-549 se cultivaron en la condición L/pH7.2/H, se observó que la morfología de las células fue heterogénea ya que se presentó una combinación de formas unas células eran alargadas y otras eran redondas. También se observó una población celular con una alta cantidad de mitocondrias (flecha azul) y otra población con una baja cantidad de mitocondrias (flecha verde); en donde las mitocondrias ocupaban el escaso citoplasma alrededor del núcleo (Fig. 21).

DISCUSIÓN

Los tumores sólidos interactúan de manera activa con el microambiente que los rodea, generando ambientes con bajos niveles de oxígeno (hipoxia), privación de energía, hipertensión intersticial, altos niveles de lactato y acidosis extracelular ⁽⁴⁾. En este proyecto se analizó la influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de las células tumorales MCF-7, A-549 y A-427; además, se analizó el papel de las alteraciones en el mtDNA y los cambios en la distribución de las mitocondrias sobre el crecimiento celular en 8 diferentes condiciones de cultivo. Nuestros resultados muestran que la línea celular MCF-7 proliferó de manera similar en condiciones de normoxia e hipoxia cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono y pH de 7.2. Además observamos que estas células consumen glucosa de manera semejante tanto en normoxia como en hipoxia, aunque se produce más lactato a partir de glucosa en la condición G/pH7.2/H. En un estudio realizado con estas mismas células (MCF-7) por R. A. Gatenby y cols, se encontró un aumento en el consumo de glucosa y la expresión de HIF1 α tras incubar en hipoxia. Todo esto parece indicar que estas células presentan una glucólisis aumentada tanto en normoxia (efecto Warburg) como en hipoxia, aunque aún es capaz de utilizar el metabolismo oxidativo para la producción de energía ⁽⁹⁹⁾.

Khan y cols. observaron que la disminución del pH incrementaba la proliferación de las células de epitelio normal de riñón (Vero), carcinoma mamario (MDA MB 231) y mieloma (IM9). Sin embargo, cuando se analizó la proliferación celular de la línea tumoral MCF-7 en este trabajo, se observó que en la condición G/pH6.2/N con respecto a la condición G/pH7.2/N, la proliferación de la línea MCF-7 disminuyó; lo que podría deberse a que la acidosis disminuye la síntesis de ribosomas a partir de glucosa ⁽⁵²⁾.

Por otra parte cuando se cultivaron las células MCF-7 en los medios con lactato, observamos que estas células son capaces de consumir esta fuente de carbono y mantener una alta proliferación, que se ve afectada por la hipoxia (efecto que no se observa durante el crecimiento con glucosa), lo que indica que las células MCF-7 son capaces de incorporar esta fuente de carbono y convertirla en piruvato para su entrada al ciclo de Krebs (probablemente utilizando la enzima lactato deshidrogenasa B). Aunado a lo anterior, se observó que al incubar a las células MCF-7 en medios con lactato, la glutamina se consumió durante todo el experimento, excepto en la condición L/pH6.2/N. Este elevado consumo de glutamina en los medios en donde se utilizó lactato como fuente de carbono,

puede deberse a que en condiciones de acidosis las células requieren de una mayor cantidad de potencial reductor, lo que ocasiona que el metabolismo de la glutamina se redireccione a otras vías metabólicas ⁽⁵²⁾.

Al evaluar la cantidad relativa de mtDNA en las células tumorales, se observó que en la condición control (G/pH7.2/N) los niveles de mtDNA en las células de adenocarcinoma pulmonar A-549 fueron más altos a los observados en las células de fibroblastos MRC-5, mientras que en las células A-427 se observó aproximadamente la mitad de la cantidad de mtDNA encontrada en los fibroblastos. Este hallazgo coincide con reportes en los que se han encontrado niveles disminuidos o niveles aumentados de mtDNA en muestras de tejido tumoral proveniente de pacientes con cáncer de pulmón, tras comparar la cantidad de mtDNA presente en el tejido tumoral contra la cantidad de mtDNA de células vecinas sanas, demostrando la heterogeneidad tumoral ^(63,65,66,72,74).

Se observó un aumento significativo en la cantidad relativa de mtDNA en las células de cáncer de pulmón A-549 y A-427 en las condiciones G/pH7.2/H, G/pH6.2/H, y L/pH7.2/N, L/pH6.2/N, L/pH7.2/H respectivamente; mientras que en las células de cáncer de mama MCF-7 se observó una disminución significativa de la cantidad relativa de mtDNA en todas las condiciones. Hasta el momento no existen reportes acerca de los cambios en la cantidad del mtDNA en las condiciones analizadas; sin embargo, en un estudio realizado por Mei H. y cols. , en donde se observa que el mtDNA de las células pre-apoptóticas A-549 aumentó después de tratarlas con cisplatino, los autores concluyeron que el incremento en la cantidad de mtDNA podría ser el resultado de la exposición prolongada a condiciones de estrés ^(70,75,76). En otro estudio realizado en carcinoma hepatocelular se encontró que mutaciones en la región D-loop del mtDNA estaban relacionadas con niveles disminuidos de esta molécula en un 70% de los casos, lo que podría significar que las células MCF-7 podrían presentar alguna mutación en el mtDNA que ocasione que los niveles de esta molécula desciendan en todas las condiciones de prueba. Diversos autores coinciden en que bajos niveles de mtDNA en las células tumorales están relacionados con un aumento en el grado de invasión durante la progresión del cáncer ^(60,61,62,64,65,66,67) .

Por otra parte, al teñir las mitocondrias en las líneas celulares utilizadas observamos que presentaron dos poblaciones de células, una con un alto contenido mitocondrial y otra con un contenido bajo; esto concuerda con lo reportado por Gillian Farnie y cols., quienes después de teñir estas células con Mitotracker observaron que existía una población con

un alto contenido de masa mitocondrial ⁽¹⁰⁰⁾. En nuestro estudio también observamos que estas dos poblaciones de células se evidencian mejor en las células sometidas a hipoxia y al tener lactato como única fuente de carbono, en donde observamos algunas células totalmente carentes de mitocondrias. Estas dos poblaciones podrían deberse a que los cultivos tienen una población heterogénea de células que se encuentran en diferentes estadios del ciclo celular, o incluso podrían deberse a lo que algunos autores denominan simbiosis metabólica en donde, dos poblaciones de células con características metabólicas diferentes dependen una de la otra para sobrevivir. Por otra parte, se observó que las mitocondrias de las células tumorales tenían una forma de puntos en las condiciones G/pH7.2/N, G/pH6.2/N, L/pH7.2/N para la línea MCF-7 y en las condiciones L/pH7.2/N y L/pH6.2/N para la línea A-549 mientras que en la línea de fibroblastos MRC-5 las mitocondrias eran más alargadas (con forma de hilos). En un estudio utilizando las líneas celulares tumorales A-549, H1993, Hcc827, H358 se ha observado que una morfología mitocondrial fragmentada está asociada con una disminución en los niveles de expresión del mediador de la fusión Mfn-2 y un incremento en la expresión del regulador de la fisión Drp-1 ⁽⁸⁶⁾. Esto sugiere que los procesos de fusión y fisión podrían estar alterados en las líneas celulares tumorales utilizadas.

La morfología de las líneas celulares tumorales utilizadas se comportó de manera heterogénea en respuesta a las diferentes condiciones de prueba. Por ejemplo, al cultivar en condiciones de hipoxia (G/pH7.2/H) se observó una disminución en el tamaño de las células MCF-7, mientras que en las células A-427 y A-549 se observó que los núcleos abarcaban casi la totalidad de la célula. Esta característica junto con la presencia de células multinucleadas puede ser signo de divisiones celulares anormales, que a su vez pueden reflejar cambios ocurridos a nivel metabólico ⁽¹⁰¹⁾.

Por otra parte, cuando se cultivó en condiciones de acidosis (particularmente en G/pH6.2/N) la morfología de las células MRC-5 fue alargada, mientras en el caso de la línea de cáncer pulmonar A-549 la morfología celular en esta condición fue redondeada, en la línea A-427 se observó una combinación de morfologías (redondeada y alargada) y en la línea MCF-7 solo se observó un aumento en el tamaño de las células. El alargamiento de las células en respuesta a un pH ácido (entre 6.5 y 6.2) ya había sido observado en células de epitelio normal de riñón (Vero), carcinoma mamario (MDA MB 231) y mieloma (IM9) en un estudio realizado por Khan y cols. Por último, observamos que la combinación pH ácido

e hipoxia induce la aparición de prolongaciones citoplasmáticas, modificaciones de tamaño y forma celular acompañadas de una baja densidad celular, esto podría deberse a que en acidosis disminuyó el metabolismo de la glucosa y en hipoxia el metabolismo oxidativo; interesantemente, estas modificaciones celulares coinciden con una baja cantidad de mitocondrias, por lo que las alteraciones observadas pueden ser el reflejo de cambios en el microambiente tumoral.

CONCLUSIONES

Encontramos que la cantidad de mtDNA y de mitocondrias en las líneas celulares de carcinoma pulmonar (A-549 y A-427) no depende una de la otra.

Las líneas celulares tumorales son capaces de modificar la distribución de sus mitocondrias (distribución perinuclear) sin alterar los niveles de mtDNA en estas células.

Las mitocondrias de las líneas celulares de carcinoma pulmonar (A-549 y A-427) y de cáncer de mama (MCF-7) son capaces de responder a los cambios en su entorno esto puede, influir en la proliferación celular.

Encontramos indicios de que las mitocondrias tienen un papel importante para la supervivencia de la línea celular MCF-7.

REFERENCIAS

1. NIH (Instituto Nacional del cáncer). Que es cáncer? [En línea] Fecha de consulta [7/Nov/15]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
2. Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000
3. Yu C, Yao Z, Jiang Y. Prostate cancer stem cell biology. *Minerva Urol Nefrol.* 2012;64(1):19-33
4. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2004;14(3):198-206
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next Generation. *Cell.* 2011;144:646-674
6. Aktipis CA, Boddy AM, Jansen G, et al. Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1673):1-21.
7. ACS. Genes and Cancer [En línea] Fecha de consulta [7-nov-2015]. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002550-pdf.pdf>.
8. Civetta MT, Civetta JL. Salud pública Méx [En línea]. Fecha de consulta [26-feb-2016]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342011000500008&lng=es
9. Fulda S. Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Lett.* 2013;338(1):168-73
10. Melino G, Knight RA, Nicotera P. How many ways to die? How many different models of cell death?. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1457-62.
11. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis.* 2014;17(3):471-494.
12. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in Cancer. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2(3):213-219.
13. Hurst DR, Welch DR. Metastasis Suppressor Genes: At the Interface Between the Environment and Tumor Cell Growth. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;286:107-180.
14. Cook LM, Hurst DR, Welch DR. Metastasis Suppressors and the Tumor Microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2011;21(2):113-122.
15. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015;(35):185-198
16. Stewart TJ, Abrams SI. How tumours escape mass destruction. *Oncogene.* 2008;27(45):5894-5903
17. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(5):325-37
18. Li Z, Zhang H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2015;73(2):377-392
19. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(7):1-4.
20. Globocan 2012 [en línea] Fecha de consulta [] Disponible en:
21. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108
22. Veronesi G, Bottoni E, Finocchiaro G, Alloisio M. When is surgery indicated for small-cell lung cancer?. *Lung Cancer.* 2015;90(3):582-589

23. Blair HA, Deeks ED. Albumin-Bound Paclitaxel: A Review in Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs*. 2015;75(17):2017-2024
24. Kruger NJ, Schaewen A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol*. 2003; 6(3):236-246.
25. Michal G, Schomburg D, *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, 2da edición. John Wiley & Sons, Inc 2012: 17,18, 37,41 55,56
26. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *The Citric Acid Cycle*. *Biochemistry*. [En línea] 5ª edición. New York. 2002. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21163/>
27. Bellance N, Lestienne P, Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis, *Front Biosci*. 2009; 14:4015-4034.
28. Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Oncol Lett*. 2012; 4(6): 1151–1157.
29. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. [En línea] 4ª edición. New York. Garland Science.2002. Fecha de consulta [25-Oct-2015]. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894/>
30. Dakubo GD, *Mitochondrial Genetics and Cancer*. Springer.2010.new York:1-10
31. Nicholls, D. G., & Ferguson, S. *Bioenergetics*. 4ª edición. Academic Press. (2013).
32. Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial dysfunction in cancer, *Front Oncol*. 2013;3:292
33. Van Blerkom J, Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cel, *Reprod Biomed Online*. 2008;16(4):553-69.
34. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells., *J Cell Physiol*. 1988;136(3):507-13.
35. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014. 16;505(7483):335-43.
36. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:441-64
37. Abcam. Oxidative Phosphorylation [En línea] Fecha de consulta [11/Nov/2015] Disponible en: <http://docs.abcam.com/pdf/metabolism/oxidative-phosphorylation.pdf>.
38. Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2007 1773(12):1701-20
39. Clay Montier LL, Deng JJ, Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics*. 2009;36(3):125-131
40. Kukat C, Wurm CA, Spähr H, et al. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13534-13539
41. Akhmedov AT, Marín JG. Mitochondrial DNA maintenance: an appraisal. *Mol Cell Biochem*. 2015; 409(1-2):283-305.
42. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease *Nat Rev Genet*. 2005;6(5):389-402
43. Shokolenko IN, Alexeyev MF, Mitochondrial DNA: A disposable genome?, *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(9):1805-1809
44. He G, Jiang Y, Zhang B, Wu G. The effect of HIF-1 α on glucose metabolism, growth and apoptosis of pancreatic cancerous cells. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2014;23(1):174-80

45. Casciari JJ, Sotirchos SV, Sutherland RM. Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH. *J Cell Physiol.* 1992; 151(2):386-94
46. Kobayashi S, Millhorn DE. Hypoxia regulates glutamate metabolism and membrane transport in rat PC12 cells. *J Neurochem.* 2001;76(6):1935-1948.
47. Sun RC, Denko NC. Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell Metab.* 2014 4;19(2):285-292
48. Parks SK, Mazure NM, Counillon L, et al. Hypoxia promotes tumor cell survival in acidic conditions by preserving ATP levels. *J Cell Physiol.* 2013;228(9):1854-1862
49. Chen JL, Lucas JE, Schroeder T, et al. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS Genet.* 2008;4(12):1-10
50. Dai C, Sun F, Zhu C. Tumor environmental factors glucose deprivation and lactic acidosis induce mitotic chromosomal instability--an implication in aneuploid human tumors. *PLoS One.* 2013;8(5):1-10
51. Wu H, Ding Z, Hu D, et al. Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J Pathol.* 2012;227(2):189-199
52. Lamonte G, Tang X, Chen JL, et al. Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. *Cancer Metab.* 2013;1(1):1-23
53. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, et al. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007; 274(6):1393-418.
54. Ramanujan VK. Metabolic Plasticity in Cancer Cells: Reconnecting Mitochondrial Function to Cancer Control. *J Cell Sci Ther.* 2015; 6(3): 211.
55. Area EG, Schon EA. Mitochondrial genetics and disease. *J Child Neurol.* 2014;29(9):1208-1215
56. Mohamed Yusoff AA. Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors: A mini-review. *J Cancer Res Ther.* 2015;11(3):535-544
57. Higuchi M. Regulation of mitochondrial DNA content and cancer. *Mitochondrion.* 2007; 7(1-2): 53-57.
58. Fernández-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA, *Exp Physiol.* 2003;88(1):41-56.
59. Dang S, Qu Y, Wei J, et al. Low copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts worse prognosis in early-stage laryngeal cancer patients. *Diagn Pathol.* 2014;9(28):1-9
60. Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, et al. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2002; 23(5):759-68.
61. Yu M, Zhou Y, Shi Y, et al. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life.* 2007;59(7):450-457.
62. Yu. M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci.* 2011;89(3-4):65-71
63. Cui H, Huang P, Wang Z, et al. Association of decreased mitochondrial DNA content with the progression of colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2013;13(110):1-7
64. Lee HC, Li SH, Lin JC, et al. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat Res.* 2004; 547(1-2):71-78

65. Mambo E, Chatterjee A, Xing M, et al. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *Int J Cancer*. 2005; 116(6):920-4.
66. Meierhofer D, Mayr JA, Foetschl U, et al. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2004; 25(6):1005-1010.
67. Wu CW, Yin PH, Hung WY, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005; 44(1):19-28.
68. Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, et al. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J*. 2001; 20(8):1910-20.
69. Grandemange S, Herzig S, Martinou JC. Mitochondrial dynamics and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2009; 19(1):50-56.
70. Thyagarajan , Wang R, Barcelo H, et al. Mitochondrial copy number is associated with colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(9):1574-81
71. Xia P, An HX, Dang CX, et al. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer*. 2009;9:454
72. Wang Y, Liu VW, Xue WC, et al. Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression. *Br J Cancer*. 2006; 95(8):1087-1091.
73. Wang Y, Liu VW, Xue WC, et al. The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: a quantitative study using laser-captured microdissected tissues. *Gynecol Oncol*. 2005;98(1):104-110.
74. Lee HC, Yin PH, Lin JC, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Acad Sci*. 2005; 1042:109-122.
75. Lee HC, Yin PH, Chi CW, et al. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci*. 2002; 9(6):517-526.
76. Mei H, Sun S, Bai Y, et al. Reduced mtDNA copy number increases the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Death Dis*. 2015;6:1710
77. Lan Q, Lim U, Liu CS, et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008; 112: 4247-4249.
78. Lynch SM, Weinstein SJ, Virtamo J, et al. Mitochondrial DNA copy number and pancreatic cancer in the alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study. *Cancer Prev Res*. 2011; (4): 1912-1919.
79. Hosgood HD, Liu CS, Rothman N, Weinstein SJ, Bonner MR, Shen M, Lim U, Virtamo J, Cheng WL, Albanes D, Lan Q: Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*. 2010, 31: 847-849.
80. Qu F, Liu X, Zhou F, et al. Association between mitochondrial DNA content in leukocytes and colorectal cancer risk: a case-control analysis. *Cancer*. 2011;117: 3148-3155
81. Shen J, Platek M, Mahasneh A, et al. Mitochondrial copy number and risk of breast cancer: a pilot study. *Mitochondrion*. 2010; 10: 62-68
82. MacAskill AF, Kittler JT. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol*. 2010;20(2):102-12
83. Zhao J, Zhang J, Yu M, et al. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2013; 32 (40) : 4814 -4824
84. Hirokawa N, Takemura R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(3):201-14.

85. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, et al. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(3):985-993
86. Rehman J, Zhang HJ, Toth PT, et al. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J.* 2016;26(5):2175-86
87. Benard G, Bellance N, James D, et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci.* 2007;120(5):838-848
88. Chen H, Vermulst M, Wang YE, et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell.* 2010;141(2):280-289
89. Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, et al. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell.* 1998;93(7):1147-1158.
90. Sigma Aldrich. Cell Viability and Proliferation [En línea] Fecha de consulta: [21/03/2016] Disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/biofiles-pdf/biofiles_v6_n5.pdf
91. Georgette D. "Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR." *Current Laboratory Methods in Neuroscience Research.* New York. Springer; 2014. 201-210.
92. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125
93. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2004;14(3):198-206
94. Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(2):370-384
95. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010;47:69-84
96. Soubannier V, McLelland GL, Zunino R, et al. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr Biol.* 2012; 22(2):135-141.
97. Cook KL, Soto-Pantoja DR, Jin L, et al. When is a vesicle not just a vesicle: mitochondrial spheroids and mitochondrial autophagosome?. *Cell Biosci.* 2014; 4 (66): 1-5
98. Celeromix [En línea]. Grenoble. Fecha de consulta [24/jul/2016]. Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/Soporte/cell-lines/mcf-7.php>
99. Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, Worrall L, Gillies R J. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer.* 2007; 97(5): 646–653.
100. Farnie G, Sotgia F, Lisanti MP. High mitochondrial mass identifies a sub-population of stem-like cancer cells that are chemo-resistant, Oncotarget. 2015;6(31): 30472–30486.
101. Baba AI, Cătoi C. Tumor cell morphology. *Comparative Oncology.* [En línea] Bucharest. 2007. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>.

ANEXO 1

Línea celular MRC-5

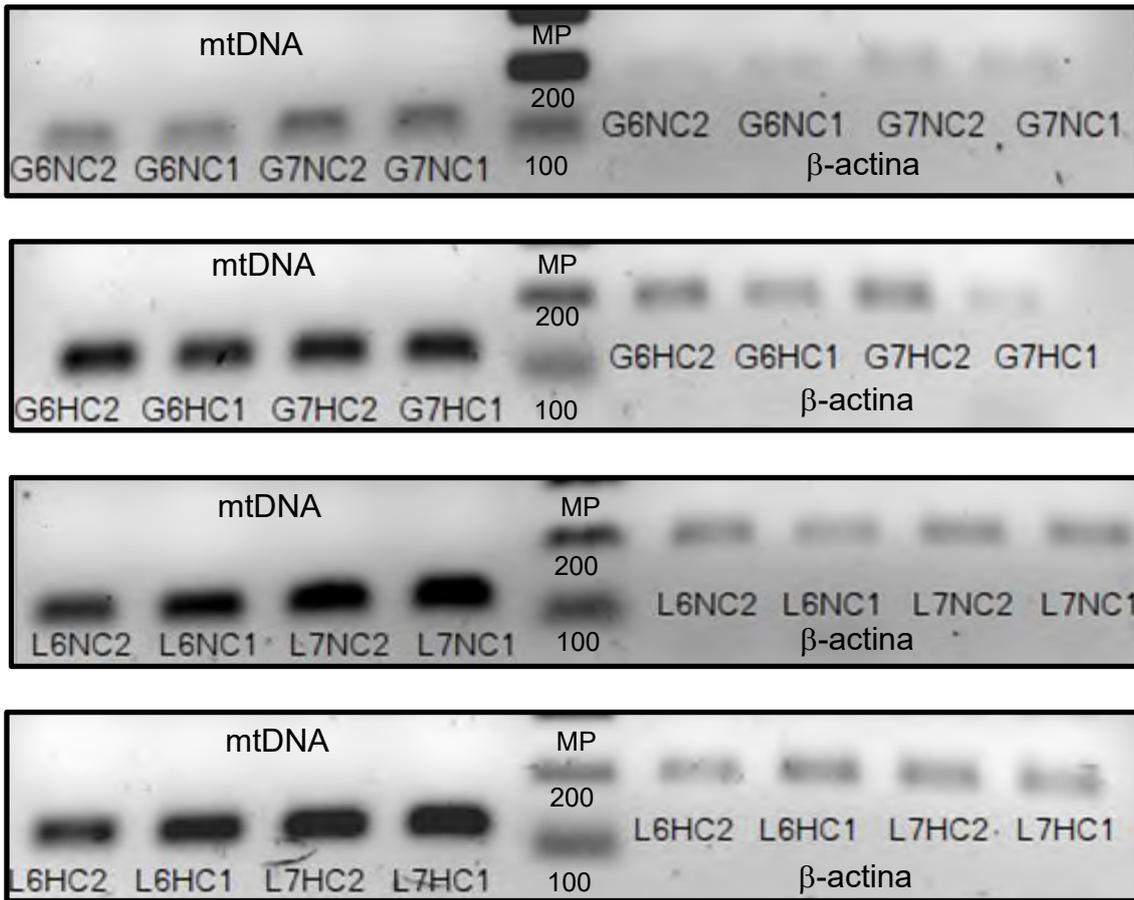


Figura 22- Bandas de amplificación de los genes β -actina y mtDNA de las células de fibroblastos, MRC-5, cultivadas durante 48h, variando la fuente de carbono: glucosa (G) o lactato (L), en condiciones de normoxia (N) e hipoxia (H) a pH 6.2 (6) y 7.2 (7). MP: marcador de peso, (GeneRuler 100 pb de Thermo Scientific)

Línea celular MCF-7

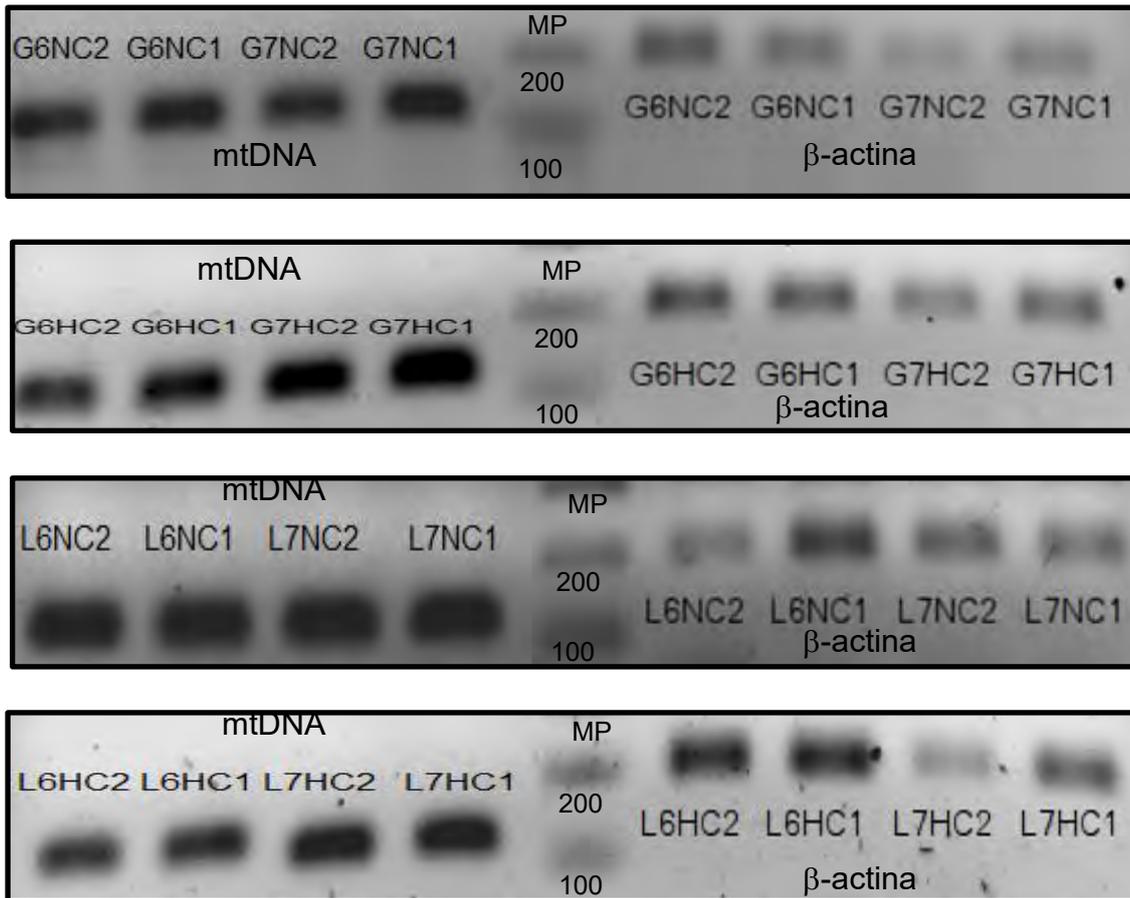


Figura 23- Bandas de amplificación de los genes β -actina y mtDNA de las células de adenocarcinoma mamario, MCF-7, , variando la fuente de carbono: glucosa (G) o lactato (L), en condiciones de normoxia (N) e hipoxia (H) a pH 6.2 (6) y 7.2 (7). MP: marcador de peso, (GeneRuler 100 pb de Thermo Scientific)

Línea celular A-549

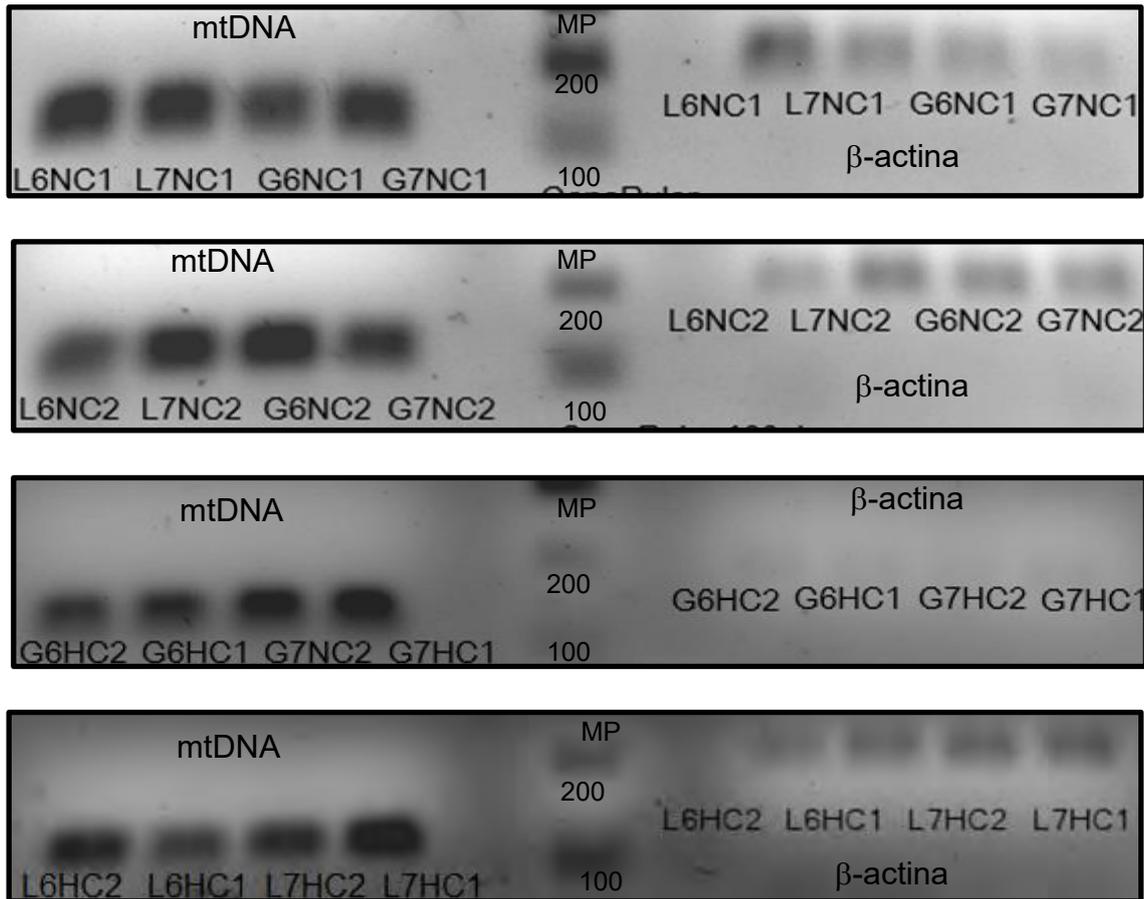


Figura 24- Bandas de amplificación de los genes β -actina y mtDNA de las células de adenocarcinoma de pulmón A-549, cultivadas durante 48h, variando la fuente de carbono: glucosa (G) o lactato (L), en condiciones de normoxia (N) e hipoxia (H) a pH 6.2 (6) y 7.2 (7). MP: marcador de peso, (GeneRuler 100 pb de Thermo Scientific)

Línea celular A-427

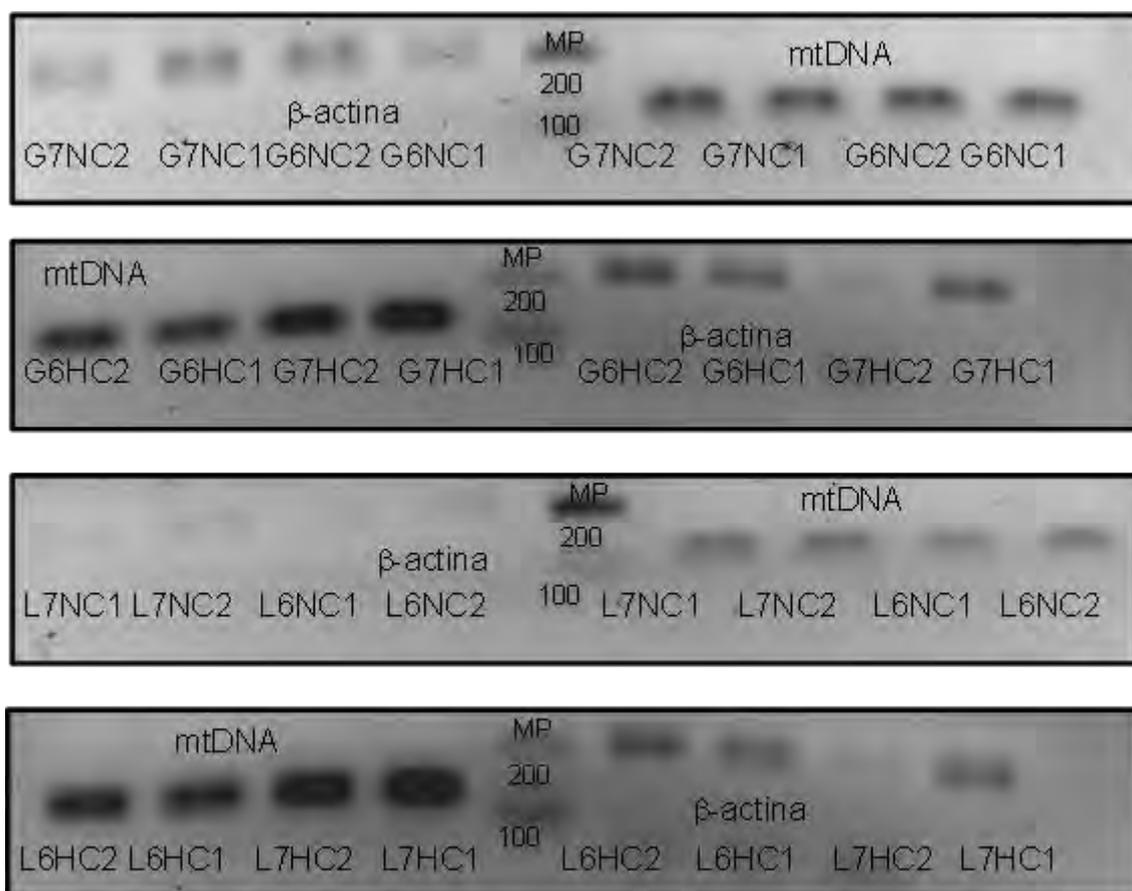


Figura 25- Bandas de amplificación de los genes β -actina y mtDNA de las células de adenocarcinoma de pulmón, A-427, cultivadas durante 48h, variando la fuente de carbono: glucosa (G) o lactato (L), en condiciones de normoxia (N) e hipoxia (H) a pH 6.2 (6) y 7.2 (7). MP: marcador de peso, (GeneRuler 100 pb de Thermo Scientific)