

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	8	10	2018		1	9	2020

Datos del Alumno

Nombre : Cecilia Romero Carrillo	
Matrícula : 2142027916	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Periférico Sur 7659 ED.8 Dpto.503 Col. Villa Cuemanco C.P. 14330 Tlalpan, Ciudad de México.	
Teléfono : 55 26 52 35 83	Celular : 735 212 0445
Correo Electrónico : secilia.romero@gmail.com	CURP : ROCC940906MMSMRC06

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto :	Efecto del dicloroacetato de sodio (DCA) y 2-metoxiestradiol (2ME) en cultivo de células pulmonares A549 expuestas a hipoxia.						
Lugar donde se realizó el Servicio Social :	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias						
Dependencia :							
Entidad Federativa :	Distrito Federal						
Municipio : Tlalpan						Localidad :	
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	1	10	2018		1	7	2019

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector:	3.- Público	Tipo:	1.- Externo
Orientación:	10.- Otros		

FIRMAS

Dra. Elizabeth Sánchez Miranda

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Cecilia Romero Carrillo

Alumno
Nombre, firma

Dr. Arnoldo Aquino Gálvez

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

M. en C. Felipe Mendoza Pérez 7183

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



657

Ciudad de México, 21 de noviembre de 2019.

ASUNTO: Terminación de Servicio Social

MTRO. JESÚS OBDULIO LÓPEZ MURILLO
Coordinador Divisional de Servicio Social de CBS
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
PRESENTE

Por medio de la presente informamos a usted que la alumna: **ROMERO CARRILLO CECILIA**, con número de **matrícula 2142027916**, quien cursa la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, concluyó satisfactoriamente **su servicio social** en el Laboratorio de Oncología Biomédica de este Instituto, en el periodo comprendido 01 octubre de 2018 al 01 de julio de 2019, de lunes a viernes 08:00 a 15:00 horas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ GARCÍA
Director de Enseñanza



DRA. MARÍA DE LA LUZ CHAN CHAN
Jefa del Departamento de Formación de Pregrado

DR. ARNOLFO AQUINO GÁLVEZ
Investigador en Ciencias Médicas C
Laboratorio de Oncología Biomédica

de
MLCC/sahc*



Ciudad de México, 9 de septiembre de 2020

MTRA. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS
Directora de la División de CBS
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
PRESENTE

Asunto: Terminación de Servicio Social.

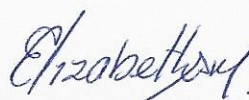
Por medio de la presente informamos a usted que la alumna **Cecilia Romero Carrillo** con número de matrícula **2142027916**, quién cursó la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica ha concluido satisfactoriamente su servicio social en el Laboratorio de Oncología Biomédica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en el periodo comprendido del 01 de octubre de 2018 al 01 de julio de 2019, de lunes a viernes de 8:00 a 15:00 h.

Sin más por el momento, agradezco su atención y aprovecho para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dr. Arnaldo Aquino Gálvez
Laboratorio de Oncología Biomédica
INER, Ced. Prof.: 0435460
Asesor Externo



Dra. Elizabeth Sánchez Miranda
Lab. Biología Experimental, UIDIS.
UAM-X, No. Económico 33148
Asesor Interno

Ciudad de México, a 9 de septiembre de 2020.

CDE. PATRICIA ENZALDO DE LA CRUZ
 Coordinadora Divisional de Servicio Social de CBS
 Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
 PRESENTE

Asunto: Justificación de cambio de título y objetivos en proyecto de Servicio Social.

Por medio de la presente, hacemos de su conocimiento la decisión de hacer cambios en el título y objetivos en el reporte de Servicio Social de la alumna Cecilia Romero Carrillo con matrícula 2142027916, realizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los cambios fueron realizados considerando que estos definen con claridad el proyecto realizado por la alumna.


En virtud de lo anterior, me permito aclarar que el título registrado fue: "Efecto del dicloroacetato de sodio (DCA) en cultivo de células pulmonares expuestas a Hipoxia. Implicaciones terapéuticas en el tratamiento de enfermedades pulmonares en la que la hipoxia celular es un componente importante" y cambió a: "Efecto del dicloroacetato de sodio (DCA) y 2-metoxiestradiol (2ME) en cultivo de células pulmonares A549 expuestas a hipoxia." Así mismo, los objetivos se ajustaron de acuerdo con las actividades que por cuestiones de disponibilidad de recursos fue posible llevar a cabo. Dichos cambios se describen a continuación:

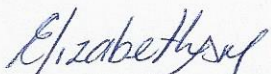
Objetivo registrado:	Cambia a:
<p>OBJETIVO GENERAL:</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar el efecto del dicloroacetato de sodio solo o en combinación con el 2-metoxiestradiol en células A549 en condiciones de hipoxia y normoxia. <p>OBJETIVOS ESPECIFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar la síntesis proteica de HIF1α, HIF2α y HIF 3α, TGF-β y bcl-2 en condiciones de hipoxia y normoxia. Comparar el efecto del dicloroacetato de sodio en condiciones de normoxia e hipoxia en células A549. Comparar el efecto del 2-metoxiestradiol en condiciones de normoxia e hipoxia en células A549. 	<p>OBJETIVOS GENERALES:</p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluar los efectos del DCA sobre los marcadores metabólicos en las células A549 en condiciones de normoxia e hipoxia. Analizar los efectos citotóxicos del 2ME en las células A549 después de ser expuestas a DCA. <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluar el efecto del DCA en el metabolismo de las células A549 en condiciones de hipoxia, a través de la cuantificación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato. Evaluar el efecto del 2ME en el metabolismo de las células A549 en condiciones de hipoxia, a través de la cuantificación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato.


<ul style="list-style-type: none">• Evaluar el efecto del dicloroacetato de sodio en combinación con 2-metoxiestradiol en condiciones de normoxia e hipoxia en células A549.	<ul style="list-style-type: none">• Evaluar el efecto del DCA en combinación con el 2ME sobre el metabolismo de las células A549 en condiciones de hipoxia, a través de la cuantificación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato.• Evaluar el efecto del DCA en combinación con 2ME en la viabilidad de células A549 en condiciones de normoxia e hipoxia.
--	---

Quedamos al pendiente de cualquier aclaración e información requerida al respecto. Sin más por el momento, agradezco su atención y aprovecho para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Dr. Arnolfo Aquino Gálvez
Laboratorio de Oncología Biomédica
INER, Ced. Prof.: 0435460
Asesor Externo


Dra. Elizabeth Sánchez Miranda
Lab. Biología Experimental, UIDIS.
UAM-X, No. Económico 33148
Asesor Interno


Cécilia Romero Carrillo
Matrícula: 2142027916

Ciudad de México, 9 de septiembre de 2020


CDE. PATRICIA ENZALDO DE LA CRUZ
Coordinadora Divisional de Servicio Social de CBS
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
PRESENTE

Asunto: Extensión de periodo de cumplimiento de servicio social.


Por medio de la presente, hacemos de su conocimiento que el periodo de cumplimiento de servicio social realizado por la alumna **Cecilia Romero Carrillo** con número de matrícula **2142027916** se vio modificado debido a cambios en el desarrollo de las actividades previamente establecidas. El periodo previamente registrado del 01 de Octubre de 2018 al 01 de Abril de 2019 se extendió del **01 de Octubre de 2018 al 01 de julio de 2019.**

Quedamos al pendiente de cualquier aclaración e información requerida al respecto. Sin más por el momento, agradezco su atención y aprovecho para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dr. Arnoldo Aquino Gálvez
Laboratorio de Oncología Biomédica
INER, Ced. Prof.: 0435460
Asesor Externo



Dra. Elizabeth Sánchez Miranda
Lab. Biología Experimental, UIDIS.
UAM-X, No. Económico 33148
Asesor Interno



Cecilia Romero Carrillo
Matrícula: 2142027916



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QFB

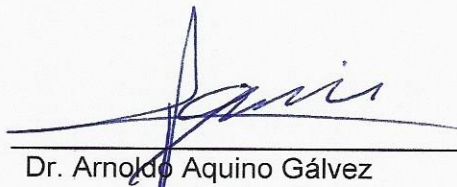
REGISTRO DEL SERVICIO SOCIAL:

EFFECTO DEL DICLOROACETATO DE SODIO (DCA) Y 2-METOXIESTRADIOL (2ME) EN CULTIVO DE CÉLULAS PULMONARES A549 EXPUESTAS A HIPOXIA.

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A):
CECILIA ROMERO CARRILLO

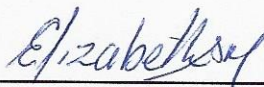
Matrícula
2142027916

ASESOR EXTERNO



Dr. Arnaldo Aquino Gálvez
Laboratorio de Oncología Biomédica
INER, Ced. Prof.: 0435460

ASESOR INTERNO



Dra. Elizabeth Sánchez Miranda
Lab. Biología Experimental, UIDIS.
UAM-X, No. Económico 33148

Ciudad de México, a 9 de septiembre de 2020.

CONTENIDO

1. Introducción.....	3
1.1 Cáncer.....	3
1.1.2 El papel de la hipoxia en el desarrollo del cáncer.	3
1.1.3 Reprogramación del metabolismo energético.	5
1.1.3.1 El efecto Warburg.....	5
1.1.3.2 Resistencia a la anoikis.....	7
1.1.3.3 Glutaminólisis.....	8
2. Cáncer pulmonar.....	8
2.1. Definición y epidemiología.	8
2.2 Tratamiento.....	9
3. Justificación.....	11
4. Hipótesis.....	12
5. Objetivos.....	12
5.1 Objetivos Generales.....	12
5.2 Objetivos Específicos.....	12
6. Material y métodos.....	12
6.1 Adquisición y preparación de fármacos.....	13
6.2 Cultivos celulares.	13
6.3 Aplicación de tratamientos.....	13
6.4 Determinación de glucosa, glutamina, lactato y glutamato.....	14
6.5 Ensayo de viabilidad celular con cristal violeta.....	14
6.6 Análisis estadístico.....	15
7. Resultados.....	15
7.1 Determinación de glucosa y lactato.....	15
7.2 Determinación de glutamina y glutamato.....	20
7.3 Viabilidad de células A549 estimuladas con DCA y 2-ME.....	23
8. Análisis de los resultados.....	26
8.1 El papel del dicloroacetato de sodio (DCA) en la reprogramación del metabolismo celular.....	26

8.2 Efecto de la concentración de oxígeno en el consumo y metabolismo de la glutamina.	29
8.3 Efecto de la combinación de DCA con 2ME en la viabilidad celular.	30
9. Conclusión.....	31
Bibliografía	32

1. Introducción

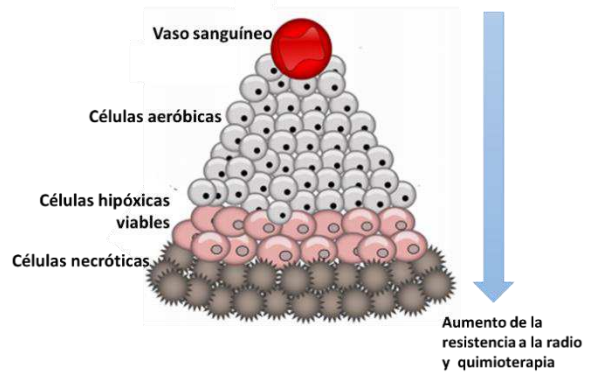
1.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por un descontrol en los procesos de crecimiento y proliferación de células anormales, con capacidad de invasión. La proliferación casi ilimitada de estas células anormales llega a formar masas denominadas “tumores o neoplasias”, que en su expansión pueden llegar a destruir a los tejidos y trasladarse a otros órganos (Eguino Villegas et al., 2005).

1.1.2 El papel de la hipoxia en el desarrollo del cáncer

En los tumores sólidos se encuentran tres principales regiones tisulares: la normóxica, la hipóxica y la necrótica (Figura 1), denominadas así debido a los niveles de oxígeno fluctuantes en el tejido tumoral y al crecimiento de este. El crecimiento de un tumor requiere de una red vascular local que le suministre oxígeno y nutrientes, por lo que las células más cercanas a los vasos sanguíneos (normóxicas) son en su mayoría viables y proliferativas, sin embargo, conforme las células se alejan de los vasos sanguíneos pueden volverse anóxicas dando lugar a zonas necróticas (Al Tameemi et al, 2019). Antes de esto, cuando las células son hipóxicas se caracterizan por un aporte limitado de O₂ provocado por una alta proliferación celular, y una red vascular deficiente, estructural y funcionalmente anormal que no mantiene un flujo constante de O₂, así como de nutrientes y otras moléculas, como quimioterapéuticos, transportadas por el torrente sanguíneo (Viallard y Larrivee, 2017).

Figura 1. Regiones de los tumores sólidos según su nivel de oxígeno. Los tumores presentan diversas regiones definidas por el suministro de oxígeno que las células reciben. De esta manera existe una zona rica en oxígeno situada cerca de los vasos sanguíneos donde se encuentran las células aeróbicas, conforme las células se alejan del suministro de sangre el ambiente se vuelve hipóxico y anóxico. Tomado y modificado de (Al Tameemi et al., 2019).



En las células normales, la hipoxia generalmente conduce a la muerte celular, sin embargo, en las células tumorales, la hipoxia tiene diferentes consecuencias biológicas que son reguladas por el Factor Inducible por Hipoxia (HIF) (Zhu et al., 2010). El HIF es un heterodímero que consiste en una subunidad α dependiente de oxígeno (HIF- α) y una subunidad β independiente de oxígeno (HIF- β) y que se expresa de manera constitutiva. HIF- α tiene tres isoformas (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α), mientras que HIF- β tiene dos isoformas (HIF-1 β y HIF-2 β).

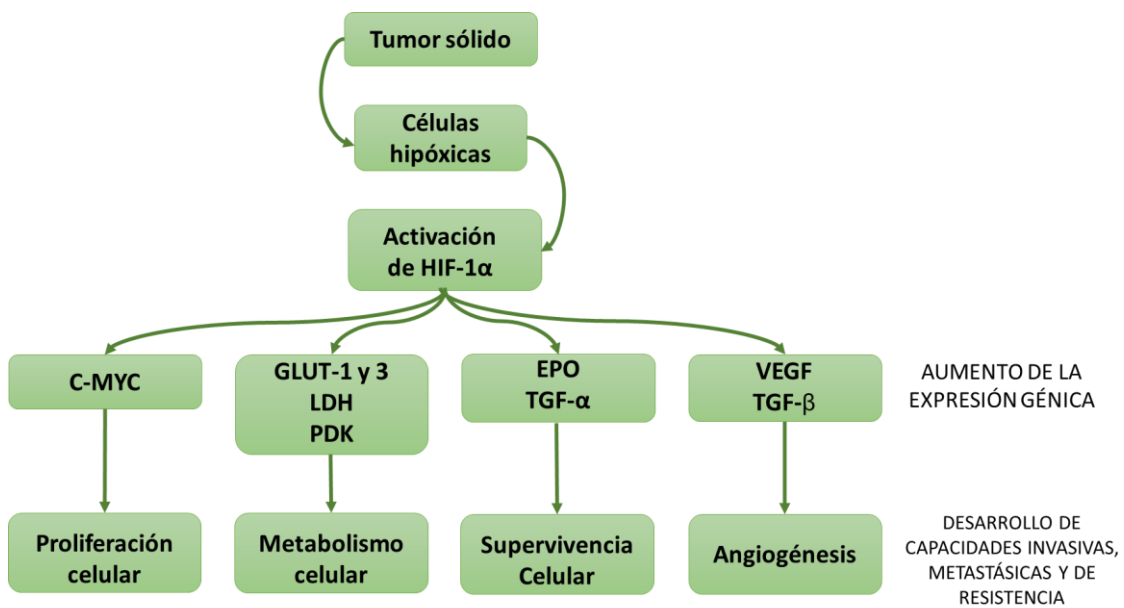


Figura 2. Papel de HIF-1 α en la expresión de moléculas que se involucran en la progresión del cáncer. En los tumores los niveles de oxígeno fluctúan pero en promedio son hipóxicos y bajo estas condiciones aumentan los niveles nucleares de HIF-1 α , quien induce un incremento en la expresión de moléculas que tienen efectos importantes en la progresión del cáncer como la proliferación y

supervivencia celular, cambios en el metabolismo, y angiogénesis, favoreciendo sus propiedades invasivas y metastásicas. C-MYC; protooncogén, GLUT-1; Glucotransportador 1, GLUT-3; Glucotransportador 3, LDH; lactato deshidrogenasa, PDK; Fosfato deshidrogenasa, EPO; Eritropoyetina, TGF- α ; Factor de Crecimiento Transformante alfa, VEGF; Factor de Crecimiento Vascular Endotelial, TGF- β ; Factor de Crecimiento Transformante beta. Tomado y modificado de (Masoud y Li, 2015).

HIF-1 α es responsable de la expresión de varias proteínas que aumentan la disponibilidad de oxígeno y la adaptación a la hipoxia (Figura 2.). A niveles de presión parcial de oxígeno (pO₂) inferiores a 10-15 mm Hg, aumenta la expresión de genes involucrados en el mantenimiento estable de la concentración de H⁺ (anhidrasa carbónica, CA-IX), el consumo de glucosa (transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3) y la creación de nuevos vasos sanguíneos (factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF) (Span y Bussink, 2015). Cuando se llegan a niveles de pO₂ de 1 mm Hg se reduce la fosforilación oxidativa y las células cambian a un metabolismo glucolítico para mantener niveles adecuados de ATP, HIF-1 α media esta conversión metabólica a través de la inducción de enzimas involucradas en la vía de la glucólisis (hexoquinasa, HK, lactato deshidrogenas, LDH, piruvato deshidrogenasa, PDH, etc.). HIF-1 α también promueve la migración de células tumorales a través de la activación transcripcional de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Masoud y Li , 2015).

Los cambios antes mencionados, entre otros, tienen consecuencias en la progresión del cáncer debido a que juegan un papel importante en la adquisición de propiedades invasivas y metastásicas (Semenza, 2016) así como resistencia a la quimioterapia y radioterapia, y que juntas constituyen el fenotipo letal del cáncer (Semenza, 2012).

1.1.3 Reprogramación del metabolismo energético

1.1.3.1 El efecto Warburg

La reprogramación del metabolismo energético es otro sello distintivo del cáncer ya que las células cancerosas metabolizan la glucosa de manera diferente que las células no transformadas. De manera normal, las células consumen glucosa que

metabolizan a piruvato en el citoplasma a través de la glucólisis, el piruvato luego es dirigido hacia las mitocondrias donde es oxidado a acetil-CoA para alimentar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y continuar la fosforilación oxidativa. A través de la oxidación completa de la glucosa las células generan 36 moléculas de ATP, energía que utilizan para, entre otros mecanismos, la proliferación y supervivencia. Las células cancerosas aumentan su tasa glucolítica, sin embargo, el rendimiento de piruvato no es proporcional a su oxidación en la mitocondria, ya que la mayor parte se queda en el citoplasma y es convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 3.), lo que resulta en la producción ineficiente de 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa y la secreción de lactato en el microambiente tumoral. A este desacoplamiento entre la glucólisis y el TCA se conoce como efecto Warburg o glucólisis aerobia, y es un fenotipo metabólico característico del cáncer (Lu, 2019).

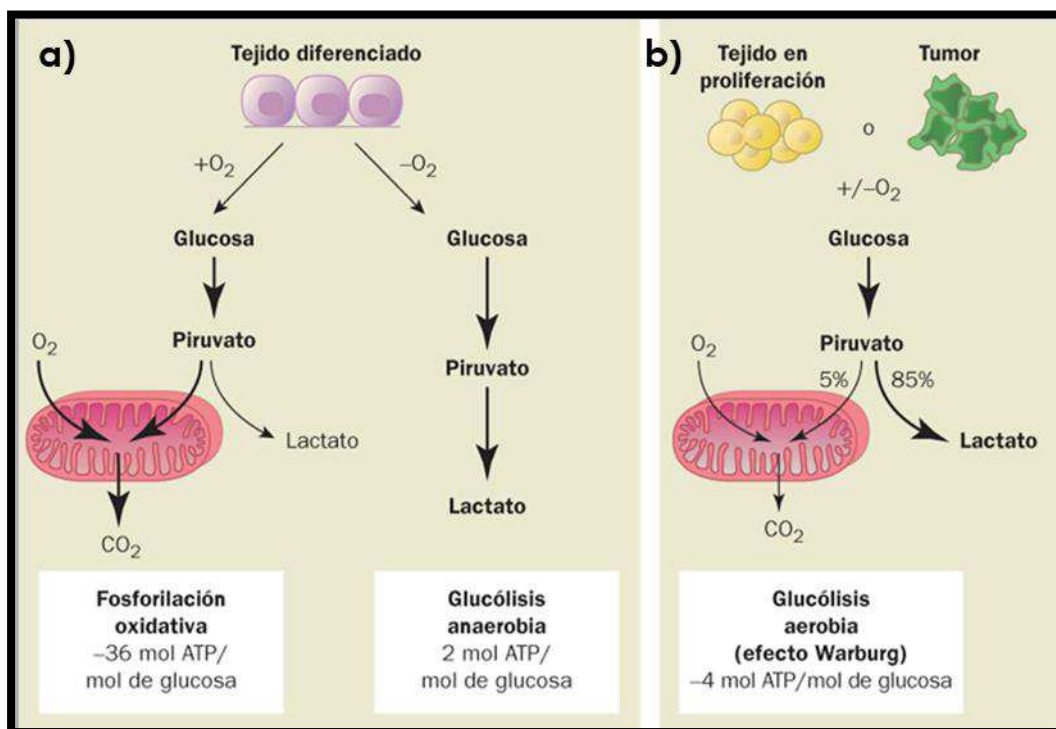


Figura 3. El efecto Warburg frente a fosforilación oxidativa. (a) En células sanas, el ATP se obtiene por fosforilación oxidativa que produce eficientemente cerca de 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa metabolizada. En contraste, (b) los tejidos tumorales proliferativos, en especial en circunstancias de hipoxia, utilizan la glucólisis aerobia para producir energía para la supervivencia celular y para generar los elementos esenciales de nuevas células. (Longo et al., 2018)

Como se mencionó antes, en las células normales el piruvato resultado de la glucólisis, es convertido a acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH), así puede entrar en el ciclo de Krebs para liberar NADH que impulsa el proceso del transporte de electrones para generar ATP. En células cancerígenas se ve incrementada la actividad de la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) que fosforila a la PDH dejándola inactiva lo cual disminuye la oxidación del piruvato en la mitocondria y aumenta la conversión de piruvato a ácido láctico en el citosol, además, el gen que codifica la piruvato deshidrogenasa cinasa 1 (PDK1) es un objetivo directo de HIF-1 α , por lo que en hipoxia también aumenta la producción y acción de PDK1 (Figura 4) (Kim et al, 2006).

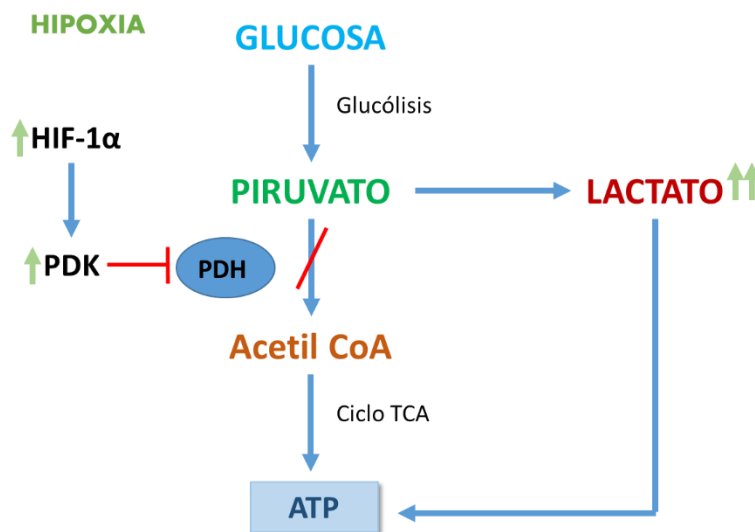


Figura 4. El papel de la PDK como promotora de la producción de lactato. En las células cancerígenas se manifiesta una alta actividad de la enzima PDK1 que redirecciona el metabolismo hacia la producción de lactato, inhibiendo la conversión de piruvato en Acetil CoA. Tomado y Modificado de (Rebellón et al., 2014).

1.1.3.2 Resistencia a la

anoikis

Además de incrementar el metabolismo anaeróbico, PDK1 está implicada en el desarrollo de resistencia a la anoikis. La anoikis es un proceso apoptótico al que las células se someten al perder contacto con la matriz extracelular o las células vecinas. La sobreexpresión de PDK1 protege a las células cancerosas de la anoikis, y desarrollan su capacidad de sobrevivir al desprendimiento de los sitios primarios y propagarse por todo el organismo (Kim et al, 2012), mientras que el agotamiento de PDK1, restablece la susceptibilidad a la misma (Guo et al, 2019). Debido a lo anterior, dicha enzima resulta atractiva como un blanco terapéutico proapoptótico y anti metastásico en el desarrollo tumoral.

1.1.3.3 Glutaminólisis

Las células cancerosas en proliferación aumentan su captación de glutamina que es metabolizada a glutamato y posteriormente a α -cetoglutarato (α -KG), por un proceso denominado glutaminólisis (Estévez-García et al., 2014). La glutaminólisis está regulada positivamente en muchos tipos de cáncer, debido a la conversión de piruvato en lactato, que reduce la entrada de carbono derivado de la glucosa hacia la acetil-CoA, y el drenaje permanente de los intermediarios del ciclo del TCA en vías biosintéticas (Vanhove, 2019).

La glutamina proporciona la fuente crucial de nitrógeno a estas células que proliferan rápidamente para la síntesis de aminoácidos. Además, en lugar de oxidar completamente la glutamina para producir ATP, las mitocondrias de las células cancerosas derivan la glutamina en citrato para la producción de lípidos y para la producción de NADPH por la isocitrato deshidrogenasa (IDH), y en malato que también puede convertirse en piruvato por la enzima málica y producir NADPH. Aunque puede parecer que esta forma de metabolismo es ineficiente por la reducida producción de energía, la mayor producción de ATP no cumple los requisitos de una célula que se multiplica rápidamente tan efectivamente (Li et al, 2015) si no se tienen los intermediarios del ciclo de TCA suficientes que alimenten las rutas anabólicas que son operativas en células en crecimiento y en proliferación (Ahn y Metallo, 2015).

2. Cáncer pulmonar

2.1. Definición y epidemiología

El cáncer es una patología que se puede presentar en cualquier órgano del cuerpo y se clasifica según las características de las células. El cáncer de pulmón se divide en dos clases histológicas, que crecen y se propagan de manera diferente, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNCP) y el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), dicha clasificación es importante para la elección del tratamiento y el pronóstico de la enfermedad (Hassan et al. , 2015). El CPNCP supone el 80-85% de los cánceres de pulmón e incluye fundamentalmente los siguientes tipos histológicos: epidermoide, adenocarcinoma y de células grandes (OncoSur, 2007).

El cáncer de pulmón es el más común y la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer en el mundo. En el 2018, el Observatorio Mundial del Cáncer (GLOBOCAN, por sus siglas en inglés) lo posicionó como la primera causa de muerte en hombres, y la segunda en mujeres (Bray et al., 2018). En 2013, en México, fue la segunda y cuarta causa de muerte entre hombres y mujeres respectivamente (Mohar-Betancourt et al., 2017). Actualmente se encuentra como la cuarta causa de muerte en ambos géneros (World Health Organization [WHO], 2018). Sin embargo, sigue representando un problema de salud debido a la falta de tratamientos efectivos. La radioterapia es el principal tratamiento de primera línea para el cáncer de pulmón en pacientes en etapa avanzada y etapa temprana asociada a otras patologías, que no pueden ser sometidos a cirugía, pero la tasa de supervivencia a 5 años sólo ha mejorado hasta un 20% (Sun et al., 2015).

2.2 Tratamiento

Las opciones de tratamiento para los pacientes con CPCP y CPCNP son diferentes. La quimioterapia y la radioterapia se consideran las opciones de tratamiento estándar para los pacientes con CPCP, mientras que para el CPCNP el tratamiento depende principalmente del estadio sin importar el subtipo histológico (Lu et al., 2019). La cirugía es el tratamiento estándar para el estadio I de CPCNP, desafortunadamente, al 25% de los pacientes no se les ofrece esa posibilidad por otras comorbilidades médicas que impiden la resección segura (McMurry et al., 2017).

Recientes estudios sobre el perfil molecular del CPCNP han identificado muchos objetivos terapéuticos nuevos, así como una inestabilidad genómica extrema que explica el alto grado de resistencia al tratamiento convencional con citostáticos (Kutkowska et al., 2017). Gracias al estudio y una mayor comprensión de las vías biológicas que impulsan la supervivencia, la proliferación y la metástasis, se han evaluado una amplia variedad de agentes antiangiogénicos, inhibidores del factor de crecimiento, agentes proapoptóticos y moduladores epigenéticos (Schneider y Kalemkerian, 2016).

La reprogramación metabólica es un fenotipo característico del cáncer que también ha sido foco de atención para la búsqueda de nuevas terapias para combatir el cáncer. Dentro de las moléculas con acción sobre el metabolismo se encuentra el dicloroacetato (DCA) que es un monocarboxilato utilizado para tratar enfermedades metabólicas o cardiovasculares hereditarias debido a su capacidad para bloquear a la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) que juega un papel importante en la inhibición de la oxidación del piruvato al final de la glucólisis. En cáncer se utiliza principalmente para reducir la acidosis láctica.

El DCA reduce la acción de PDK sobre la PDH, lo que provoca un aumento en la actividad del PDH, produciéndose mayor cantidad de acetil- CoA redirigiendo el metabolismo hacia el ciclo de Krebs y cadena respiratoria (Tan Allen et al., 2015) (Figura 5). Esto supondría que el comportamiento metabólico de la célula tumoral es similar al de una célula sana en condiciones de normoxia, por lo que se esperaría una disminución en la concentración de HIF y de la transcripción de los genes implicados en la adaptación a la hipoxia y desarrollo del cáncer, aumentando la susceptibilidad de la célula al estímulo de otras moléculas.

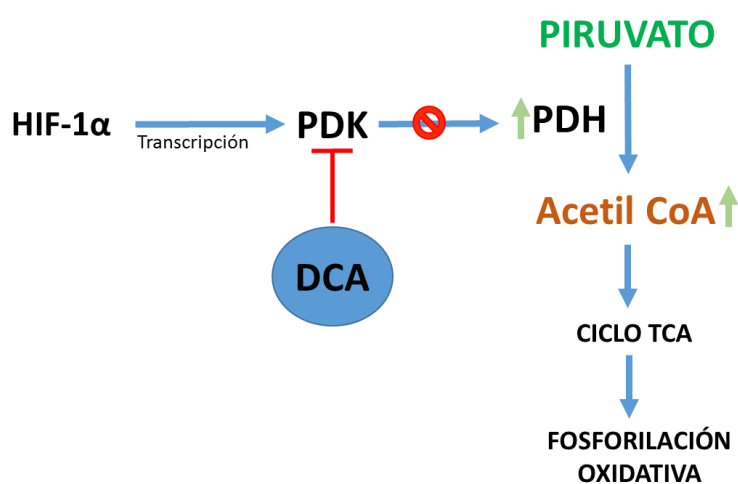


Figura 5. Mecanismo de acción del DCA. Como inhibidor de PDK, el dicloroacetato (DCA) puede atenuar la progresión del cáncer a través de la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa regulando el inicio del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. Tomado y modificado de: (Rebellón et al., 2014).

Por otro lado, el 2-metoxiestradiol (2ME) es un metabolito natural de los estrógenos endógenos 17β-estradiol y 2-hidroxiestradiol, que tiene un efecto antiproliferativo y proapoptótico que ha sido comprobado en varias líneas celulares *in vitro* (Parks et al., 2011). Sin

embargo, dicho efecto no está asociado a su interacción con los receptores de estrógenos. En un estudio que se realizó en células de cáncer de próstata se demostró que el 2ME regula negativamente a HIF-1 α en el nivel postranscripcional e inhibe la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que promueve la angiogénesis. La inhibición de HIF-1 α se produce corriente abajo de la interacción del 2ME con los sitios de unión de colchicina, inhibiendo la formación de los microtúbulos y provocando la interrupción de la interfase G₂/M (Mabjeesh et al., 2003). En un trabajo reciente se reportó que 2ME inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis en las células A549 en condiciones de normoxia, pero no bajo las condiciones de hipoxia (Aquino-Gálvez et al., 2016).

3. Justificación

En México y a nivel mundial el cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte, ya que existen pocos tratamientos que son efectivos en un número reducido de casos. Se sabe que una de las posibles causas de la resistencia a la radio y quimioterapia es el estado hipóxico de las células cancerígenas. Los altos niveles de expresión de HIF-1 α se correlacionan positivamente con la progresión del tumor y el mal resultado del paciente en el cáncer de pulmón debido a los cambios genéticos y fisiológicos que ocasiona y promueven el desarrollo del cáncer favoreciendo la supervivencia celular. HIF-1 α aumenta la expresión de transportadores de glucosa para aumentar su captación de glucosa, así como la expresión de PDK que tiene un papel importante en el metabolismo aeróbico de las células cancerosas y su resistencia a la quimioterapia. Es por eso que en este trabajo se destaca el uso del DCA, que reduce la actividad de la PDK y permite la acción de PDH y un aumento en la conversión de piruvato a acetil-CoA con la consecuente entrada al ciclo de Krebs y oxidación fosforilativa, así, mediante un análisis cuantitativo de los metabolitos implicados en la glucólisis y la glutaminólisis, se busca comprobar el estado normóxico de las células cultivadas y estimuladas con DCA, incluso bajo condiciones de hipoxia. Por otro lado, la respiración normal de una célula supondría que los niveles nucleares de HIF-1 α disminuyen y las

células estarían vulnerables a la acción antimetabólica del 2ME, acción que se evaluará mediante el análisis de la viabilidad de células A549.

4. Hipótesis

Las células A549 expuestas a DCA mantendrán las características metabólicas de las células en ambiente normóxico, condición que permitirá las acciones citotóxicas del 2ME.

5. Objetivos

5.1 Objetivos Generales

- Evaluar los efectos del DCA sobre los marcadores metabólicos en las células A549 en condiciones de normoxia e hipoxia
- Analizar los efectos citotóxicos del 2ME en las células A549 después de ser expuestas a DCA.

5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del DCA en el metabolismo de las células A549 en condiciones de hipoxia, a través de la cuantificación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato.
- Evaluar el efecto del 2ME en el metabolismo de las células A549 en condiciones de hipoxia, a través de la cuantificación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato.
- Evaluar el efecto del DCA en combinación con el 2ME sobre el metabolismo de las células A549 en condiciones de hipoxia, a través de la cuantificación de glucosa, lactato, glutamina y glutamato.
- Evaluar el efecto del DCA en combinación con 2ME en la viabilidad de células A549 en condiciones de normoxia e hipoxia.

6. Material y métodos

Este estudio se realizó en el laboratorio de Oncología Biomédica en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) del 01 de abril del 2018 al 01 de julio del 2019.

6.1 Adquisición y preparación de fármacos

El DCA y el 2-ME se adquirieron de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO), así como el dimetilsulfóxido (DMSO). El DCA liofilizado se disolvió en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) y se mantuvo una concentración de 40mM. El 2ME se solubilizó en DMSO y el stock obtenido fue de 33mM. Las posteriores diluciones se realizaron en medio DMEM para una concentración final de 10 μ M.

6.2 Cultivos celulares

Las células A549 de adenocarcinoma pulmonar humano que forman parte del grupo CPCNP, se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection). Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM enriquecido al 10% con suero fetal bovino (SFB) y antibiótico-antimicótico al 1.0%. El cultivo se incubó a 37^o C, en un ambiente con CO₂ al 5%. Se realizaron subcultivos para la propagación de las células.

6.3 Aplicación de tratamientos

Las células se dividieron en cuatro grupos experimentales y una vez alcanzada la confluencia del 90%, fueron expuestas a los diferentes tratamientos farmacológicos como se señala a continuación: 1) células que no recibieron tratamiento 2) células tratadas con 40 mM de DCA, 3) células con 10 μ M de 2-metoxiestradiol, y 4) células con la combinación de DCA y 2ME a las concentraciones ya señaladas.

Dicho ensayo fue realizado en condiciones de normoxia (5% de CO₂) e hipoxia (1% de O₂,) a 37 °C durante 72 h.

Para las condiciones de hipoxia se utilizó una cámara de incubación modular con una mezcla de 95% N₂ y CO₂, el contenido de oxígeno dentro de la cámara fue del 1%.

Los tratamientos fueron preparados en medio de cultivo DMEM con antibiótico al 0.1% y enriquecido con SFB al 1% para minimizar variables en el crecimiento y proliferación celular.

6.4 Determinación de glucosa, glutamina, lactato y glutamato

Para evaluar los efectos de los fármacos sobre el metabolismo de las células A549 se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina y glutamato en los sobrenadantes de cada muestra. Para ello cada muestra fue homogenizada e inmediatamente se cargaron 100 µl en una placa de 96 pozos para su lectura en el analizador bioquímico YSI 2900 (Life Sciences, Ohio, USA). El analizador contó con membranas con enzimas inmovilizadas d-glucosa oxidasa, L-lactato oxidasa, L-glutamina oxidasa o ácido L-glutámico oxidasa (YSI, Ohio, USA). El equipo hizo el análisis en 20 µl de cada muestra, los cuales deposita en la cámara de reacción y reporta la cantidad del metabolito correspondiente presente en la muestra. Se prepararon estándares específicos y se usaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los datos se reportan como glucosa y glutamina consumida y lactato y glutamato producido (mmol/L*mg proteína), los valores reales fueron calculados por diferencia entre la concentración inicial y la concentración final. Se determinó el volumen de evaporación para corregir la cantidad de cada metabolito y se normalizaron con la cantidad total de proteína celular obtenida en cada estímulo, la cual fue cuantificada con Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA.).

6.5 Ensayo de viabilidad celular con cristal violeta

La viabilidad celular fue analizada usando el ensayo de cristal violeta para determinar el posible efecto citotóxico del DCA y 2ME sobre las células A549, en condiciones de normoxia e hipoxia. Para ello, se cultivaron 2×10^4 células por pozo, en placas de 48 pozos y se les agregó medio de cultivo DMEM con diferentes concentraciones de DCA (5, 10, 20, 30 y 40Mm) y 2ME (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µM) y se incubaron durante 72 horas según el caso en condiciones de normoxia e hipoxia.

Terminado el tiempo de incubación, las células fueron fijadas con 500 µl de glutaraldehído al 1% durante 20 minutos, se enjuagaron con agua y se dejaron secar para posteriormente teñirlas con 500 µl de cristal violeta (0.5 %) durante 20 minutos. El cristal violeta se retiró con agua y la placa se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, a cada pozo se les agregó 200 µl de ácido acético

(10%) y la placa se mantuvo en agitación constante por 10 minutos. La densidad óptica de cada muestra se midió a 540 nm en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan EX.

6.6 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar normalidad de los datos obtenidos. Al no obtener una distribución normal de los datos, se procedió a un análisis no paramétrico con las pruebas de Kruskal-Wallis para la comparación de más de dos grupos y U Mann-Whitney. Los resultados se presentan como la mediana y sus rangos inter-cuartiles 25% y 75%. El análisis se realizó con el programa SPSS versión 17.0.

7. Resultados

En el presente trabajo se tuvo como objetivo conocer los efectos del dicloroacetato de sodio (DCA) y el 2-metoxiestradiol (2ME) en el metabolismo de las células A549, esto con la intención de establecer nuevos tratamientos farmacológicos contra el cáncer de pulmón. Para ello se probaron ambos fármacos solos y en combinación, en células de CPCNP.

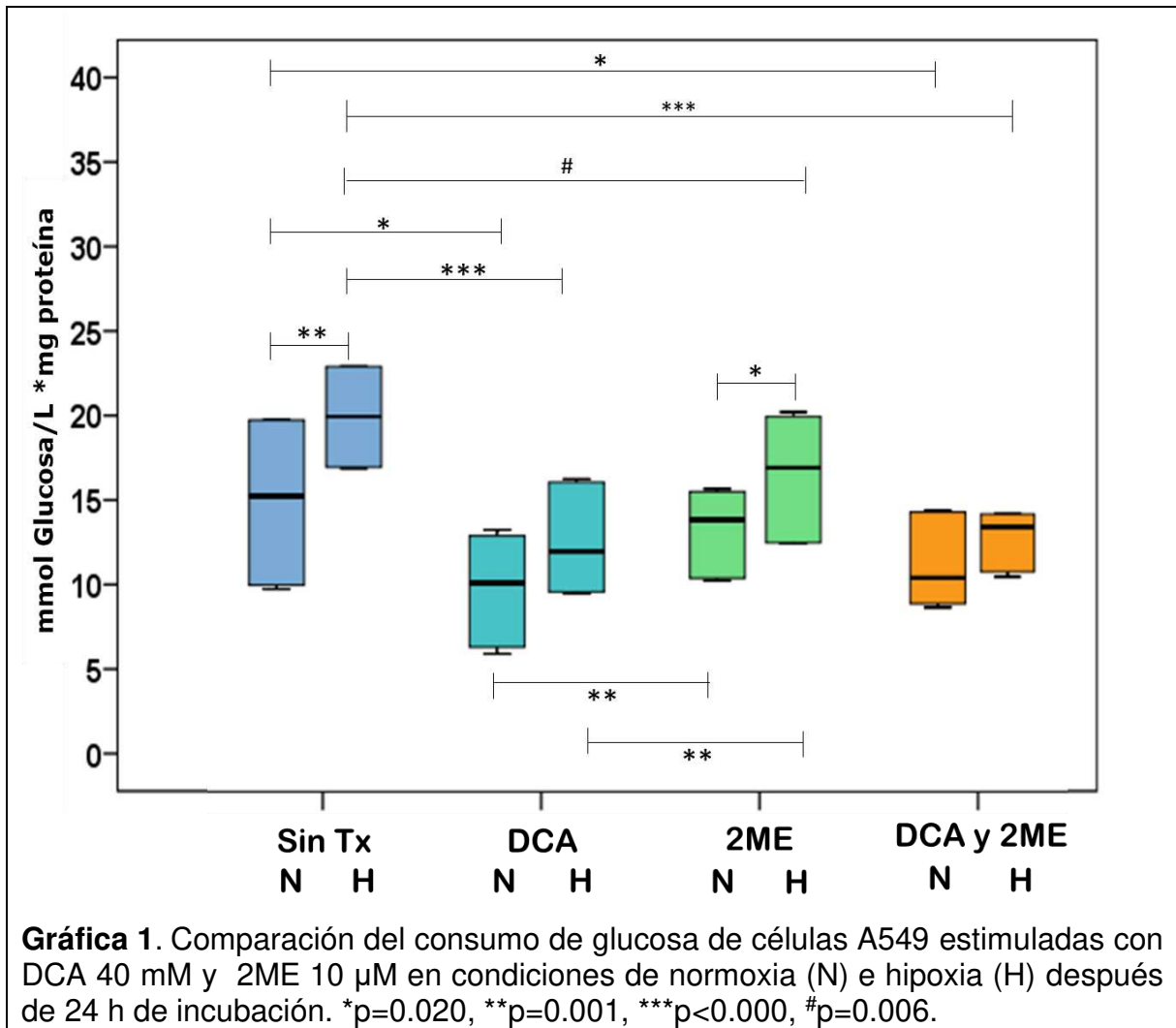
Con la finalidad de descartar los efectos intrínsecos de los fármacos que influyeran en los resultados, primero se evaluaron sus efectos citotóxicos. Posteriormente se cuantificaron las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina y glutamato que se consideran marcadores metabólicos en cáncer. Los detalles de los resultados se muestran y describen a continuación.

7.1 Determinación de glucosa y lactato

Como se ha mencionado anteriormente, las células cancerígenas consumen mucha más glucosa que las células normales, y aumentan su tasa glucolítica, sin embargo, la mayor parte del piruvato producido a través de la glucólisis es convertido hasta lactato en el citoplasma, debido a un desacoplamiento entre la glucólisis y el ciclo de Krebs (Efecto Warburg). Dado que la hipoxia es un factor que potencia el efecto Warburg, se midió el consumo de glucosa y la producción de lactato con la finalidad

de evaluar los efectos del DCA y el 2ME sobre las vías metabólicas involucradas. En la Gráfica 1 se observa que en condiciones de normoxia las células sin tratamiento registraron un consumo de glucosa de 15.23 (12.60-17.28 mmol/L*mg proteína). En tanto que las células con los diferentes tratamientos presentaron una disminución en el consumo como se señala a continuación, el grupo de células con DCA consumió 10.00 (8.19-11.62) mmol/L*mg proteína, el grupo con 2ME 13.87 (12.12-14.47) mmol/L*mg proteína y las células con la combinación de tratamientos consumió 10.62 (8.42-13.89) mmol/L*mg proteína. Solo los grupos tratados con DCA y la combinación de tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo sin tratamiento.

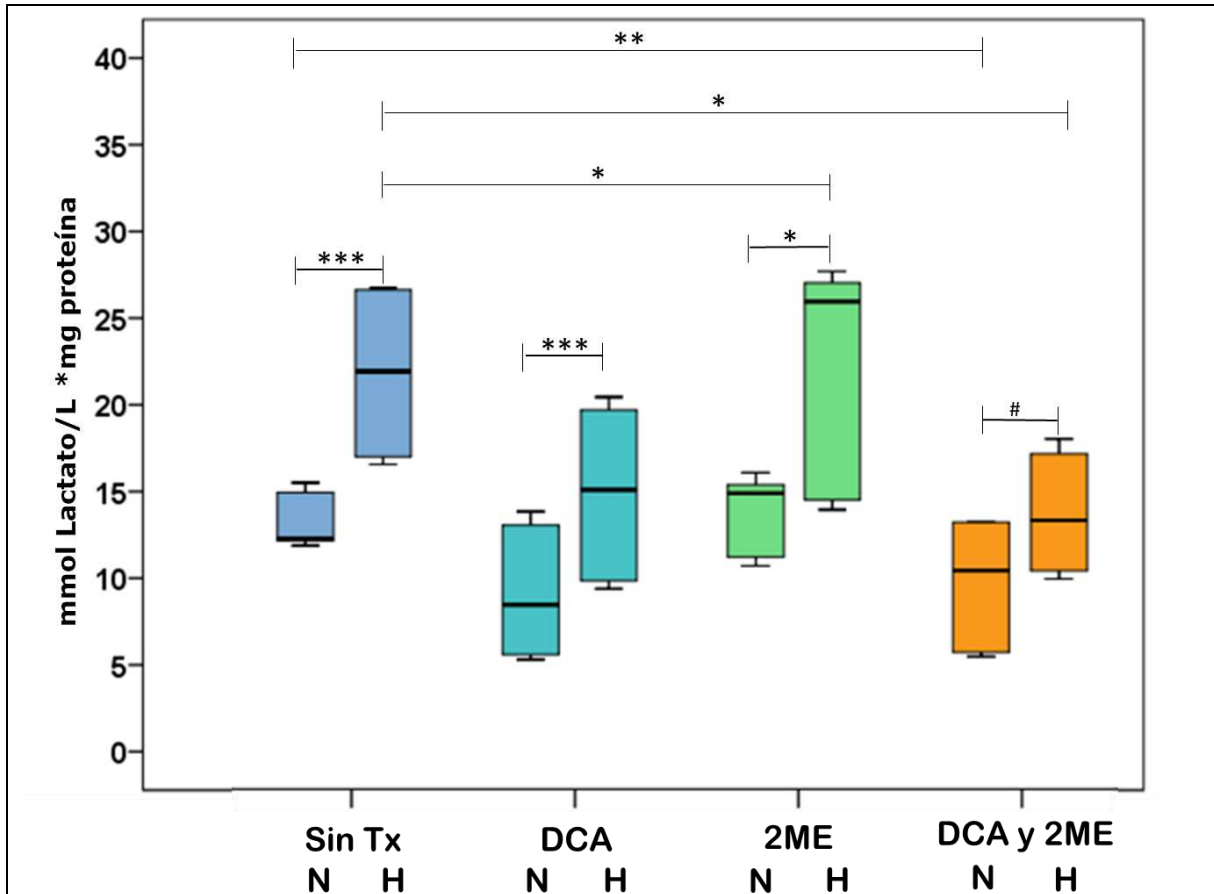
En condiciones de hipoxia las células sin tratamiento consumieron 20.52 (19.84-22.77) mmol/L*mg proteína valor mayor al registrado en condiciones de normoxia. Este resultado apoya al establecimiento de la hipoxia en el medio celular. Las células tratadas con DCA consumieron 12.19 (10.93-14.18) mmol/L*mg proteína, el grupo con 2ME consumió 18.77 (17.23-20.32) mmol/L*mg proteína y el grupo con la combinación DCA y 2ME consumió 13.67 (12.2-13.96) mmol/L*mg proteína, todos estos valores se encuentran disminuidos significativamente respecto al grupo sin tratamiento.



En general se observa que en condiciones de hipoxia las células conservan un patrón de respuesta a los tratamientos similar a las condiciones de normoxia, en ambos casos el DCA y la combinación de tratamientos disminuyen el consumo de glucosa, además, al no existir diferencias significativas entre los mismos grupos celulares en condiciones de normoxia e hipoxia podemos decir que como se esperaba, el DCA funciona disminuyendo el consumo de glucosa en ambos niveles de oxígeno. Por otro lado, en ambas condiciones el 2ME aumenta el consumo de glucosa respecto al grupo con DCA, mostrando diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, observamos que las condiciones de oxigenación ejercen un efecto en las células tratadas con 2ME al aumentar el consumo de glucosa en condiciones de hipoxia respecto a las células normóxicas, dato que sería interesante

reevaluar en la posterioridad ya que en la literatura no destaca ninguna acción del 2ME sobre el metabolismo glucolítico de las células.

Por otra parte, en la gráfica 2 nuevamente se observa un patrón similar de comportamiento entre ambas condiciones, hay un evidente y significativo aumento en la producción de lactato en condiciones de hipoxia para todos los casos, particularmente, en las células sin tratamiento lo que reafirma el estado hipóxico de las células.



Gráfica 2. Comparación de la producción de lactato de células A549 estimuladas con DCA 40 mM y 2ME 10µM en condiciones de normoxia (N) e hipoxia (H) después de 72h de incubación. *p=0.01, **p=0.02, ***p=0.001, #p=0.037.

Como se mencionó anteriormente, el DCA disminuye el consumo de glucosa lo que debería derivar en una menor producción de lactato, sin embargo, en la gráfica 2, los grupos con DCA y la combinación de tratamientos en condiciones de hipoxia aumentan la producción de lactato de manera significativa con respecto a los grupos

en normoxia, esto sugiere que en condiciones de hipoxia, no todo el lactato producido es de origen glucolítico sino de otras rutas metabólicas asociadas al estado hipóxico de las células.

En condiciones de normoxia se observa que el grupo sin tratamiento produjo 12.79 (12.60-17.48) mmol/L*mg proteína de lactato, el grupo con DCA y el grupo con la combinación produjeron 8.53 (6.93-10.76) mmol/L*mg proteína y 10.2 (7.84-11.71) mmol/L*mg proteína respectivamente, con diferencia estadísticamente significativa frente al grupo sin tratamiento. El grupo tratado con 2ME tuvo una producción ligeramente mayor de 14.90 (12.86-15.12) mmol/L*mg proteína de lactato, sin diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo sin tratamiento.

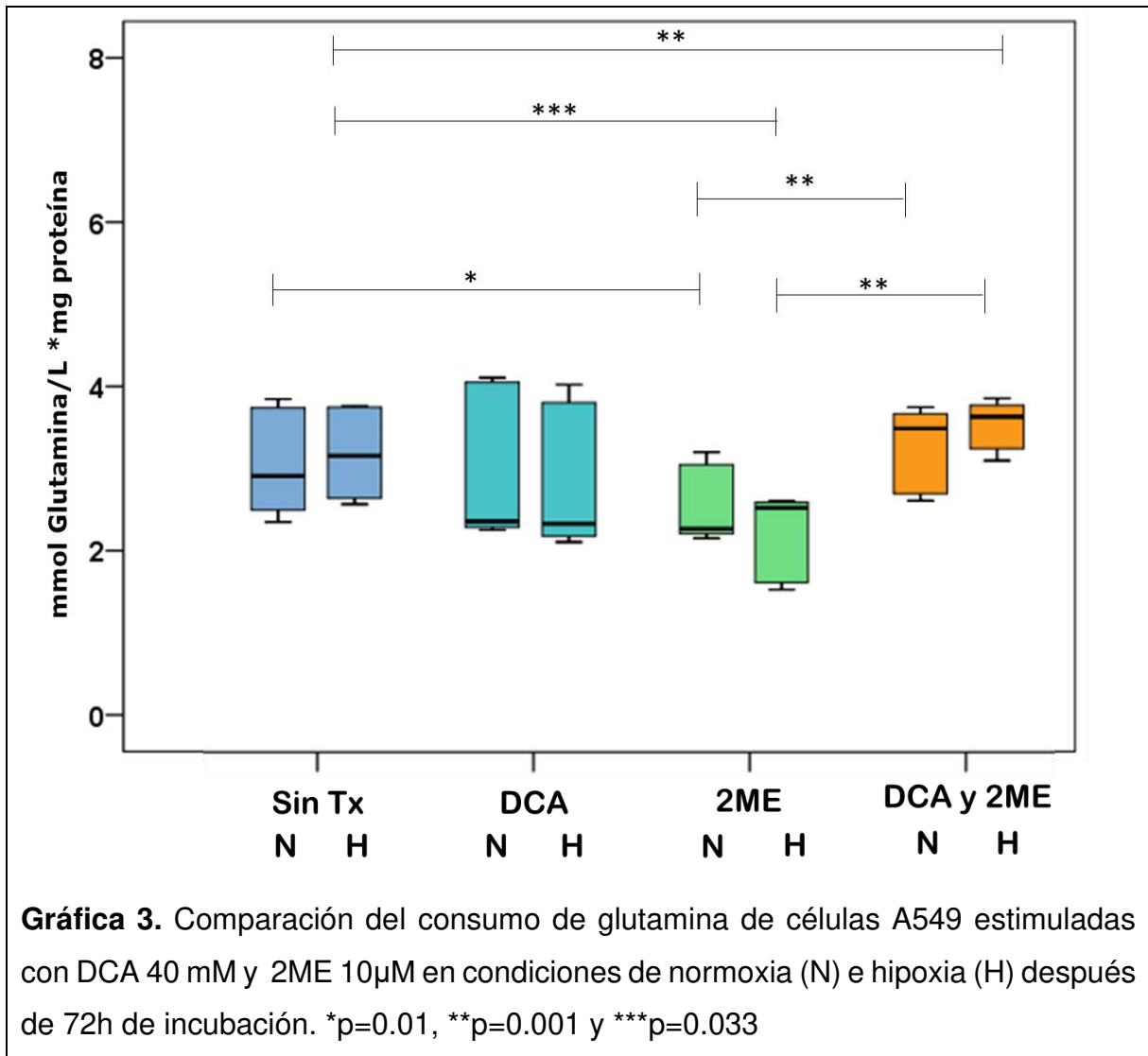
Por otro lado, al analizar la producción de lactato bajo condiciones de hipoxia se observa que el grupo sin tratamiento produjo 22.85 (21.74-28.79) mol/L*mg proteína, el grupo tratado con DCA 14.65 (12.07-17.07) mmol/L*mg proteína, las células con 2ME produjeron 25.35 (24.39-26.31) mmol/L*mg proteína y el grupo con la combinación produjo 12.66 (11.38-14.96) mmol/L*mg proteína. Al comparar a los grupos tratados con DCA solo y en combinación con 2ME contra el grupo sin tratamiento, existe una menor producción de lactato con diferencias estadísticamente significativas, esto se puede ligar al hecho de que el consumo de glucosa para estos grupos también se encuentra atenuado por la acción del DCA.

Cuando las células en condiciones de normoxia e hipoxia son tratadas con 2ME se observa un aumento en la producción de lactato que es estadísticamente significativo al compararse con el grupo de células tratados con la combinación, lo que podría ser un indicativo de muerte celular sin embargo, y como se observará más adelante, el ensayo de viabilidad celular se observa que a las concentraciones de 2ME y DCA utilizadas el efecto anti proliferativo predomina sobre el efecto citotóxico, por lo que nuevamente, el efecto aislado del 2ME sobre la glucólisis destaca como candidato a ser estudiado posteriormente.

7.2 Determinación de glutamina y glutamato

Para alimentar las vías metabólicas esenciales para su proliferación, las células cancerígenas aumentan su consumo de glutamina para solventar el ciclo de Krebs a través de los intermediarios de la glutaminólisis. Se ha descrito que la glutaminólisis también se ve potencializada por la hipoxia, por esta razón se cuantificaron el consumo de glutamina y la producción de glutamato en condiciones de normoxia e hipoxia. Los resultados obtenidos se describen y muestran a continuación.

Contrario a lo que se esperaba, la gráfica 3 muestra que las condiciones de oxígeno no influyen en el consumo de glutamina, sin embargo, de manera individual en condiciones de normoxia el grupo tratado con 2ME consumió 2.19 (2.17-2.56) mmol/L*mg proteína valor menor con diferencias significativas frente al grupo sin tratamiento que consumió 2.75 (2.55-3.20) mmol/L*mg proteína y el grupo con la combinación que consumió 3.29 (2.95-3.44)mmol/L*mg proteína.



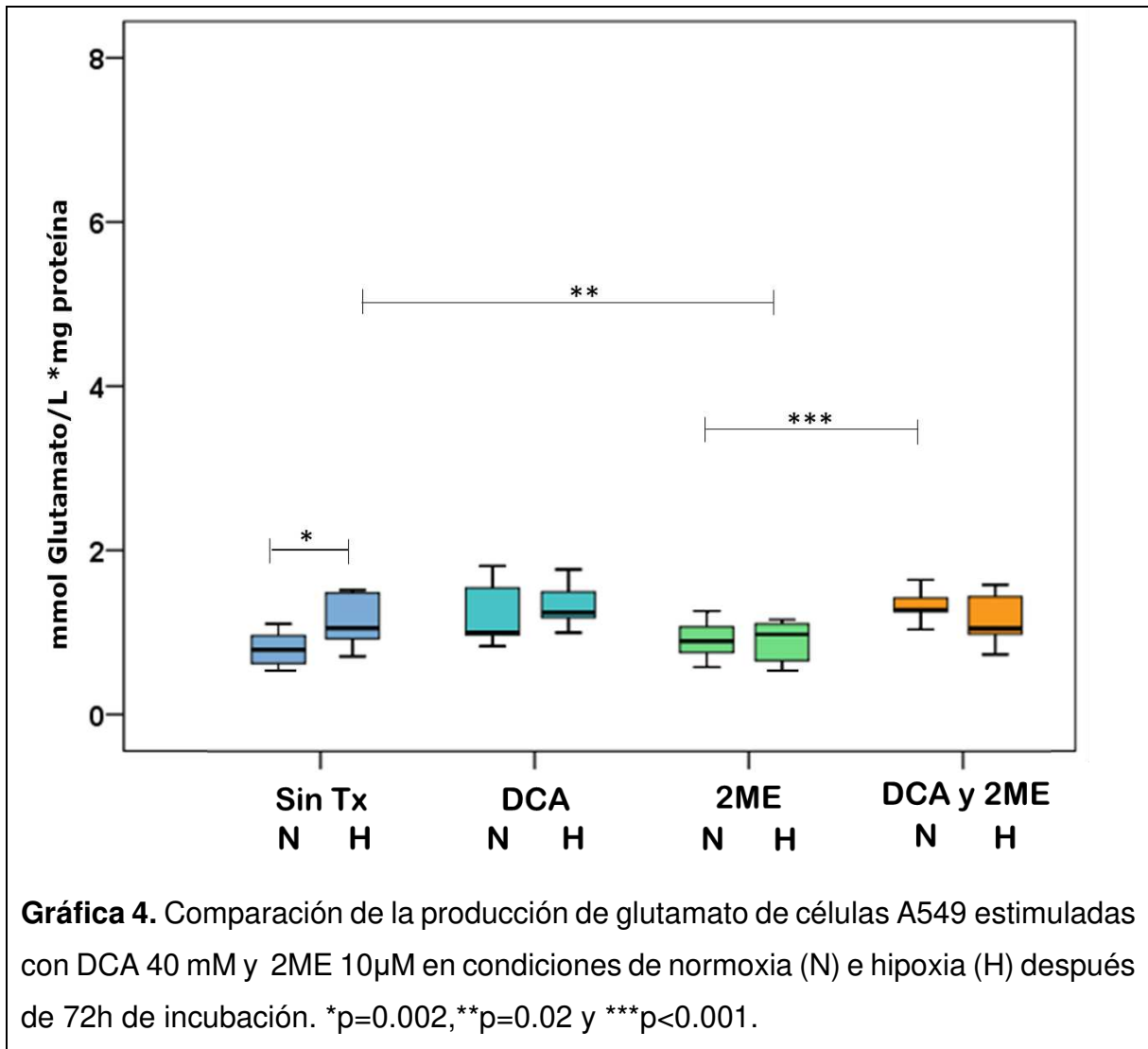
En hipoxia, el grupo sin tratamiento consumió 2.93 (2.75-3.29) mmol/L*mg proteína, el grupo con 2ME consumió 2.47 (2.4-2.54) mmol/L*mg proteína, el grupo con DCA consumió 2.18 (2.15-2.90) mmol/L*mg proteína y el grupo tratado con la combinación DCA y 2ME consumió 3.53 (3.32-3.63) mmol/L*mg proteína. Al igual que en normoxia, el grupo tratado con 2ME consumió significativamente menos glutamina que el grupo sin tratamiento, además, resulta interesante el hecho de que tanto en normoxia como en hipoxia el uso de la combinación de DCA y 2ME consume más glutamina incluso que el grupo control, y aunque solo bajo condiciones de hipoxia el análisis estadístico arrojó una diferencia estadística, se

creo pertinente ahondar más adelante sobre el comportamiento de las células al ser expuestas a la alternativa farmacológica propuesta.

Los resultados anteriores hacen suponer que, el consumo de glutamina no depende sólo de la condición de oxígeno sino de otras características del medio, como la concentración de glutamina extracelular u otros metabolitos.

Ahora bien, como producto del metabolismo de la glutamina, se cuantificó glutamato en condiciones de hipoxia y normoxia. En la gráfica 4 se observa que cuando las células no son expuestas a ningún tratamiento, aumentan la producción de glutamato en hipoxia con diferencia estadísticamente significativa. Aunque aparentemente existen diferencias entre los grupos tratados con DCA sólo y en combinación, no se registró ninguna significancia estadística entre una condición de oxígeno y otra.

En condiciones de normoxia el grupo sin tratamiento produce 0.62 (0.525-0.735) mmol/L*mg proteína, el grupo con DCA 0.87 (.85-1.18) mmol/L*mg proteína, grupo con 2ME produjo 0.66 (0.62-0.82) mmol/L*mg proteína y la combinación DCA y 2ME 1.17 (1.11-1.28) . Los grupos tratados con DCA sólo y en combinación produjeron más glutamato respecto al grupo sin tratamiento con diferencia estadísticamente significativa, mientras que el grupo con 2ME produjo significativamente menos glutamato que los grupos con DCA sólo y en combinación. Según la información de la gráfica 4 podemos decir que en normoxia la producción de glutamato está ligado al consumo de glutamina, puesto que las gráficas muestran un patrón de comportamiento similar, es decir, a mayor consumo de glutamina, mayor es la producción de glutamato.

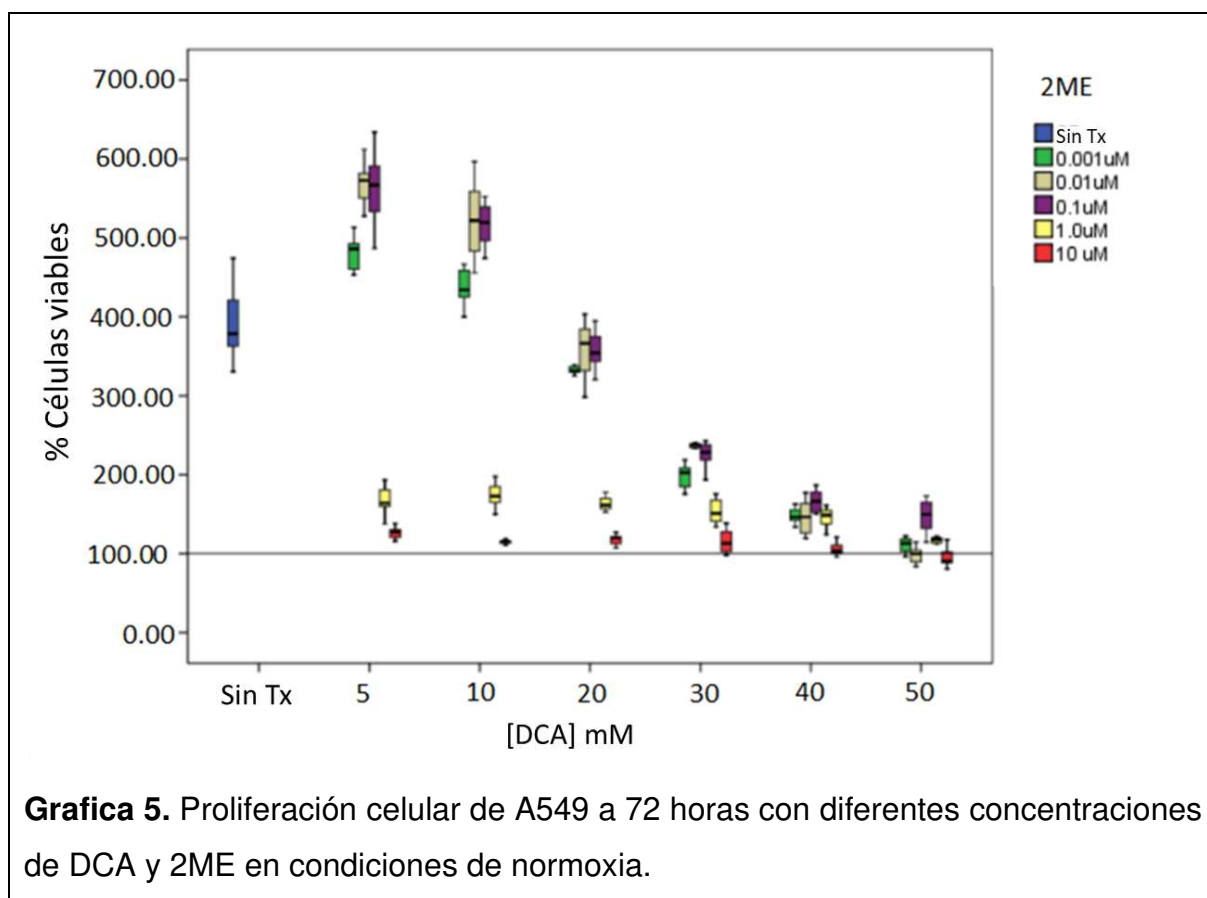


En hipoxia, la producción de glutamato sigue un patrón similar al de normoxia, sin embargo, ahora se observa una diferencia estadísticamente significativa a la baja entre el grupo sin tratamiento y el grupo con 2ME. Además, aparentemente en normoxia e hipoxia la mayor producción de glutamato fue por parte del grupo con DCA y 2ME y aunque no presentan una diferencia significativa contra sus respectivos controles, sigue un comportamiento ligado al consumo de glutamina.

7.3 Viabilidad de células A549 estimuladas con DCA y 2-ME

De acuerdo con los resultados anteriores el DCA funciona disminuyendo el consumo de glucosa en los grupos tratados con DCA y la combinación y en los diferentes niveles de oxígeno, además como consecuencia, también se ven disminuidos los

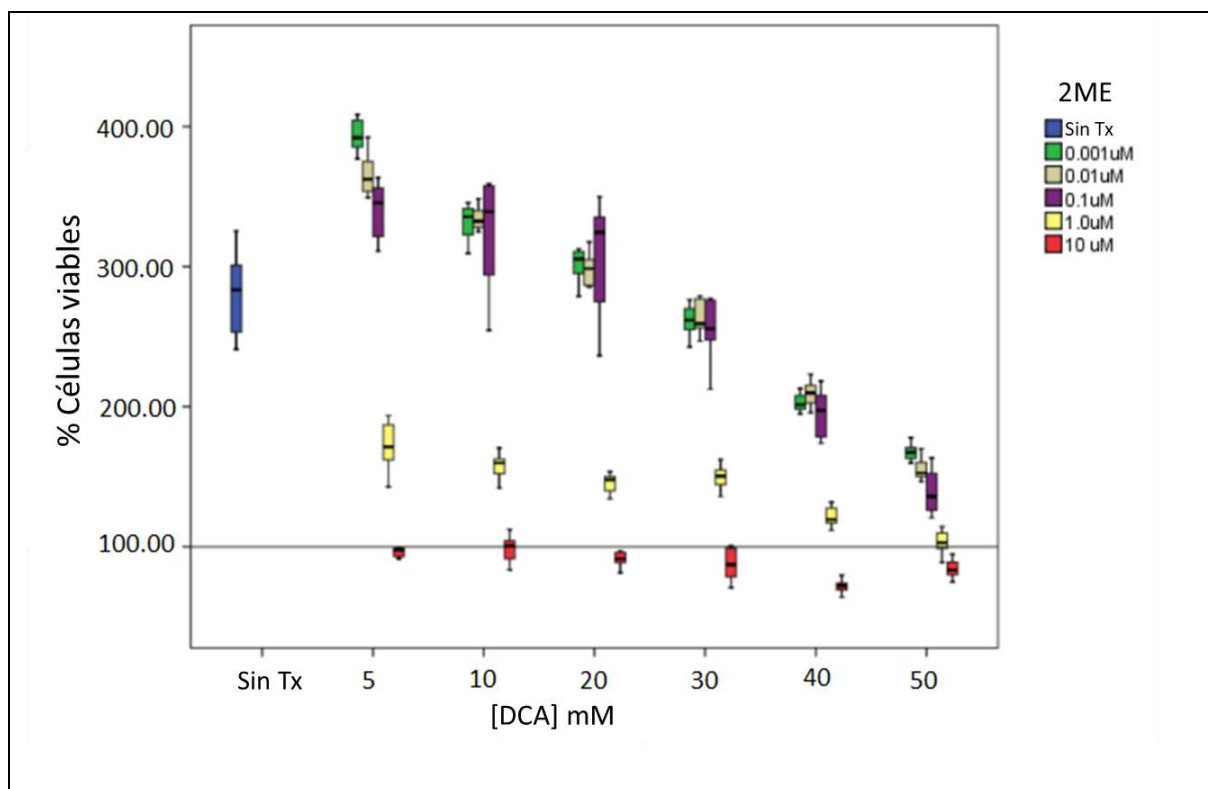
niveles en la producción de lactato. Sin embargo, al usar 2ME se observa un aumento en la producción de lactato que es estadísticamente significativo al compararse con el grupo de células tratados con la combinación, lo que podría ser un indicativo de muerte celular. A continuación se muestran los resultados en la viabilidad de las células a diferentes concentraciones de 2ME y DCA con la intención de determinar qué tipo de efecto (anti proliferativo o citotóxico) de los fármacos. La gráfica 5 muestra que las células sin tratamiento proliferaron hasta 280% más con respecto al porcentaje inicial (señalado con la línea base).



Por otra parte, cuando las células son tratadas con DCA en conjunto con el 2ME a bajas concentraciones, se observa un incremento de hasta 200% en el número de células respecto al grupo de células sin tratamiento. No obstante conforme se aumentan las concentraciones de ambos fármacos estos efectos se ven atenuados hasta registrarse un número de células similar al iniciarse el cultivo (señalado en la línea base) con las concentraciones más altas de ambos fármacos. Sin embargo con las concentraciones más altas de 2ME y las diferentes concentraciones del

DCA, solo se alcanza un incremento del 50% con respecto al número inicial de células, efecto muy parecido al reportado con las concentraciones más altas de ambos fármacos.

En la gráfica 6 se muestran los resultados bajo condiciones de hipoxia y se observa que la respuesta de las células a los diferentes tratamientos farmacológicos fue similar, no obstante es importante destacar que en estas condiciones las células sin tratamiento no alcanzan el porcentaje que se registra en condiciones de normoxia, el cual fue de 280 % y en este caso fue de 180% aproximadamente y tampoco se ve un aumento pronunciado en el número de células al ser tratadas con los fármacos, ya que este fue del 100% aproximadamente con respecto a las células sin tratamiento. No obstante el efecto de las combinaciones de ambos fármacos fue dependiente de las concentraciones tendiendo a disminuir el porcentaje de las células conforme aumentaron. Las concentraciones altas de 2ME (1 y 10 μ m) en combinación con las diferentes concentraciones de DCA no favorecieron el incremento del porcentaje de viabilidad, siendo que con 1 μ m la viabilidad aumento de 50 a 0 conforme fue aumentando la concentración de DCA y la 10 μ m presentó citotoxicidad al disminuir el porcentaje de células que iniciaron el cultivo.



Grafica 6. Proliferación celular de A549 a 72 horas con diferentes concentraciones de DCA y 2ME en condiciones de hipoxia.

En resumen, las gráficas 5 y 6, muestran una curva dosis-respuesta, dependiente de la concentración, ya que a medida que aumentan las dosis de DCA y 2ME el porcentaje de proliferación celular tiende a disminuir, lo que sugiere que los compuestos a bajas concentraciones puedan estar favoreciendo la proliferación celular, una respuesta que sería interesante evaluar más adelante. Considerando lo anterior la combinación que resultó de interés para estudiar el efecto citotóxico sobre las células A549, fue la de DCA 40mM y 2ME 10 μ m que no favoreció la proliferación celular.

8. Análisis de los resultados

8.1 El papel del dicloroacetato de sodio (DCA) en la reprogramación del metabolismo celular

Una de las posibles causas de la resistencia a la radio y quimioterapia es el estado hipóxico de las células cancerígenas y se correlaciona positivamente con la progresión y agresividad del tumor, resultando en un mal pronóstico para el paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas. La hipoxia provoca cambios genéticos y fisiológicos que promueven el desarrollo del cáncer, uno de estos cambios es la fermentación de la glucosa a través de la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno (glucólisis aerobia). De hecho, el flujo glucolítico exacerbado se describe como una forma efectiva para que las células cancerosas apoyen la proliferación rápida, una adaptación que no está presente en la mayoría de las células normales. Este flujo glucolítico exacerbado se ha vuelto un objetivo atractivo para los tratamientos debido a su especificidad para las células cancerosas (Schoonjans et al., 2020), es por eso que y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se destaca el uso del DCA para conservar el fenotipo metabólico de las células A549 normóxicas, que se ve afectado por la disponibilidad de oxígeno.

Dentro de los cambios genéticos y fisiológicos que se presentan en hipoxia se destaca la expresión de HIF-1 α el cual en estas condiciones regula la expresión de proteínas que regulan involucradas en el metabolismo glucolítico como la lactato

deshidrogenasa (LDH), la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK), los transportadores de glucosa (GLUT) entre otras (Al Tameemi et al., 2019).

En la presente investigación se confirmó que en condiciones de hipoxia las células aumentan el consumo de glucosa y producción de lactato, cambios que están asociados a HIF-1 α , el cual aumenta la actividad de la PDK que fosforila a la PDH inactivándola y disminuyendo la oxidación del piruvato en la mitocondria (Figura 6). El piruvato se conserva para su reducción a lactato por la LDH, lo que resulta en el reciclaje de NAD⁺ y la producción de ATP en el citosol permitiendo que prevalezca la glucólisis, que es necesaria para la oncogénesis. Sin embargo, cuando las células son tratadas con DCA, el consumo de glucosa y producción de lactato disminuyen significativamente, tal como lo demostraron Ma et al (2018), quienes proponen el uso de la combinación de DCA con un quimioterapéutico, sobre células de CPCNP A549, con la finalidad de mejorar la actividad anticancerígena de este último.

La capacidad del DCA para inhibir a la PDK y restituir a la respiración mitocondrial se ha probado in vitro y en modelos animales de riñón, vejiga, cabeza y cuello, mama entre otros tipos de cánceres. Estos estudios han demostrado que las acciones del DCA se centran en las relaciones PDH fosforilada (inactiva):PDH desfosforilada (activa), reducción de la glucólisis, niveles reducidos de lactato citoplasmático y piruvato, y un mayor consumo de oxígeno, todo lo cual es consistente con un mayor uso de piruvato por las mitocondrias (Woolbright et al., 2019).

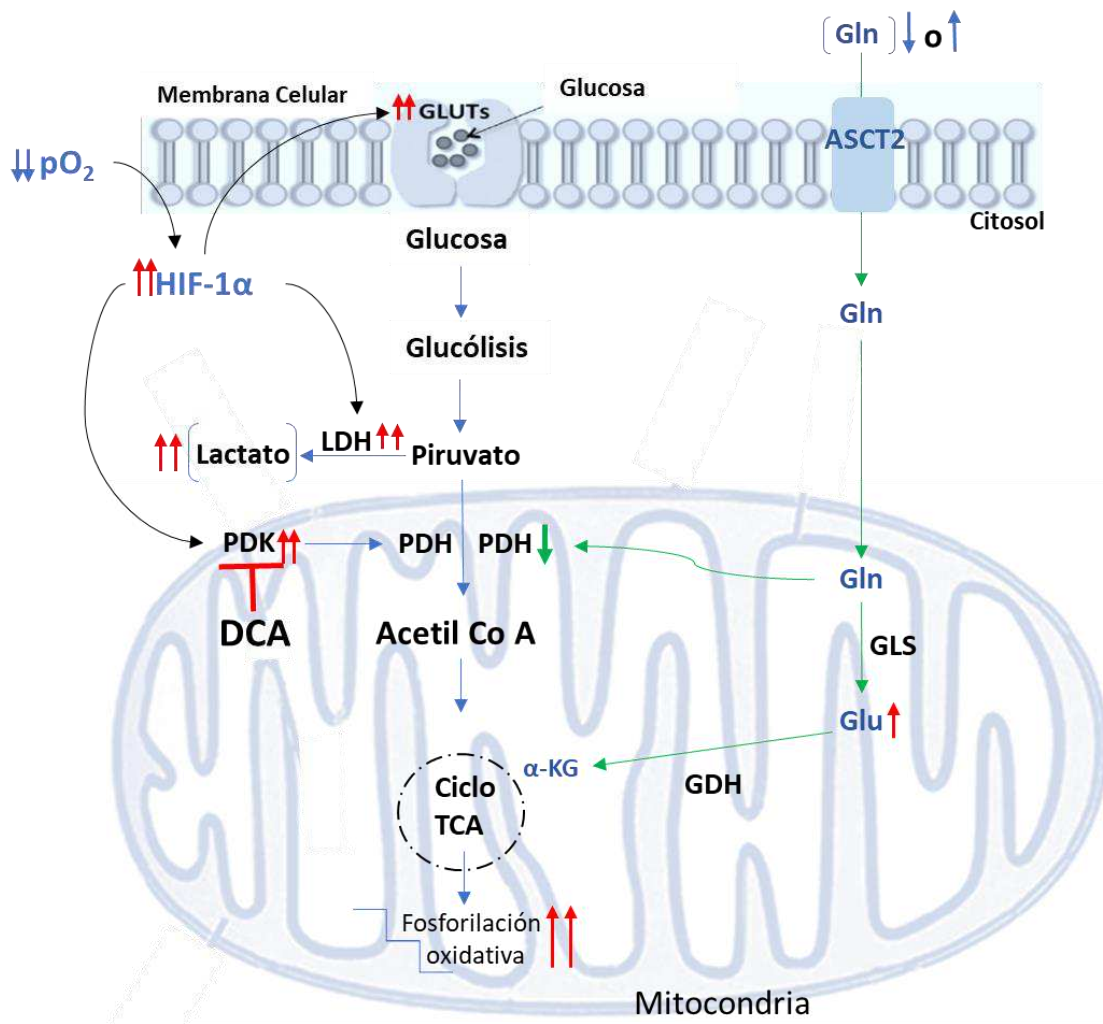


Figura 6. Reprogramación metabólica en células de adenocarcinoma pulmonar A549. Bajo condiciones de hipoxia ($pO_2 < 10$ mmHg) se activa el HIF-1 α , el cual es el responsable de la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo glucolítico de las células, tales como PDK, GLUTs y LDH. Si bien está demostrado que el DCA, inhibe la acción de PDK sobre PDH redirigiendo el metabolismo a una oxidación completa de la glucosa, existen otros elementos en el microambiente celular, como la concentración de glutamina, que al ingresar a la célula afecta el flujo de PDH dando lugar a una disminución de la conversión de piruvato a acetil CoA y favoreciendo la conversión de piruvato a lactato. Esto último hace que el DCA por sí sólo no sea un tratamiento efectivo sobre el fenotipo glucolítico de las células tumorales, y redirige a un estudio más profundo sobre terapias que apunten a la glutaminólisis. GLUTs; Glucotransportadores, HIF-1 α ; Factor Inducible por Hipoxia, pO_2 ; Presión parcial de Oxígeno, LDH; Lactato deshidrogenasa, PDK; Piruvato deshidrogenasa, DCA; Dicloroacetato de sodio, α -KG; alfa-cetoglutarato; Gln; Glutamina, ASCT2; Transportador Alanina, Serina y Cisteína, GLS; Glutaminasa, GDH; Glutamato deshidrogenasa

8.2 Efecto de la concentración de oxígeno en el consumo y metabolismo de la glutamina

Otro evento metabólico asociado al efecto Warburg son los aumentos de la producción, acumulación y liberación de lactato (San-Millán y Brooks, 2016). El lactato derivado de la glucólisis es absorbido por las células circundantes a través del transportador de monocarboxilato 1 (MCT1) (Tataranni y Piccoli, 2019), luego el lactato estabiliza a HIF-2 α , este luego transactiva c-Myc que imita una respuesta a la hipoxia. La activación de c-Myc desencadena la expresión del transportador de glutamina ASCT2 y de la glutaminasa 1 (GLS1), lo que resulta en una mejor absorción y catabolismo de glutamina (Pérez-Escuredo et al, 2016). No obstante, este evento no fue reproducible en nuestras condiciones experimentales ya que no se registraron diferencias en los niveles de glutamina consumidos entre las células en normoxia e hipoxia, esto puede deberse a que más allá de las condiciones de oxígeno, otros elementos del ambiente celular pueden afectar la captación de glutamina. Damiani et al. (2017) diseñaron un sistema predictivo de simulación metabólica computarizado, cuyos resultados después fueron comprobados en modelos *in vitro* e *in vivo*, dichos resultados destacan que a una concentración de glucosa disponible (suficiente para saturar el medio celular), niveles variables de oxígeno y una concentración constante de glutamina, esta última disminuye el flujo de piruvato deshidrogenasa y aumenta la fracción de glucosa fermentada a lactato lo que hace que la glucólisis aeróbica sea óptima para el crecimiento sin la necesidad de aumentar el consumo de glutamina como fuente de carbono alterna.

Por lo anterior, podemos decir que el metabolismo de la glutamina está vinculado con la glucólisis aerobia pero no son procesos dependientes, lo que sugiere que las células podrían evadir las terapias dirigidas sólo a la glucólisis, y a pesar de la ausencia de diferencias entre normoxia e hipoxia, explicaría por qué tampoco se presentan diferencias significativas en el consumo de glutamina al tratar las células con DCA y la combinación de tratamientos.

Algo que cabe destacar es que en ambas condiciones de oxígeno el 2ME disminuye significativamente el consumo de glutamina respecto a las células sin tratamiento y las tratadas con la combinación de DCA y 2ME. Gorska-Ponikowska et al. (2017)

evaluaron al 2ME a 10 μm como inhibidor de la acción de la serina y glicina como agentes estimulantes de la proliferación celular en el osteosarcoma, si bien, los elementos del modelo experimental son diferentes, da un indicio a evaluar los efectos del 2ME sobre la reprogramación del metabolismo asociado a los aminoácidos y sus consecuencias en la proliferación de células cancerosas.

Por otro lado, a pesar de que el aumento en el consumo de glutamina en hipoxia respecto a normoxia, no fue demostrado en el experimento como se esperaba, si se obtuvo un aumento en la producción de glutamato por parte de las células sin tratamiento en hipoxia contra el grupo control en normoxia y este aumento concuerda con los resultados obtenidos por Jiang et al. (2017), que observaron que bajo condiciones de hipoxia las células de cáncer de pulmón A549, aumentan la absorción de glutamina y su utilización sigue un ciclo de TCA ramificado dado que no se oxida completamente y esto determina el flujo de glutamato a α -cetoglutarato (α -KG) y de α -KG en dos sentidos: hacia malato o hacia citrato, y luego a acetil-CoA para volver a iniciar el ciclo TCA o la biosíntesis de ácidos grasos.

8.3 Efecto de la combinación de DCA con 2ME en la viabilidad celular

Como se esperaba, en el ensayo de viabilidad de las células A549, las células sin ningún estímulo farmacológico y bajo condiciones de hipoxia, donde la concentración de lactato es superior que en condiciones de normoxia, la proliferación celular estuviera aumentada, sin embargo, este mismo comportamiento se observó en células estimuladas a bajas concentraciones de DCA esto se puede asociar a que no hay una disminución en la producción de lactato y se ha demostrado que las células de adenocarcinoma de pulmón inducen biogénesis mitocondrial para apoyar la supervivencia y proliferación en la acidosis láctica. Ahora bien, en normoxia se observa el mismo aumento en la proliferación celular a bajas concentraciones de DCA, lo que concuerda con el estudio realizado por Romero-García et al. (2019), que demuestran que la concentración de glucosa en el medio también determina la tasa de supervivencia y proliferación, así una concentración apreciable de glucosa promueve una proliferación sostenible significativamente más larga.

En un estudio anterior, cuando las células A549 fueron expuestas a 10 μ M de 2ME bajo condiciones de hipoxia, no hubo una respuesta significativa en la inhibición del crecimiento celular, en comparación de las células que fueron expuestas a 2ME 10 μ M bajo condiciones de normoxia (Aquino-Gálvez et al., 2016) lo que significa, una resistencia a los efectos farmacológicos del 2ME. Existen estudios que sustentan la quimioresistencia de las células A549 a algunos quimioterapéuticos, por lo que se busca disminuir las condiciones que generan dicha resistencia. Por ejemplo, un estudio realizado por Xuan et al. (2014) demostró que el aumento en la resistencia de células de cáncer gástrico al 5-fluorouracilo (5-FU) causada por un aumento en la producción de PDK bajo condiciones de hipoxia volvió a la línea base después de la adición de DCA, bajo este argumento se esperaba que las células respondieran con efectividad a la acción antiproliferativa del 2ME. Como se esperaba, cuando las células se estimularon con 2ME 10 μ M en combinación con DCA 40mM en condiciones de normoxia se observa que la viabilidad de las células disminuye. Por otro lado, los datos bioquímicos, en los que el 2ME aumenta la producción de lactato de manera significativa tanto en normoxia como en hipoxia, en comparación con el grupo control y el resto de los grupos tratados, indican que se podría estar llevando a cabo mecanismo de muerte celular inducido por la acción del 2ME, ya que el uso de DCA en hipoxia deja fuera la posibilidad de muerte por disminución del pH del medio.

9. Conclusión

El DCA disminuye el consumo de glucosa y la producción de lactato en normoxia e hipoxia, sin embargo, no se generó evidencia de que el DCA tiene un efecto sobre el metabolismo de la glutamina, no obstante el 2ME en hipoxia, disminuye el consumo de esta y la producción de glutamato y aumenta la producción de lactato.

Por otro lado, la combinación del DCA 40mM con 2ME 10 μ M disminuyó el % de células viables tanto en normoxia como en hipoxia. Con relación a lo expuesto, se puede concluir que la combinación de los fármacos propuestos parece tener un efecto antiproliferativo sobre las células A549 incluso en condiciones de hipoxia.

10. Perspectivas de estudio

Anteriormente se ha hablado de la hipoxia y su efecto sobre el metabolismo de los aminoácidos (glutaminólisis), por lo cual y según los resultados obtenidos en esta investigación queda abierta la posibilidad de indagar a fondo sobre el efecto del 2ME en el metabolismo de los aminoácidos debido al efecto que tiene sobre el consumo de glutamina y la producción de lactato y glutamato, en condiciones de hipoxia. Así mismo, aunque se demostró que la combinación de los fármacos propuestos tiene un efecto antiproliferativo se requiere de pruebas más específicas para determinar si el efecto antes mencionado se debe a la acción del 2ME y comprobar su citotoxicidad.

Bibliografía

- Ahn, C. S., y Metallo, C. M. (2015). Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer & Metabolism*, 3(1).
- Al Tameemi, W., Dale, T. P., Al-Jumaily, R. M. K., y Forsyth, N. R. (2019). Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(4), 1-15.
- Aquino-Gálvez, A., González-Ávila, G., Delgado-Tello, J., Castillejos-López, M., Mendoza-Milla, C., Zúñiga, J., Checa, M., Maldonado-Martínez, H. A., Trinidad-López, A., Cisneros, J., Torres-Espíndola, L. M. A., Hernández-Jiménez, C., Sommer, B., Cabello-Gutiérrez, C., y Gutiérrez-González, L. H. (2015). Effects of 2-methoxyestradiol on apoptosis and HIF-1 α and HIF-2 α expression in lung cancer cells under normoxia and hypoxia. *Oncology Reports*, 35(1), 577-583.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., y Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Damiani, C., Colombo, R., Gaglio, D., Mastroianni, F., Pescini, D., Westerhoff, H. V., Mauri, G., Vanoni, M., y Alberghina, L. (2017). A metabolic core model elucidates how enhanced utilization of glucose and glutamine, with enhanced

glutamine-dependent lactate production, promotes cancer cell growth: The WarburQ effect. *PLoS Computational Biology*, 13(9), 1-29.

Doktorova, H., Hrabeta, J., Khalil, M. A., y Eckschlager, T. (2015). Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1 α . *Biomedical Papers*, 159(2), 166-177.

Lu, L., E, L., Li, L., Yang, H., Schwartz, L. H., y Zhao, B. (2019). Radiomics for Classification of Lung Cancer Histological Subtypes Based on Nonenhanced Computed Tomography. *Academic Radiology*, 26(9), 1245-1252.

Eguino Villegas, A., Fernández Sánchez, B., García Álvarez, G., y García Sáenz, J. Á. (2005). Cáncer de pulmón. Una guía práctica. (1.a ed.) [Libro electrónico]. Asociación Española Contra el Cáncer. <https://www.aecc.es/sites/default/files/migration/actualidad/publicaciones/documentos/guia-ca-pulmon.pdf>

Estévez-García, I. O., Cordoba-Gonzalez, V., Lara-Padilla, E., Fuentes-Toledo, A., Falfán-Valencia, R., Campos-Rodríguez, R., y Abarca-Rojano, E. (2014). Glucose and glutamine metabolism control by APC and SCF during the G1-to-S phase transition of the cell cycle. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 70(2), 569-581.

Fraga, A., Ribeiro, R., y Medeiros, R. (2009). Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urológicas Españolas*, 33(9), 941-951.

Gorska-Ponikowska, M., Perricone, U., Kuban-Jankowska, A., Lo Bosco, G., y Barone, G. (2017). 2-methoxyestradiol impacts on amino acids-mediated metabolic reprogramming in osteosarcoma cells by its interaction with NMDA receptor. *Journal of Cellular Physiology*, 232(11), 3030-3049.

Graboń, W., Otto-Ślusarczyk, D., Chrzanowska, A., Mielczarek-Putna, M., Joniec-Maciejak, I., Słabik, K., y Barańczyk-Kuźma, A. (2016). Lactate Formation in Primary and Metastatic Colon Cancer Cells at Hypoxia and Normoxia. *Cell Biochemistry and Function*, 34(7), 483-490.

Guo, F., Zhao, S., y Li, X. (2019). Discovery of novel pyruvate dehydrogenase kinases inhibitors by screening of an in-house small molecule library for anti-lung cancer therapeutics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(2), 291-296.

- Hassan, L.-A., Hassan, O. U., Yang, Y.-W., y Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et biophysica acta*, 1856(2), 189-210.
- Jiang, Z.-F., Wang, M., Xu, J.-L., y Ning, Y.-J. (2017). Hypoxia promotes mitochondrial glutamine metabolism through HIF1 α -GDH pathway in human lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), 32-38.
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., y Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177-185.
- Kim, Y.-N., Koo, K. H., Sung, J. Y., Yun, U.-J., y Kim, H. (2012). Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *International Journal of Cell Biology*, 2012.
- Kutkowska, J., Porębska, I., y Rapak, A. (2017). Non-small cell lung cancer – mutations, targeted and combination therapy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71(1), 431-445.
- Li, C., Zhang, G., Zhao, L., Ma, Z., y Chen, H. (2015). Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1),
- Liu, T., y Yin, H. (2016). PDK1 promotes tumor cell proliferation and migration by enhancing the Warburg effect in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 37(1), 193-200.
- Longo, D. L., Kasper, D. L., Larry, J., Fauci, A. S., Hauser, S. L., y Loscalzo, J. (2019). Harrison: Principios de medicina interna. Vol. 1, 2 (20.a ed.). McGraw-Hill.
- Lu, J. (2019). The Warburg metabolism fuels tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(1-2), 157-164.
- Ma, W., Zhao, X., Wang, K., Liu, J., y Huang, G. (2018). Dichloroacetic acid (DCA) synergizes with the SIRT2 inhibitor Sirtinol and AGK2 to enhance anti-tumor efficacy in non-small cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 19(9), 835-846.
- Mabjeesh, N. J., Escuin, D., LaVallee, T. M., Pribluda, V. S., Swartz, G. M., Johnson, M. S., Willard, M. T., Zhong, H., Simons, J. W., y Giannakakou, P. (2003).

2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*, 3(4), 363-375. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00077-1](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00077-1)

Masoud, G. N., y Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378-389.

McMurry, T. L., Shah, P. M., Samson, P., Robinson, C. G., y Kozower, B. D. (2017). Treatment of stage I non-small cell lung cancer: What's trending?. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 154(3), 1080–1087.

Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., y Torres-Domínguez, J. A. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 740-748.

Nguyen, T. L., y Durán, R. V. (2016). Prolyl hydroxylase domain enzymes and their role in cell signaling and cancer metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 80, 71-80.

OncoSur. (2007). Cáncer de pulmón. Diagnóstico y Tratamiento. Fundación Médica Mutua Madrileña. http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupocooperativo/2006/oncosur/guia_clinica_oncosur_cancerpulmon.pdf

Parks, M., Tillhon, M., Donà, F., Prosperi, E., y Scovassi, A. I. (2011). 2-Methoxyestradiol: New perspectives in colon carcinoma treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 331(1), 119-128.

Pérez-Escuredo, J., Dadhich, R. K., Dhup, S., Cacace, A., Van Hée, V. F., De Saedeleer, C. J., Sboarina, M., Rodriguez, F., Fontenille, M.-J., Brisson, L., Porporato, P. E., y Sonveaux, P. (2016). Lactate promotes glutamine uptake and metabolism in oxidative cancer cells. *Cell Cycle*, 15(1), 72-83.

Rebellón Sánchez, David Esteban, Parra Morales, Tania Julieth, Moreno Alba, Juan Sebastián, Castro Guerrero, Juan Sebastián, y Bernal Gómez, Bibiana Matilde. (2014). Alteraciones moleculares implicadas en la fisiopatogenia del cáncer y su utilidad para la investigación en medicina. *Revista Científica Ciencia Médica*, 17(2), 44-52.

Romero-García, S., Prado-García, H., Valencia-Camargo, A. D., y Alvarez-Pulido, A. (2019). Lactic Acidosis Promotes Mitochondrial Biogenesis in Lung

Adenocarcinoma Cells, Supporting Proliferation Under Normoxia or Survival Under Hypoxia. *Frontiers in Oncology*, 9, 1-13.

San-Millán, I., y Brooks, G. A. (2016). Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*, 119-133.

Schneider, B. J., y Kalemkerian, G. P. (2016). Personalized Therapy of Small Cell Lung Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 890, 149–174.

Schoonjans, C. A., Joudiou, N., Brusa, D., Corbet, C., Feron, O., y Gallez, B. (2020). Acidosis-induced metabolic reprogramming in tumor cells enhances the anti-proliferative activity of the PDK inhibitor dichloroacetate. *Cancer Letters*, 470, 18-28.

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(4), 207-214.

Semenza, G. L. (2016). The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(3), 382-391.

Span, P. N., y Bussink, J. (2015). Biology of hypoxia. *Seminars in nuclear medicine*, 45(2), 101–109.

Sun, J. C., He, F., Yi, W., Wan, M. H., Li, R., Wei, X., Wu, R., y Niu, D. L. (2015). High expression of HIF-2 α and its anti-radiotherapy effect in lung cancer stem cells. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 18110-18120.

Tan Allen, K., Chin-Sinex, H., DeLuca, T., Pomerening, J. R., Sherer, J., Watkins, J. B., Foley, J., Jesseph, J. M., y Mendonca, M. S. (2015). Dichloroacetate alters Warburg metabolism, inhibits cell growth, and increases the X-ray sensitivity of human A549 and H1299 NSC lung cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 263-273.

Tataranni, T., y Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-14.

Vanhove, K., Derveaux, E., Graulus, G.-J., Mesotten, L., Thomeer, M., Noben, J.-P., Guedens, W., y Adriaensens, P. (2019). Glutamine Addiction and

Therapeutic Strategies in Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 252.

Viallard, C., y Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409-426.

Wigerup, C., Pählman, S., y Bexell, D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 164, 152-169.

Woolbright, B. L., Rajendran, G., Harris, R. A., y Taylor, J. A. (2019). Metabolic Flexibility in Cancer: Targeting the Pyruvate Dehydrogenase Kinase:Pyruvate Dehydrogenase Axis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 18(10), 1673-1681.

World Health Organization. (2019). *GLOBOCAN Mexico*. Global Cancer Observatory. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>

Xuan, Y., Hur, H., Ham, I.-H., Yun, J., Lee, J.-Y., Shim, W., Kim, Y. B., Lee, G., Han, S.-U., y Cho, Y. K. (2014). Dichloroacetate attenuates hypoxia-induced resistance to 5-fluorouracil in gastric cancer through the regulation of glucose metabolism. *Experimental Cell Research*, 321(2), 219-230.

Zhu, G., Tang, Y., Li, L., Zheng, M., Jiang, J., Li, X., Chen, S., y Liang, X. (2010). Hypoxia Inducible Factor 1 and Hypoxia Inducible Factor 2 Play Distinct and Functionally Overlapping Roles in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 16(19), 4732-4741.