



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Unidad Xochimilco**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**Informe de actividades del servicio social:**

**EVALUACIÓN DE FLUJO GLUCOLÍTICO EN CÉLULAS DE  
CÁNCER PULMONAR H292 CULTIVADAS CON ALTA GLUCOSA  
+/- LA QUIMIOTERAPIA FRACTALCINA Y SU POSIBLE EFECTO EN  
LA RESISTENCIA A LA MUERTE POR APOPTOSIS**

**Alumna: Verónica Beltrán Hernández  
Matricula: 2152026761**

**Asesor Externo: Dra. Selma Celina Rivas Fuentes**

**Asesor Interno: M. en C. Felipe Mendoza Pérez**

**Lugar de Realización: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de  
Enfermedades Respiratorias (INER)**

**Fecha de inicio: 11 de octubre de 2018  
Fecha de terminación: 11 de abril de 2019**

**Fecha de Entrega: 27 de septiembre 2019**

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>Cáncer pulmonar</b> .....	1
<b>Carcinogénesis</b> .....	2
<b>Alteraciones metabólicas de las células tumorales: Glicólisis aerobia</b> .....	3
<b>Quimiocinas</b> .....	4
<b>Fractalcina</b> .....	5
<b>OBJETIVOS</b> .....	5
<b>Objetivo General</b> .....	5
<b>Objetivos Específicos</b> .....	5
<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	6
<b>Línea celular empleada</b> .....	6
<b>Cultivo celular</b> .....	6
<b>Siembra de células H292 en placa de 12 pozos</b> .....	6
<b>Estimulación de células H292 con quimiocina Fractalcina</b> .....	7
<b>Diluciones</b> .....	7
<b>Condiciones de estimulación</b> .....	7
<b>Recuperación de medios condicionados</b> .....	8
<b>Ensayo de piruvato</b> .....	8
<b>Filtración</b> .....	9
<b>Determinación de piruvato</b> .....	9
<b>Curva Estándar</b> .....	9
<b>Ensayo de Reacción</b> .....	9
<b>Protocolo de placa</b> .....	10
<b>RESULTADOS</b> .....	10
<b>DISCUSIÓN</b> .....	13
<b>CONCLUSIONES</b> .....	14
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	15

# INTRODUCCIÓN

## Cáncer pulmonar

El cáncer es una de las enfermedades con más incidencia en todo el mundo. La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) ha estimado que en el año 2002 hubieron 10.9 millones de casos nuevos de cáncer y más de 6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (Parkin, 2005)

La Organización Mundial de la Salud (OMS), identificó cinco tipos de cáncer que son los responsables del mayor número de fallecimientos. Siendo el principal el cáncer pulmonar con 1.69 millones de muertes, seguido del cáncer hepático con 788, 000 defunciones, el cáncer colorrectal con 774, 000 muertes, el cáncer gástrico con 754, 000 defunciones y por último el cáncer de mama con 571,000 muertes.

En México, el cáncer pulmonar es la cuarta causa de muerte lo anterior se debe a que el 98% de los casos se diagnostica en una etapa avanzada (CANIFARMA, 2016). Datos arrojados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018), menciona que los tumores malignos de los órganos respiratorios e intratorácicos son responsables de cinco fallecimientos por cada 100, 000 varones en el rango de edad de 30 a 59 años, durante el periodo de 2011 a 2016, representando de esta forma, la segunda causa de muerte por cáncer para esta población específica.

El cáncer de pulmón se divide en dos subtipos histológicos según la morfología de las células: el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). De los dos, el CPCNP representa el 85% de la incidencia de cáncer de pulmón, y el CPCP representa el 15% adicional (Saintigny y Burger, 2012).

El CPCNP consiste en diversas variantes: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes, entre otros. El CPCP comprende entre otros el carcinoma de pulmón neuroendocrino el cual es muy agresivo, tratado principalmente con quimioterapia y ocasionalmente, radioterapia (Saintigny y Burger, 2012).

## **Carcinogénesis**

La célula neoplásica exhibe una serie de mutaciones acumuladas, las cuales son responsables de alteraciones en respuestas celulares como la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis, dando como resultado un aumento de la masa tumoral (Nicolson, G. L., 1993). Adicionalmente, estas alteraciones genéticas también promueven cambios en los patrones de expresión de la célula neoplásica como la angiogénesis, que favorece el proceso de invasión y metástasis (Colville-Nash & Willoughby, 1997). Además, las células cancerosas presentan alteraciones metabólicas que les permiten tener una rápida proliferación (Shaw, *et al*, 2006). Por ejemplo, las células tumorales presentan un incremento en varias enzimas de la vía glucolítica, y en varios transportadores de glucosa. De forma preferencial, la glucosa captada por la célula tumoral es utilizada en la vía de la glucólisis, aún en condiciones aeróbicas; mientras que la fosforilación oxidativa se encuentra disminuida.

La creación de nuevos vasos sanguíneos puede producirse a través de dos mecanismos: la vasculogénesis y la angiogénesis. La primera implica el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de células progenitoras endodérmicas poco diferenciadas, que según el estímulo aplicado, se diferencian hacia progenitores hematopoyéticos o hacia el endodermo. La angiogénesis se define como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. La angiogénesis es un proceso complejo que involucra células endoteliales, factores paracrinos, receptores, quinasas transductoras de señales y matriz extracelular, que, durante la hipoxia o la inflamación, secretan factores angiogénicos, factores de crecimiento y citoquinas, que favorecen la formación de nuevos vasos (Khosravi *et al.*, 2008).

Existen varias moléculas que están involucradas en la regulación de la angiogénesis, ya sea promoviéndola o inhibiéndola. Dentro de los reguladores involucrados están las efrinas (Eph), endotelina (ET-1), óxido nítrico sintasa (NOS), integrinas, VE-caderinas activadores de plasminógenos y la familia de quimiocinas (Damata C. X. *et al*, 2012).

Por otro lado, dado que, en la fase temprana de la carcinogénesis el crecimiento tumoral se produce inicialmente en ausencia de formación de nuevos vasos sanguíneos, la proliferación celular no controlada aleja las células tumorales de los vasos sanguíneos y, por lo tanto, del

suministro de oxígeno y nutrientes necesarios. La privación de glucosa puede activar oncogenes y estos pueden regular las proteínas implicadas en la glucólisis aerobia. A su vez, las proteínas implicadas en el aumento de la glucólisis pueden hacer que las células tumorales sean más resistentes a la apoptosis (Annibaldi A. & Widmann C., 2010).

### **Alteraciones metabólicas de las células tumorales: Glicólisis aerobia**

Muchas células, desde microbios hasta linfocitos, han utilizado la glucólisis aeróbica durante la proliferación, por lo que se piensa que puede desempeñar un papel fundamental en el apoyo al crecimiento celular. Otto Warburg (1924) observó que las células cancerosas consumen cantidades mucho mayores de glucosa que sus homólogos normales y la metabolizan predominantemente a través de la glucólisis, produciendo altos niveles de lactato incluso en condiciones altas en oxígeno. Este fenómeno de la glucólisis aeróbica (es decir, la conversión de glucosa en lactato incluso en presencia de suficiente oxígeno) no es exclusivo de las células cancerosas.

En estas células que se dividen rápidamente, la mayor parte de la glucosa se convierte en lactato; muy poca cantidad se oxida a dióxido de carbono. Esta observación llevó a Warburg a sugerir que las células cancerosas surgen de un defecto en la respiración mitocondrial que las hace depender de una glucólisis mejorada (Fantin *et al.* 2006, Moreno-Sánchez *et al.* 2007, Zu y Guppy 2004). La glucólisis aeróbica se ha observado en una amplia variedad de tumores que se originan a partir de diferentes tipos de células, pero la mayoría de las células normales en tejidos adultos de los que surgen las células cancerosas generalmente no utilizan la glucólisis aeróbica. Por lo tanto, las células cancerosas vuelven a un fenotipo metabólico que es característico de las células que se dividen rápidamente, lo que sugiere que la glucólisis aeróbica debe proporcionar ventajas durante la proliferación (Vander Heiden *et al.* 2009).

Cabe mencionar que en condiciones elevadas de glucosa también se aumenta la proliferación de células cancerígenas ya que estas presentan un metabolismo alterado y tienden a captar más eficientemente la glucosa por lo cual, generalmente se aumenta la glucólisis (Duarte M. J., 2016).

## Quimiocinas

Las quimiocinas son citocinas que dirigen la migración celular específica. Se unen a proteoglicanos y forman gradientes quimiotácticos en un proceso conocido como quimiotaxis (Zlotnik, 2006).

En función de la posición relativa de sus residuos de cisteína ubicados en la región N-terminal, las quimiocinas se pueden dividir en cuatro subfamilias, CXC, CC, C y CX3C (Mantovani A., 1999). Los grupos CC y CXC son grandes y las quimiocinas, así como los receptores asociados, muestran una mezcla de uniones. Por lo tanto, una sola quimiocina puede unirse a múltiples receptores, así como un único receptor que puede unirse a múltiples quimiocinas (Zlotnik y Yoshie, 2012)

Las quimiocinas se pueden definir por sus características funcionales en dos categorías: homeostáticas e inflamatorias. Las quimiocinas inflamatorias son inducibles y se expresan en condiciones de inflamación. Estas son las quimiocinas responsables del reclutamiento de leucocitos efectores para la infección, inflamación, lesión tisular y tumores. (Moser *et al.*, 2004). Las quimiocinas homeostáticas se expresan de forma constitutiva y dirigen la migración por los leucocitos durante la hematopoyesis en la médula ósea y el timo, durante el inicio de respuestas inmunitarias adaptativas en el bazo, los ganglios linfáticos (LN) y la vigilancia inmunitaria de tejidos periféricos sanos (Moser *et al.* , 2004).

Las quimiocinas tienen funciones importantes en cáncer, por ejemplo, en la regulación de la metástasis puesto que la diseminación del tumor puede facilitarse debido a sus receptores ya que estos participan en las etapas fundamentales de la metástasis como la adherencia de las células tumorales al endotelio, la extravasación de los vasos sanguíneos, la colonización metastásica, la angiogénesis, la proliferación celular y la protección de la respuesta del huésped mediante la activación de vías de supervivencia clave (Freyre-Bernal *et al*, 2018).

Valle (2014) expone que en condiciones elevadas de glucosa se aumenta la proliferación de células cancerígenas, ya que estas presentan un metabolismo energético alterado para cubrir su alta demanda biogénica manteniendo así un crecimiento rápido y descontrolado.

## **Fractalcina**

Fractalcina, también conocida como CX<sub>3</sub>CL1, se clasifica como una quimiocina de doble función (Zlotnik y Yoshie, 2012). Ésta se diferencia de todas las otras quimiocinas porque se expresa como una proteína transmembranal. La forma CX<sub>3</sub>CL1 anclada a la membrana funciona como una molécula de adhesión que promueve la retención de leucocitos a las células endoteliales en condiciones de flujo fisiológico (Fong *et al*, 1998).

La fractalcina se encuentra comúnmente en todo el cerebro, particularmente en las células neuronales, se sabe que su receptor está presente en las células microgliales y se ha descubierto que es esencial para la migración de estas células (Mayoral C., 2004). Además, esta quimiocina también participa en el reclutamiento de leucocitos asociado con numerosos trastornos inflamatorios y en el proceso de tumorigénesis en el que muestra propiedades pro y antitumorales. Los diferentes roles de CX<sub>3</sub>CL1 lo convierten en un candidato atractivo para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar el flujo glucolítico de células de cáncer pulmonar (H292) con alta glucosa +/- la quimiocina fractalcina; y su posible efecto en la resistencia a la muerte por apoptosis.

### **Objetivos Específicos**

- Aprender la técnica de cultivo celular en células adherentes.
- Evaluación de la estimulación en cuatro diferentes condiciones de glucosa-quimiocina.
- Recuperación de los medios condicionados obtenidos de la estimulación.
- Determinación de piruvato y lactato en medios de cultivo condicionados: alta glucosa +/- la quimiocina Fractalcina.

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **Línea celular empleada**

La línea celular H292 se derivó de una metástasis a los ganglios linfáticos de un carcinoma mucoepidermoide pulmonar. Las células se aislaron en un medio químicamente definido (HITES) y luego se adaptaron al crecimiento en medios complementados con suero (Guides, P.).

### **Cultivo celular**

Para el mantenimiento de los cultivos de células H292, se usó el medio de cultivo *Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium* (DMEM) con rojo fenol No. de catálogo 31600034, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) No. de catálogo 26140-079, Glutamina 4 mM (Concentración del stock 200 mM), antibiótico antimicótico 100X No. De catálogo 15240-062 y HEPES (buffer); además de ocupar *Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium* (DMEM) sin rojo fenol suplementado No. De catálogo 11054020 con 6 mM de glucosa, para la recuperación de medios condicionados.

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar VECO, modelo GVFL-B12. Las células se cultivaron en sus correspondientes medios a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> Panasonic, modelo KM-CC17RU1, con una atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>.

### **Siembra de células H292 en placa de 12 pozos**

Las células adherentes se despegaron con una solución de tripsina-EDTA (0.025% EDTA). Para ello, las células se dejaron crecer hasta un 80%-90% de confluencia, se eliminó el medio de cultivo DMEM con rojo fenol y se lavaron con PBS 1X para eliminar los restos del suero del medio que pueden inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se añadió una solución de tripsina-EDTA en un volumen suficiente como para cubrir la superficie de la placa y se incubaron durante 5 minutos en la incubadora. Tras la incubación, se adicionó un volumen 1:1 de solución inactivadora de tripsina (con suero fetal bovino 8%) para inhibir la acción de ésta. La suspensión de células obtenida se centrifugó durante 5 minutos a 150 g (900 RPM). Posteriormente, el botón celular se resuspendió con medio de cultivo DMEM sin suplemento con rojo fenol y se volvió a centrifugar por 5 minutos a 150 g (900 RPM). Finalmente, el



botón celular se resuspendió y se le agregó medio de cultivo DMEM suplementado sin rojo fenol.

Se prosiguió a realizar el conteo celular en la cámara Neubauer con la suspensión celular en un volumen 1:1 con azul de tripano. Las células muertas se observaban con un color azul oscuro. El cálculo del número de células totales por ml de suspensión se realizó de la siguiente manera: (# cel. totales) (factor de dilución) (10,000 unidades) (mL totales de suspensión celular).

Para la siembra en placa de 12 pozos, se sembraron 150,000 células en cada pozo añadiendo medio de cultivo DMEM suplementado sin rojo fenol he incubándose a 37°C con una atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

### **Estimulación de células H292 con quimiocina Fractalcina**

#### **Diluciones**

Se preparó una solución stock 5.5 mM de glucosa a partir de una solución 1 M y se utilizó un filtro de membrana (0.22 µm) para esterilizar la solución. Asimismo, se realizó un ajuste de medios en los que se obtuvieron tres soluciones de glucosa diferentes: 6 mM, 8.5 mM y 11 mM. Se hicieron tres series de tubos Eppendorf para obtener disoluciones correspondientes a 0 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL y 100 ng/mL de glucosa-quimiocina de las cuales se utilizaron, para cada serie, las soluciones de glucosa anteriormente mencionadas.

#### **Condiciones de estimulación**

Se observó la placa de cultivo en el microscopio para descartar cualquier contaminación. Se absorbió el medio de cultivo y se añadió PBS 1X para su lavado. Se agregó cada disolución de glucosa-quimiocina en orden ascendente de las concentraciones (*Figura 1*). La placa se dejó incubar a 37°C con una atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas exactas.

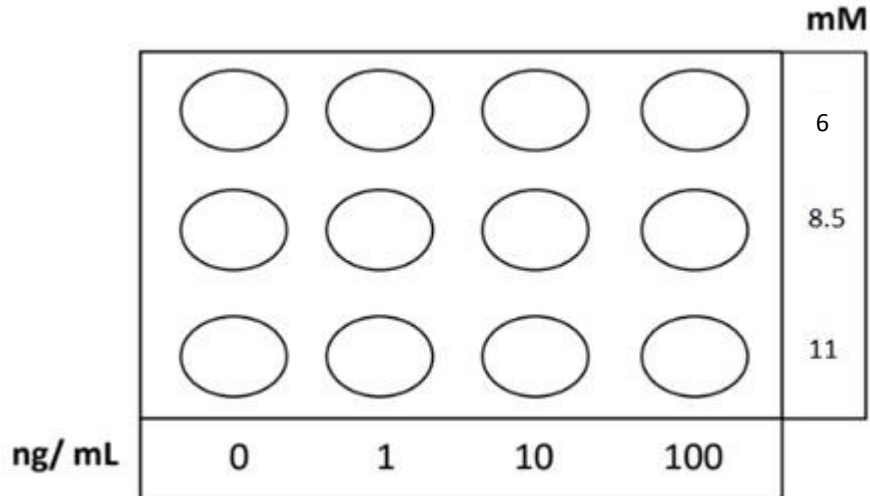


Figura 1. Esquema de disoluciones glucosa-quimiocina

### Recuperación de medios condicionados

Transcurridas las 24 horas, se hizo la recuperación de medios en tubos Eppendorf etiquetados en dos series: etiqueta rápida (mM glucosa, quimiocina, concentración de glucosa-quimiocina y numero de tubo) y etiqueta detallada (fecha de inicio de experimento, medio condicionado (MD), mM de glucosa, quimiocina, concentración de glucosa-quimiocina y numero de tubo). Se tomo cada medio de la placa y se colocaron en los tubos Eppendorf de etiqueta rápida, se centrifugaron a 900 g (3500 RPM) durante 10 minutos y seguidamente se traspasó el medio a los tubos de etiqueta detallada los cuales se llevaron a refrigeración de -70°C.

### Ensayo de piruvato

Para el ensayo de piruvato se utilizó el kit Pyruvate Assays SIGMA-Aldrich, No. de catálogo: MAK071; en el que se ocuparon filtros Amicon® Ultra-0.5, no. de catálogo UFC5010, de 10kDa de corte de peso molecular para desproteinizar las muestras.

El kit de ensayo proporciona un procedimiento simple y directo para medir la actividad de la enzima piruvato cinasa en una variedad de muestras biológicas. La concentración de piruvato se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado, que da como resultado un producto colorimétrico (570 nm)/fluorométrico ( $\lambda_{ex} = 535 / \lambda_{em} = 587$  nm), proporcional al piruvato presente. Una unidad de piruvato cinasa es la cantidad de enzima que transferirá un grupo fosfato de PEP a ADP para generar 1.0  $\mu$ mol de piruvato por minuto a 25° C.

## **Filtración**

Se insertó el dispositivo Amicon Ultra-0.5 en uno de los tubos de la microcentrífuga, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras de medios condicionados recuperados al dispositivo del filtro y se cubrió. El dispositivo se colocó en el rotor de la centrifuga, alineando la correa de la tapa hacia el centro de este. Se centrifugo a 14,000 G a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalizada la centrifugación, se retiró el filtro del tubo donde se utilizó 50  $\mu\text{L}$  para la determinación de piruvato, 50  $\mu\text{L}$  para la determinación de lactato y la muestra sobrante se almaceno a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **Determinación de piruvato**

### **Curva Estándar**

Se diluyo 10 $\mu\text{L}$  de la solución Pyruvate Standar (100 nmoles/mL) con 990  $\mu\text{L}$  de la solución Pyruvate Assays Buffer para la preparación de la solución estándar (1 nmol/mL). Se agregó 0, 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{L}$  de la solución estándar (1 nmol/mL) en la placa de 96 pozos, generando un blanco y concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 nmoles/pozo. Finalmente, se añadió la solución Pyruvate Assay Buffer a cada pozo para obtener un volumen de 50  $\mu\text{L}$ .

### **Ensayo de Reacción**

Primero se preparó el mix de reacción que marca la hoja técnica del kit Pyruvate Assay. Posteriormente se agregó 50  $\mu\text{L}$  de este mix a cada uno de los pozos que contiene la muestra y se mezcló con ayuda de un agitador. La placa se mantuvo en incubación durante 30 minutos protegiéndola de la luz.

## Protocolo de placa

En la *Figura 2* se muestra el protocolo de placa de 96 pozos que se realizó para la prueba de piruvato. Se elaboraron un total de 72 muestras donde se utilizaron 36 filtros para la quimiocina SDF-1 y los filtros restantes fueron utilizados para las muestras piloto de las condiciones 15 mM y 30 mM de Fractalina.

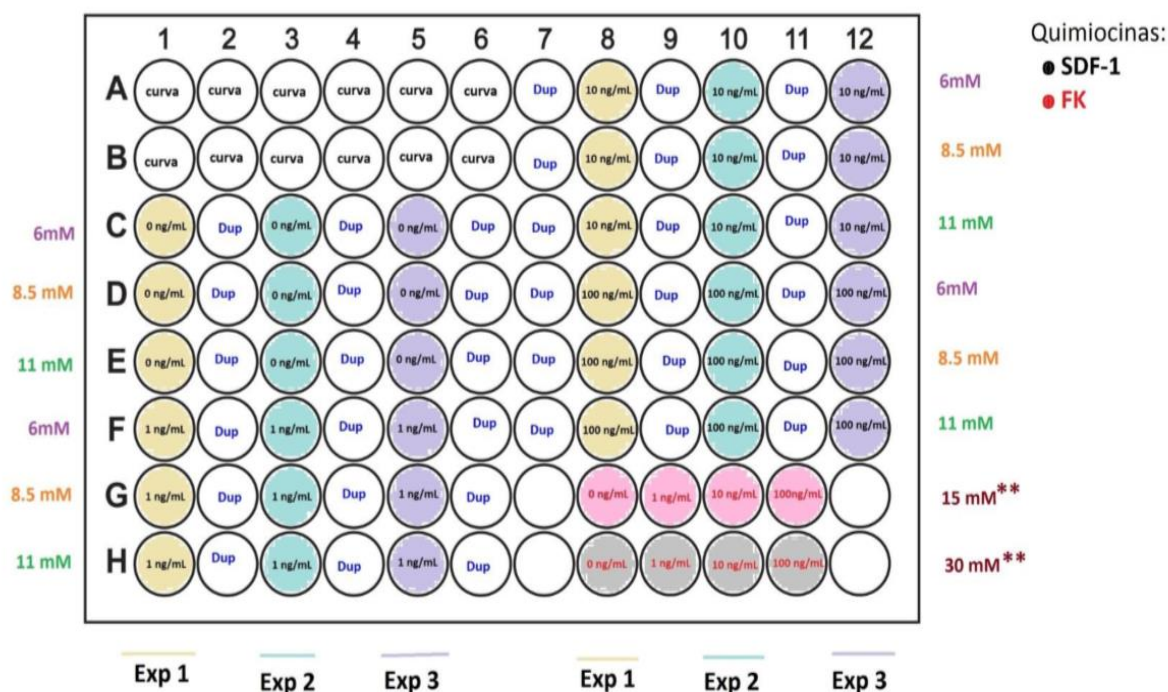


Figura 2. Plan de placa de 96 pozos para prueba de piruvato

## RESULTADOS

Se llevó a cabo la determinación de piruvato en células cultivadas con diferentes concentraciones de glucosa (6 mM, 8.5 mM y 11 mM) y quimiocina (1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL).

### Curva estándar de piruvato

Para evaluar la concentración de piruvato, se realizó una curva estándar mediante un ensayo enzimático acoplado donde los resultados obtenidos arrojaron un coeficiente de correlación de 0.99 (*Gráfico 1*).

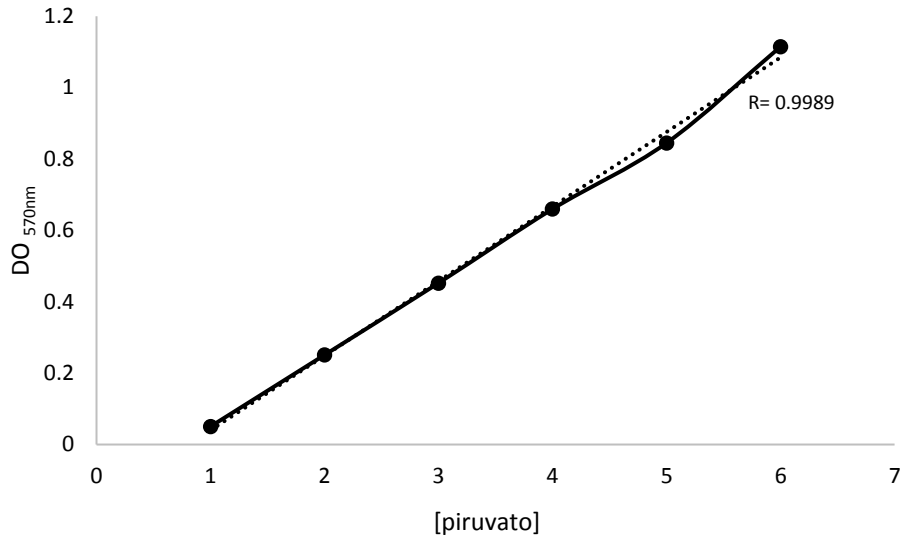


Gráfico 1. Curva estándar de piruvato (densidad óptica vs concentración de piruvato)

Para el cálculo de concentración de piruvato se corrieron las pruebas piloto de las células con la quimiocina Fractalcina las cuales se trabajaron en concentraciones de glucosa 15 mM y 30 mM. Los resultados obtenidos se muestran en el *Gráfico 2*.

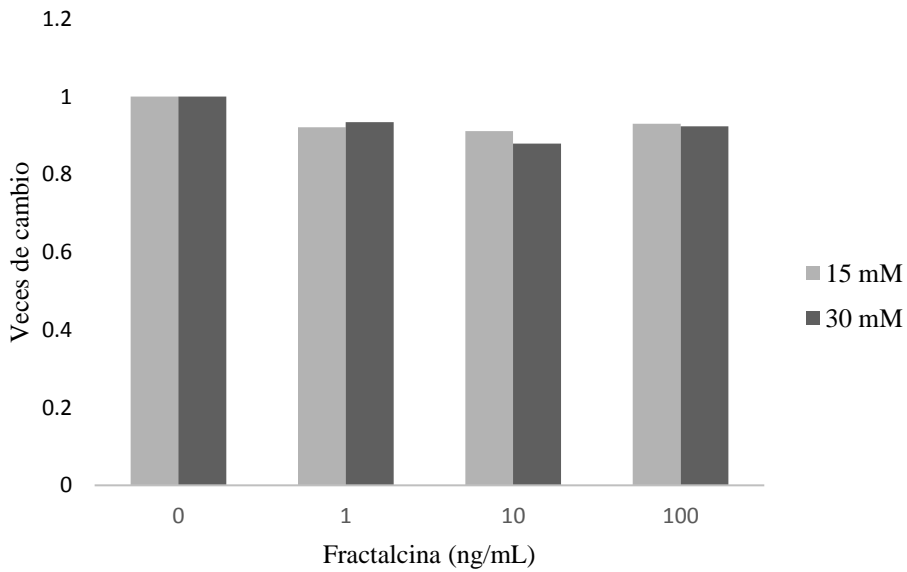


Gráfico 2. Veces de cambio a diferentes concentraciones de quimiocina Fractalcina con diferentes condiciones de glucosa

Como se mencionó antes, el trabajo con la quimiocina Fractalcina no pudo completarse como se planteaba debido a que no se contaba con el material suficiente, sin embargo, se colaboró con un proyecto similar con el uso de la quimiocina SDF-1 donde se trabajaron las mismas condiciones de concentración de quimiocina (1, 10 y 100 ng/mL), siendo la variante las concentraciones de glucosa las cuales se manejaron de 6, 8.5 y 11 mM obteniendo los siguientes resultados.

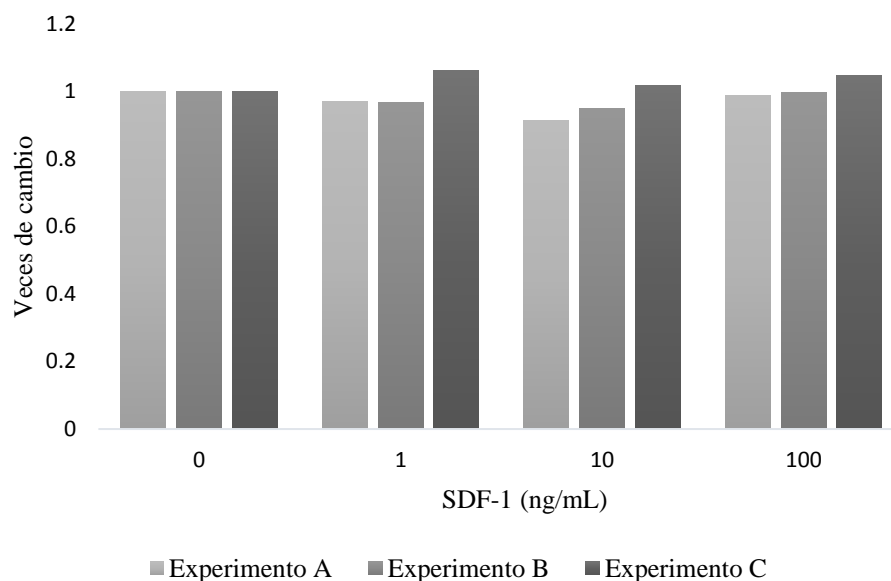


Gráfico 3. Veces de cambio de las diferentes concentraciones de quimiocina SDF-1 con base a la concentración de piruvato en condiciones 6 mM de glucosa.

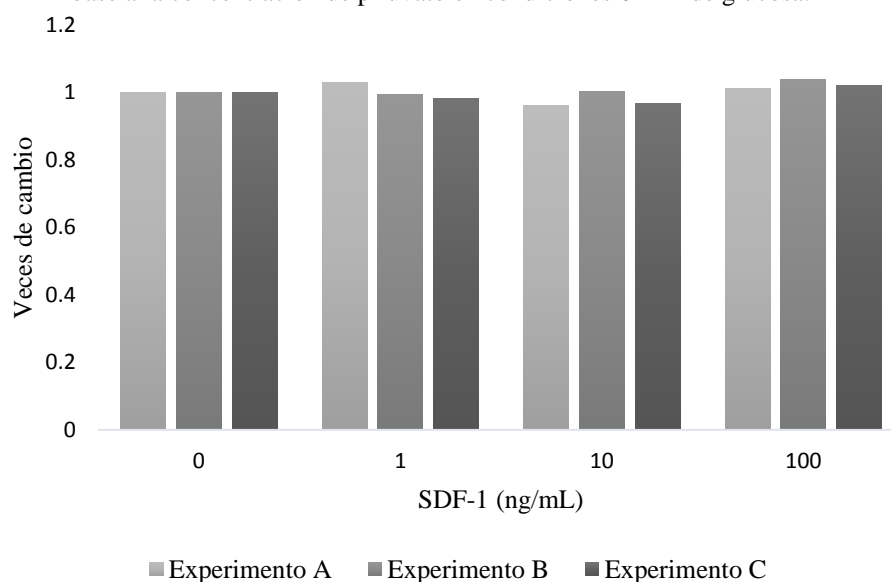


Gráfico 4. Veces de cambio de las diferentes concentraciones de quimiocina SDF-1 con base a la concentración de piruvato en condiciones 8.5 mM de glucosa.

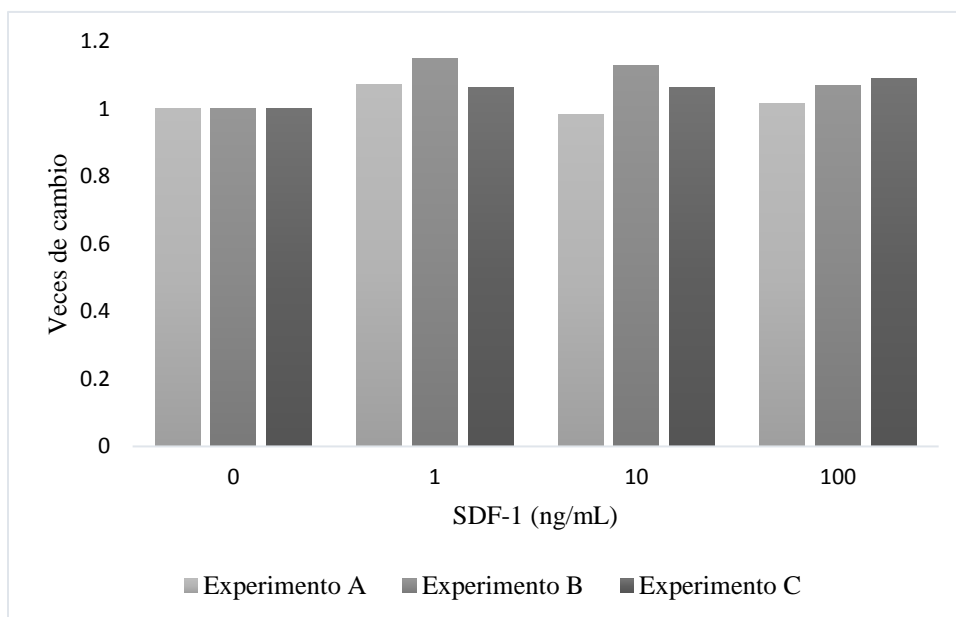


Gráfico5. Veces de cambio de las diferentes concentraciones de quimiocina SDF-1 con base a la concentración de piruvato en condiciones 11 mM de glucosa.

## DISCUSIÓN

Según lo reportado por Regifo (2007), las células cancerígenas poseen la capacidad para metabolizar la glucosa de piruvato a lactato a velocidades mayores que la célula normal además de que en cultivos de alta glucosa su proliferación y sobrevivencia aumenta, sin embargo, al compararlo con los resultados obtenidos se muestra que la concentración de piruvato no aumentó al cultivar las células en alta glucosa. En las *Gráficas 3 y 4* de las condiciones 6 mM y 8.5 mM de glucosa, las concentraciones de quimiocina SDF-1 (1, 10 y 100 ng/mL) no representaron un cambio significativo respecto a las veces de cambio del basal (0 ng/mL) puesto que la concentración de piruvato no aumento en ninguno de los experimentos. Por otro lado, con la condición 11 mM de glucosa (*Grafico 5*) se muestra un aumento de cada concentración de quimiocina SDF-1 respecto al basal en cada uno de los tres experimentos. Monteagudo *et al.* (2011) mencionan que en los últimos años se ha podido demostrar que las quimiocinas y sus receptores (CXCL12, CXCR4 y CCL21-CCR7) han desempeñado un papel esencial en la capacidad de proliferación celular y/o invasión y diseminación de células cancerígenas.

Sabemos que las células normales utilizan el oxígeno para la producción de ATP por fosforilación oxidativa pero cuando esta disponibilidad de oxígeno se ve limitada y el

metabolismo oxidativo disminuye, el piruvato es reducido a lactato volviéndose un punto crítico en el metabolismo de las células cancerígenas (Marín, 2009). De acuerdo con lo anterior, no podríamos determinar el flujo glucolítico de las células H292 cultivadas en alta glucosa con las quimiocinas empleadas puesto que, con los resultados obtenidos de piruvato, necesitaríamos evaluar también la concentración de lactato presente en estos cultivos para determinar de manera más clara y precisa los resultados arrojados.

## **CONCLUSIONES**

- ❖ No se logro realizar el experimento con la quimiocina Fractalcina, sin embargo, se deja abierta la posibilidad de trabajar con este estudio.
- ❖ Con el ensayo realizado (piruvato) no se pudo evaluar el flujo glucolítico de las células de cáncer pulmonar H292 cultivadas con alta glucosa +/- las quimiocinas Fractalcina y SDF-1 por lo que se recomienda llevar a cabo el ensayo de lactato al mismo tiempo ya que se podrían encontrar diferencias significativas entre las diferentes muestras.
- ❖ Se logro aprender la técnica de cultivo celular y el estímulo de estas células en diferentes condiciones de glucosa.
- ❖ Se determino la concentración de piruvato en los medios condicionados.

## **Comentarios finales**

Durante la realización del servicio social, se logró aprender la técnica de cultivo celular, diseñar experimentos y realizar determinaciones de metabolitos celulares por la técnica de colorimetría. Por lo cual, creemos que la función principal de un trabajo de servicio social se cumplió satisfactoriamente, ya que el estudiante complementó su formación escolar con técnicas que no manejaba, colaboró en el avance de una investigación, desarrolló un tema de investigación y elaboró un reporte final de resultados.



## BIBLIOGRAFIA

1. Annibaldi A., Widmann C. (2010) Glucose metabolism in cancer cells. Department of Physiology, Lausanne University Switzerland, 13:466–470.
2. Colville-Nash, P. R., & Willoughby, D. A. (1997). Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Molecular medicine today*, 3(1), 14-23.
3. Damata C. X., Cabral P. (2012) Angiogénesis Tumoral: estrategias diagnósticas y terapéuticas. Centro de investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias Universidad de la República Salud Militar Vol. 31 N° 1.
4. Duarte M. J., R. F. (2016). La asociación entre Cáncer y Diabetes es real. *Medicina Interna de México*, 318-129. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2016/mim163g.pdf>
5. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425–34
6. Farber, E. (1995). Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. *Cancer research*, 55(17), 3759-3762.
7. Fong A. M., Robinson L. A., Steeber D. A. et al., “Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 188, no. 8, pp. 1413–1419, 1998.
8. Freyre-Bernal, S. I., Saavedra-Torres, J. S., Zúñiga-Cerón, L. F., Díaz-Córdoba, W. J., & Pinzón-Fernández, M. V. (2018). Cancer and mitochondrial function. *Revista de la Facultad de Medicina*, 66(1), 83-86.
9. Khosravi Shahi, P., Castillo Rueda, A. D., & Pérez Manga, G. (2008). Angiogénesis neoplásica. In *Anales de Medicina Interna* (Vol. 25, No. 7, pp. 366-369). Arán Ediciones, SL.
10. Mantovani A., “The chemokine system: redundancy for robust outputs,” *Immunology Today*, vol. 20, no. 6, pp. 254–257, 1999.
11. Marín, A.H (2009). El factor inducido por la hipoxia-(HIF-1) y la glucólisis en las células tumorales. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(2),42-51.
12. Mayoral C. M. (2004). Perspectiva monográfica del cáncer pulmonar, un enfoque molecular y metastasis al cerebro. *Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(4), 283-292.
13. Monteagudo, C., Pellin-Carcelén, A., Martín, J. M., & Ramos, D. (2011). Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 102(7), 498-504.
14. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 274: 1393–418
15. Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of migration control. *Trends Immunol* 25, 75- 84.
16. Nicolson, G. L., (1993). Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*12, 325–343
17. Parkin D. M. (2005) *The Burden of Cancer in the Developing World: 2002 ASCO Educational Book*, 702-718.

18. Regifo, G. F. (2007). Expresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas. *Acta Medica Peruana*, 187.
19. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 106-113. doi: 17(2):108-113
20. Saintigny, P., and Burger, J.A. (2012). Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management. *Discov Med* 13, 287-297.
21. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441:424–430.
22. Valle M. A. (2014). Metabolismo Energético y Cáncer. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 106-113. doi: 17(2):108-113
23. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930), 1029-1033
24. Warburg O, Posener K, Negelein E. (1924). Ueber den stoffwechsel der tumoren. *Biochem. Z.* 152: 319–44
25. Zlotnik, A. (2006). Chemokines and cancer. *Int J Cancer* 119, 2026-2029.
26. Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36, 705-716.
27. Zu XL, Guppy M. 2004. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 459–65

## RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con más incidencia en todo el mundo. En México, el cáncer pulmonar es la cuarta causa de muerte lo anterior se debe a que el 98% de los casos se diagnostica en una etapa avanzada (CANIFARMA, 2016).

El cáncer de pulmón se divide en dos subtipos histológicos según la morfología de las células: el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). El CPCNP consiste en diversas variantes: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes, entre otros. El CPCP comprende entre otros el carcinoma de pulmón neuroendocrino el cual es muy agresivo, tratado principalmente con quimioterapia y ocasionalmente, radioterapia (Saintigny y Burger, 2012).

La célula neoplásica exhibe una serie de mutaciones acumuladas, las cuales son responsables de alteraciones en respuestas celulares como la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis, dando como resultado un aumento de la masa tumoral (Nicolson, G. L., 1993). Adicionalmente, estas alteraciones genéticas también promueven cambios en los patrones de expresión de la célula neoplásica como la angiogénesis, que favorece el proceso de invasión y metástasis (Colville-Nash & Willoughby, 1997). Además, las células cancerosas presentan alteraciones metabólicas que les permiten tener una rápida proliferación (Shaw, *et al*, 2006).

Las quimiocinas tienen funciones importantes en cáncer, por ejemplo, en la regulación de la metástasis puesto que la diseminación del tumor puede facilitarse debido a sus receptores ya que estos participan en las etapas fundamentales de la metástasis como la adherencia de las células tumorales al endotelio, la extravasación de los vasos sanguíneos, la colonización metastásica, la angiogénesis, la proliferación celular y la protección de la respuesta del huésped mediante la activación de vías de supervivencia clave (Freyre-Bernal *et al*, 2018).

Fractalcina, también conocida como CX<sub>3</sub>CL1, se clasifica como una quimiocina de doble función (Zlotnik y Yoshie, 2012). Ésta se diferencia de todas las otras quimiocinas porque se expresa como una proteína transmembranal. Se encuentra comúnmente en todo el cerebro, particularmente en las células neuronales, se sabe que su receptor está presente en las células microgliales y se ha descubierto que es esencial para la migración de estas células (Mayoral

C., 2004). Además, esta quimiocina también participa en el reclutamiento de leucocitos asociado con numerosos trastornos inflamatorios y en el proceso de tumorigénesis en el que muestra propiedades pro y antitumorales. Los diferentes roles de CX3CL1 lo convierten en un candidato atractivo para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

El objetivo del trabajo fue evaluar el flujo glucolítico de células de cáncer pulmonar (H292) con alta glucosa +/- la quimiocina fractalcina; y su posible efecto en la resistencia a la muerte por apoptosis. Sin embargo, el trabajo con la quimiocina Fractalcina no pudo completarse como se planteaba debido a que no se contaba con el material suficiente, por lo que se colaboró con un proyecto similar con el uso de la quimiocina SDF-1 donde se trabajaron las mismas condiciones de concentración de quimiocina (1, 10 y 100 ng/mL), siendo la variante las concentraciones de glucosa las cuales se manejaron de 6, 8.5 y 11 mM.

Se observó que en las condiciones 6 mM y 8.5 mM de glucosa, las concentraciones de quimiocina SDF-1 (1, 10 y 100 ng/mL) no representaron un cambio significativo respecto a las veces de cambio del basal (0 ng/mL) puesto que la concentración de piruvato no aumento en ninguno de los experimentos. Por otro lado, con la condición 11 mM de glucosa mostró un aumento de cada concentración de quimiocina SDF-1 respecto al basal en cada uno de los tres experimentos.

Sabemos que las células normales utilizan el oxígeno para la producción de ATP por fosforilación oxidativa pero cuando esta disponibilidad de oxígeno se ve limitada y el metabolismo oxidativo disminuye, el piruvato es reducido a lactato volviéndose un punto crítico en el metabolismo de las células cancerígenas (Marín, 2009). De acuerdo con lo anterior, no se pudo determinar el flujo glucolítico de las células H292 cultivadas en alta glucosa con las quimiocinas empleadas puesto que, con los resultados obtenidos de piruvato, se necesita evaluar también la concentración de lactato presente en estos cultivos para determinar de manera más clara y precisa los resultados arrojados.