



# **Caracterización de co-cultivos entre células de cáncer de colon y células mononucleares de sangre periférica para el estudio del metabolismo glucolítico y el estrés oxidativo.**

**Diego Felipe Aponte Santamaría**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Maestría en Bioquímica  
Bogotá, Colombia  
2016



# **Caracterización de co-cultivos entre células de cáncer de colon y Células Mononucleares de Sangre Periférica para el estudio del metabolismo glucolítico y el estrés oxidativo.**

**Diego Felipe Aponte Santamaría**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Bioquímica.**

Directora:

Ph.D. Ruth Garzón Fernández.

Unidad de Bioquímica, Universidad del Rosario.

Línea de investigación:

Mecanismos bioquímicos y moleculares de la respuesta celular activada por estrés.

Grupo Bioquímica y Biotecnología

Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Bioquímica

Bogotá, Colombia

2016



*“Nos encontramos en los comienzos mismos de la era de la raza humana.  
No es ilógico que tengamos o que tropecemos con problemas,  
pero hay decenas de miles de años en el futuro.  
Es responsabilidad nuestra hacer lo que podemos,  
aprender lo que podemos, mejorar las soluciones y transmitirlas a nuestros sucesores. Es  
responsabilidad nuestra dejar las manos libres a las generaciones futuras.”*  
*(Richard Feynman, 1918-1988)*

## Agradecimientos

Inicialmente quiero agradecer a la Profesora Ruth Garzón por darme la oportunidad para hacer mi trabajo de grado en su grupo de investigación. Su supervisión y constante soporte ha sido crucial para lograr los objetivos planteados en este trabajo.

Quiero agradecer a los demás profesores de la unidad de Bioquímica de la Universidad del Rosario, Alejandro Ondo, Martha Pinzón, Lilia del Riesgo, Fabio Castillo y Luisa Matheus por su constante participación en los análisis de los resultados y las ideas que me brindaron. También quiero agradecer a los profesores de la Universidad Nacional, Carlos Guerrero, Luis Alberto Gómez y Carlos Clavijo por enseñarme a ver la ciencia de manera crítica.

De instituciones quiero agradecer a la Universidad Nacional de Colombia por brindarme una formación de calidad, a la Universidad del Rosario por la financiación de reactivos, equipos, viajes y organización para que se llevará a cabo este proyecto, a Colciencias por su programa de jóvenes investigadores, al Banco de sangre y el Banco de cordón umbilical del Hemocentro Distrital por su colaboración brindándome sangre para los experimentos y por brindarme el uso del citómetro de flujo, y por último al *European Molecular Biology Laboratory* y su apoyo de viaje para presentar este proyecto en la conferencia “Tumour Microenvironment and Signalling” en Heidelberg, Alemania.

Le agradezco enormemente a Diana Tovar y Ana María Perdomo por ayudarme con los ensayos de citometría de flujo; a Andrés Quintero por su colaboración con el procesamiento de las imágenes de captación de glucosa; a Marcela y Judy del Hemocentro Distrital por la ayuda con los consentimientos informados y la organización de la entrega de sangre; y a todas las personas del grupo de Bioquímica y Biotecnología (Bio-Bio), Carolina Gámez, Juan Carlos Alarcón, Daniel López, Lorena González, July Buitrago y Alejandrina Moya por compartir buenos momentos que hacen tan agradable el ambiente en el grupo. Además, por sus sugerencias, motivación y ayuda que me brindaron un excelente camino para llevar a cabo este trabajo.

Fuera del grupo de laboratorio, quiero agradecer a todos mis amigos; Tania, Anamaría, Jorge; Tagarit; Catalina; que de alguna manera han sido una pequeña parte de lo que soy y han compartido muchas cosas buenas y malas conmigo. Especialmente quiero agradecer a Yenith por su apoyo incondicional, su cariño, por ser parte de mi vida y de esta gran aventura.

Finalmente quiero expresar mi infinita gratitud a mis padres Blanca y Agustín; a mi hermano Camilo, a mi cuñada Nadine, a mi sobrinito Emilio y a mis demás familiares. Ellos son mi motor de inspiración de todas las cosas que pasan en mi vida y la razón para seguir adelante con mis sueños.

## Instituciones que participaron en este proyecto.



**Universidad del  
Rosario**

Financiación de reactivos,  
equipos, viajes y organización.



Grupo de investigación en  
Bioquímica y Biotecnología



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA



COLCIENCIAS  
C O L O M B I A

Programa de jóvenes investigadores.



Suministro de sangre.



Prestamo del citómetro de flujo.

EMBL



European Molecular  
Biology Laboratory

Beca de viaje para el congreso "*Tumour  
Microenvironment and Signalling*",  
Heidelberg, Alemania.

### Grupos en colaboración



Laboratorio de Reumatología e  
Inmunología, del Departamento de  
Pediatria, de la Universidad de Würzburg.



Laboratorio TIRO,  
Nice, France.

Plugin "Cell Quant"  
para Image J.



## RESUMEN

En el microambiente tumoral, algunas condiciones como la heterogeneidad celular, las concentraciones de oxígeno y la inmunoección ejercida por las células del sistema inmune, inducen un proceso de selección natural que favorece la adaptación de las células de cáncer al ambiente cambiante. Estas condiciones pueden potenciar el inicio, la supervivencia y proliferación de las células de cáncer. Aunque existen algunos trabajos que muestran los cambios que presentan las células del sistema inmune en el microambiente tumoral, se desconocen los posibles efectos que genera la presencia de este tipo de células sobre la regulación del metabolismo glucolítico y el estrés oxidativo en células de cáncer de colon y cómo esto puede fomentar la supervivencia de este tipo de células durante la inmunoección. En este estudio se propone un sistema de co-cultivo *in vitro* entre Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSPs) y la línea celular de cáncer de colon humano HT29 para estudiar los posibles cambios metabólicos y de estrés oxidativo de las células cancerosas. Las células fueron co-cultivadas por 24 horas en relaciones HT29: CMSP como sigue, 1:0 (HT-29 en monocultivo), 1:½, 1:3, 1:5 y 1:10, en normoxia (20% O<sub>2</sub>) o hipoxia (1% O<sub>2</sub>). Se determinó la viabilidad celular, apoptosis, captación de glucosa, la concentración de lactato extracelular, los niveles de proteínas involucradas en el metabolismo glucolítico tales como Hexoquinasa 2 (HK2), la Isoenzima Piruvato Quinasa M2 (PKM2) y los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Los resultados mostraron una disminución en la viabilidad de las células HT-29 entre un 15 a 25% y un incremento en la apoptosis temprana entre un 10 a 15%, en la apoptosis tardía entre un 7 a 10% y en la necrosis del 5% al incrementar el número de CMSP en el co-cultivo. El consumo de glucosa en las células HT-29 y la concentración de lactato en el medio extracelular se vieron incrementados para las relaciones bajas del co-cultivo, pero disminuyó en la relación más alta. Los niveles de PKM2 no se vieron alterados en las diferentes relaciones evaluadas. Sin embargo, los niveles de HK2 disminuyeron ligeramente en la relación 1:10 en normoxia. Los niveles de ROS incrementaron gradualmente a medida que se incrementó el número de CMSPs en el co-cultivo en condiciones de normoxia, pero no en hipoxia. Los cambios metabólicos en las relaciones bajas del co-cultivo podrían estar asociadas a la glucólisis anaerobia o al efecto Warburg, mientras que las relaciones altas podrían estar asociadas a un efecto Warburg reverso. Este modelo podría ser aplicado para identificar cambios metabólicos en células tumorales que hayan sido co-cultivadas por contacto directo con células del sistema inmune.

### **PALABRAS CLAVE.**

Metabolismo glucolítico tumoral, respuesta inmune celular, inmunoección, respuesta celular a estrés, cáncer de colon, co-cultivo celular, células mononucleares de sangre periférica (CMSPs), HT-29.

## ABSTRACT

In the tumoral microenvironment, some conditions such as the cellular heterogeneity, concentration of oxygen and immunoediting exerted by immune cells, could induce a natural selection process which favors the adaptation of cancer cells to the changing environment. These conditions could enhance the initiation, survival and proliferation of cancer cells. Although there are some works focused on the possible changes that suffer the immune system cells in the tumoral microenvironment, it is unknown the possible effect that the presence of immune cells has on the regulation of glycolytic metabolism and oxidative stress in colon cancer cells and how it could influence the survival of these type of cancer cells during immunoediting. This study proposed an *in vitro* co-culture system between peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and HT29 human colon cancer cells as an *in vitro* model to study possible changes in glycolytic metabolism and oxidative stress of cancer cells. The cells were co-cultured for 24h at ratios between HT29: PBMCs as follow, 1: 0 (HT-29 monoculture), 1: ½, 1: 3, 1: 5 and 1: 10, in normoxia (20% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>). Cell viability, apoptosis, glucose uptake, lactate concentration in the extracellular medium, the levels of proteins involved in the glycolytic metabolism, such as Hexokinase 2 (HK2) and Pyruvate kinase isozymes M2 (PKM2) and levels of reactive oxygen species (ROS) were determined.

The results showed a decrease in the viability of the HT-29 cells between 15 and 25% and an increase in stages of early apoptosis between 10 and 15%, late apoptosis 7 to 10% and necrosis 5% when the number of PBMCs was increased in the co-culture. The glucose uptake and lactate concentration in extracellular medium increase for the low ratios of co-culture, but decrease for the highest ratio of co-culture. Levels of PKM2 were not altered at any of ratios tested. However, the levels of HK2 slightly decreased at 1:10 ratio in normoxia. The ROS levels increased gradually when the number of PBMCs was increased in normoxia but not in hypoxia. The metabolic changes at low ratios of co-culture could be linked with the anaerobic glycolysis or the Warburg effect, meanwhile the high ratios of co-culture could be linked with the reverse Warburg effect. This model could be applied to identify metabolic changes in the tumor cells following direct contact with immune cells.

### Keywords.

Tumoral glycolytic metabolism, immune response, immunoediting, cellular stress response, colon cancer, cell co-culture, Peripheral Blood Mononuclear Cells, HT-29.

# Contenido

|  |           |
|--|-----------|
| RESUMEN .....  | 1         |
| ABSTRACT .....   | 2         |
| <b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.1 La inflamación y su relación en la interacción entre células tumorales y CMSPs dentro del microambiente tumoral.....</b>        | <b>13</b> |
| <b>1.2 Citoquinas y vías de señalización involucradas en la progresión del cáncer asociadas a inflamación.....</b>                     | <b>14</b> |
| <b>1.3 Inmunoedición .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.4 Metabolismo glucolítico en células de cáncer.....</b>   | <b>16</b> |
| 1.4.1 HK2.....   | 17        |
| 1.4.2 PKM2.....  | 18        |
| <b>1.5 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>1.6 Planteamiento del problema.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>1.7 Preguntas de investigación.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>1.8 Objetivos.....</b>  | <b>21</b> |
| 1.8.1 <i>Objetivo General</i> .....  | 21        |
| 1.8.2 <i>Objetivos específicos</i> .....   | 21        |
| <b>CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>2.1 Modelo de estudio planteado .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>2.2 Preparación de las CMSPs y HT-29 antes del co-cultivo.....</b>  | <b>22</b> |
| 2.2.1 <i>Aislamiento y cultivo de CMSPs.....</i>   | <i>22</i> |
| 2.2.2. <i>Cultivo de HT-29 .....</i>   | <i>23</i> |
| <b>2.3 Co-cultivo a diferentes relaciones entre las CMSPs y HT-29 .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.4 Metodología para dar respuesta al primer objetivo:.....</b>   | <b>24</b> |
| 2.4.1 <i>Medición del número de células HT-29 remanentes después del tratamiento. ....</i>   | <i>24</i> |
| 2.4.2 <i>Medición viabilidad celular, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis en células HT-29 después del co-cultivo.....</i> | <i>25</i> |
| 2.4.3. <i>Estimación del porcentaje de CMSP adheridas a la superficie del plato de cultivo.....</i>                                    | <i>27</i> |
| <b>2.5 Metodología para dar respuesta al segundo objetivo:.....</b>  | <b>26</b> |
| 2.5.1 <i>Medición de la producción de lactato. ....</i>  | <i>26</i> |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.5.2 Medición de la captación de glucosa. ....   | 26        |
| 2.5.3 Evaluación de la expresión de los genes HK2 y PKM2, por western blot. ....  | 27        |
| <b>2.6 Metodología para dar respuesta al tercer objetivo.....</b>   | <b>29</b> |
| 2.6.1 Medición de la producción de especies reactivas de oxígeno. ....  | 28        |
| <b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.1 Cambios en la cantidad de células remanentes y en su viabilidad celular. ....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.3. Estado del metabolismo glucolítico en las células HT-29 remanentes. ....</b>  | <b>41</b> |
| <b>3.4. Estado del estrés oxidativo en las células HT-29 remanentes.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>  | <b>46</b> |
| <b>4.1 Cambios en la adherencia y viabilidad celular. ....</b>  | <b>46</b> |
| <b>4.2 El estado del metabolismo glucolítico en las células HT-29 remanentes cambia dependiendo de la cantidad de CMSP en el co-cultivo. ....</b> | <b>48</b> |
| <b>4.3 El estado del estrés oxidativo en las células HT-29 remanentes varía dependiendo de la disponibilidad de O<sub>2</sub>.....</b>            | <b>50</b> |
| <b>CAPÍTULO 5: PERSPECTIVAS A FUTURO.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>5.1 A corto plazo:.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>5.2 A mediano plazo: .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>5.3 A largo plazo:.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>CAPÍTULO 6: VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL MODELO .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>Ventajas:.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>Limitaciones:.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>CAPÍTULO 8: ANEXOS .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>8.1 Curva de calibración de concentración de lactato vs. Absorbancia.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>8.2 Consideraciones éticas.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>8.3 Contribución a la línea de investigación del grupo.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>8.4. Análisis estadístico.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>8.5. Publicaciones derivadas. ....</b>   | <b>71</b> |
| <b>CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>73</b> |

## Lista de Figuras

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1. Pasos de la inmunoección.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>Figura 2. Esquema general de la metodología del co-cultivo entre células de la línea celular de cáncer de colon humano HT-29 y CMSP.....</b> | <b>24</b> |
| <b>Figura 3. Imágenes en campo claro de las diferentes relaciones del co-cultivo entre HT-29 y CMSP. ....</b>                                   | <b>30</b> |
| <b>Figura 4. Porcentaje de células HT-29 remanentes y viabilidad celular .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>Figura 5. Determinación de los diferentes estadios de viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis .....</b>                  | <b>33</b> |
| <b>Figura 6. Cambios en viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis para cada relación del co-cultivo. ....</b>                 | <b>37</b> |
| <b>Figura 7. Estimación del porcentaje de CMSP adheridas a la superficie del plato de cultivo.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>Figura 8. pH del medio de cultivo para las diferentes relaciones del co-cultivo.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>Figura 9. Concentración de lactato en el medio extracelular para las diferentes relaciones del co-cultivo. ....</b>                          | <b>42</b> |
| <b>Figura 10. Captación de glucosa en las células remanentes.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>Figura 11. Niveles de expresión de las proteínas HK2 y PKM2 en las células remanentes .....</b>  | <b>44</b> |
| <b>Figura 12. Veces de cambio de los niveles de ROS de las células HT-29 remanentes .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>Figura 13. Esquema hipotético de los cambios en el metabolismo de las células de cáncer de colon HT-29.....</b>                              | <b>52</b> |
| <b>Figura 14. Curva de calibración de concentración de lactato vs Absorbancia .....</b>   | <b>59</b> |

## Lista de Tablas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1.. Análisis estadístico para el porcentaje de células remanentes .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>Tabla 2.Análisis estadístico para el porcentaje de viabilidad .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>Tabla 3. Análisis estadístico para los diferentes tratamientos del porcentaje de células vivas.....</b>                                   | <b>63</b> |
| <b>Tabla 4. Análisis estadístico para los diferentes tratamientos del porcentaje de células en apoptosis temprana .....</b>                  | <b>64</b> |
| <b>Tabla 5. Análisis estadístico para los diferentes tratamientos del porcentaje de células en apoptosis tardía ...</b>                      | <b>65</b> |
| <b>Tabla 6. Análisis estadístico para los diferentes tratamientos del porcentaje de células en necrosis.....</b>                             | <b>65</b> |
| <b>Tabla 7. Análisis estadístico comparando los diferentes estadios de viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis .....</b> | <b>66</b> |
| <b>Tabla 8. Análisis estadístico para la concentración de lactato en el medio extracelular .....</b>   | <b>67</b> |
| <b>Tabla 9. Análisis estadístico para el pH del medio de cultivo .....</b>   | <b>68</b> |
| <b>Tabla 10. Análisis estadístico para el consumo de glucosa .....</b>   | <b>68</b> |
| <b>Tabla 11. Análisis estadístico para las veces de cambio de los niveles de ROS .....</b>   | <b>70</b> |

## Lista de símbolos y abreviaturas

| Símbolos        | Término                        |
|-----------------|--------------------------------|
| °C              | Grados centígrados             |
| μg              | Microgramos                    |
| μL              | Microlitros                    |
| μM              | Micromolar                     |
| μm              | Micrómetros                    |
| cm <sup>2</sup> | Centímetros cuadrados          |
| xg              | Gravedades                     |
| h               | Horas                          |
| kDa             | Kilodalton                     |
| Km              | Constante de Michaelis-Menten. |
| min             | Minutos                        |
| mL              | Mililitros                     |
| mM              | Milimolar                      |
| pH              | Potencial de hidrógeno         |
| rpm             | Revoluciones por minuto        |
| U               | Unidades                       |
| λ               | Longitud de onda               |

| Abreviatura | Término Español             | Término Inglés              |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| AKT         | Proteína quinasa B.         | Protein kinase B.           |
| APC         | Poliposis Adenomatosa coli. | Adenomatous polyposis coli. |
| ATP         | Adenosina trifosfato.       | Adenosine triphosphate.     |

|                               |  |   |
|-------------------------------|--|---|
| Bcl2                          | Proteína de linfoma 2 de células B.                        | B-cell lymphoma-2 protein.                                      |
| Bcl-xL                        | Linfoma extra largo de células B.                          | B-cell lymphoma extra large.                                    |
| c-Met                         | Proto-oncogen MET, receptor tirosina quinasa.              | MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase.                   |
| c-myc                         | Gen celular similar al oncogene de mielocitomatosis viral. | Cellular gene similar to myelocytomatosis viral oncogene.       |
| c-jun                         | Proto-oncogen que codifica para la proteína JUN.           | Proto-oncogene JUN.   |
| CAC                           | Cáncer asociado a colitis.                                 | Colitis-associated cancer.                                      |
| CD4 <sup>+</sup>              | Cluster de diferenciación 4.                               | Cluster of differentiation 4.                                   |
| CD8 <sup>+</sup>              | Cluster de diferenciación 8.                               | Cluster of differentiation 8.                                   |
| cFLIP                         | inhibidor celular proteico de FLICE.                       | (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein. |
| CMSP                          | Células Mononucleares de Sangre Periférica.                | Peripheral Blood Mononuclear Cells.                             |
| CRC                           | Cáncer colo-rectal.  | Colorectal cancer.  |
| DMEM                          | Medio Dubelcoo's Modified Eagle.                           | Dulbecco's Modified Eagle Medium.                               |
| DNA                           | Ácido desoxiribonucleico.                                  | Desoxyribonucleic Acid.   |
| EDTA                          | Ácido Etilenediaminatetracético.                           | Ethylenediaminetetraacetic acid.                                |
| EGF                           | Factor de crecimiento epidermal.                           | Epidermal growth factor.  |
| G6P                           | Glucosa 6 fosfato  | Glucose 6 phosphate   |
| GAPDH                         | Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa                    | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.                       |
| Glc                           | Glucosa  | Glucose   |
| GLUT                          | Transportadores de glucose.                                | Glucose transporters.   |
| GSK3                          | Quinasa glicógeno sintaza 3.                               | Glycogen synthase kinase 3.                                     |
| H2DFCDA                       | 5(6)-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceína.               | 5(6)-carboxy-2,7-dichlorodihydrofluorescein.                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno.                                     | Hydrogen peroxide   |
| HIF-1 $\alpha$                | Factor inducible de hipoxia 1.                             | Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ .                           |
| HK1                           | Hexoquinasa 1.   | Hexokinase 1  |
| HK2                           | Hexoquinasa 2.   | Hexokinase 2  |
| HK3                           | Hexoquinasa 3.   | Hexokinase 3  |

|                                 |  |  |
|---------------------------------|--|--|
| HK4                             | Hexoquinasa 4.   | Hexokinase 4   |
| HRP                             | Peroxidasa de rábano.  | Horseradish peroxidase.                              |
| HT-29                           | Línea celular de adenocarcinoma colorectal de humano.        | Human colo-rectal adenocarcinome cell line.          |
| IL-1                            | Interleuquina 1.   | Interleukin-1.                                       |
| IL-1 $\beta$                    | Interleuquina 1 $\beta$ .                                    | Interleukin-1 $\beta$ .                              |
| IL-6                            | Interleuquina 6.   | Interleukin-6.                                       |
| IL-10                           | Interleuquina 10.  | Interleukin-10.                                      |
| IL-11                           | Interleuquina 11.  | Interleukin-11.                                      |
| IL-17                           | Interleuquina 17.  | Interleukin-17.                                      |
| IL-22                           | Interleuquina 22.  | Interleukin-22.                                      |
| IL-23                           | Interleuquina 23.  | Interleukin-23.                                      |
| K-ras                           | Oncogen homólogo al sarcoma viral de rata Kirsten.           | Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog.          |
| LDHA                            | Lactato deshidrogenasa A.                                    | Lactate dehydrogenase A.                             |
| MMR                             | Reparación por no coincidencia.                              | Mismatch repair.                                     |
| mTOR                            | Blanco mecanístico de la rapamicina.                         | Mechanistic target of rapamycin                      |
| NAC                             | N-Acetilcisteína.  | N-Acetylcystein.                                     |
| NADPH                           | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.                   | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.         |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> | Ortovanadato de sodio.                                       | Sodium orthovanadate                                 |
| NF $\kappa$ -B                  | Factor Nuclear kB.   | Nuclear factor kB.                                   |
| NK                              | Células Natural Killer.                                      | Natural Killer cells.                                |
| NO                              | Óxido Nítrico.   | Nitric Oxide.  |
| O <sub>2</sub>                  | Oxígeno  | Oxygen.  |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>     | Anión superóxido   | Superoxide anion.                                    |
| p53                             | Supresor de tumor p53.                                       | Tumor suppressor p53.                                |
| PBS                             | Buffer salino fosfato.                                       | Phosphate Saline Buffer.                             |
| PEP                             | Fosfoenolpiruvato.   | Phosphoenolpyruvate                                  |
| PDK1                            | Isoenzima 1 de la piruvato deshidrogenasa lipoamida quinasa. | Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1.   |
| PI3K                            | Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-quinasa.                  | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase.      |
| PKs                             | Piruvato Quinasas.   | Pyruvate kinases.                                    |
| PKM1                            | Isoenzima Piruvato Quinasa M1.                               | Pyruvate kinase isoenzyme M1.                        |
| PKM2                            | Isoenzima Piruvato Quinasa M2.                               | Pyruvate kinase isoenzyme M2.                        |
| PMSF                            | Fenilmetilsulfonil fluoruro.                                 | Phenylmethylsulfonyl fluoride.                       |
| RANKL                           | Receptor activador del factor nuclear del ligando kappa-B.   | Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand. |
| RIPA                            | Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación.                | Radioimmunoprecipitation assay buffer.               |

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| ROS           | Especies reactivas de oxígeno                           | Reactive Oxygen Species.                                    |
| RNA           | Ácido ribonucleíco.                                     | Ribonucleic Acid.   |
| Src           | Proto-oncogen de la proteína tirosina quinasa Src.      | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src.                 |
| STAT-3        | Transductor de señal y activador de la transcripción 3. | Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). |
| TGF- $\alpha$ | Factor de crecimiento transformante alfa.               | Transforming growth factor alpha.                           |
| TGF- $\beta$  | Factor de crecimiento transformante beta.               | Transforming growth factor beta.                            |
| Th17          | Células T ayudante 17.                                  | T helper 17 cells.  |
| TNF           | Factor de necrosis tumoral.                             | Tumor necrosis factor.                                      |
| VDAC          | Canales de anions dependiente de voltaje.               | Voltage-dependent anion channels.                           |
| Wnt           | Vía de señalización Wnt.                                | Wnt signaling pathways                                      |



# CAPÍTULO 1:

## INTRODUCCIÓN

La gran heterogeneidad del microambiente tumoral se debe entre otros aspectos, a que se compone de varios tipos de células y de condiciones diversas en cuanto al pH, la disponibilidad de nutrientes o las concentraciones de oxígeno presentes. Allí se encuentran células cancerosas, fibroblastos, células endoteliales, y en gran proporción células del sistema inmune, además de los componentes de la matriz extracelular y algunas sustancias secretadas por las mismas células como citoquinas y quimioquinas.

Aunque en varios estudios se ha podido establecer que el microambiente tumoral es determinante en el crecimiento del tumor, en cuanto a aspectos como la inflamación y específicamente la inmunoección, se conoce muy poco del efecto regulador que tienen las células que componen dicho microambiente sobre la respuesta y adaptaciones metabólicas de las células cancerosas.

El grupo de investigación de Bioquímica y Biotecnología (Bio-Bio) de la Universidad del Rosario, con su línea *mecanismos bioquímicos y moleculares de la respuesta celular activada por estrés*, tiene un gran interés en simular el microambiente tumoral y estudiar en este contexto, el efecto que ejercen las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) sobre la respuesta metabólica de las células tumorales de cáncer de colon.

Este trabajo se realizó en tres fases. La primera se enfocó en establecer las condiciones óptimas del co-cultivo celular y en evaluar la viabilidad y los diferentes estadios de apoptosis que ilustraran si el modelo *in vitro* planteado podría ejercer una acción citotóxica por parte de las células inmunes que asemejara el primer paso de la inmunoección. En la segunda se evaluó la existencia de cambios a nivel del metabolismo glucolítico a través de la medición de la producción de lactato al medio extracelular, el pH del medio extracelular, la captación de glucosa y los cambios de los niveles de dos proteínas involucradas en el metabolismo glucolítico, tales como HK2 y PK-M2. En la tercera fase se evaluaron los cambios en el estrés oxidativo a través de la medición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

## MARCO TEÓRICO

Recientemente se ha reconocido y acuñado el término de microambiente tumoral para hacer referencia a la interrelación entre las células tumorales y las células normales (fibroblastos, células endoteliales, células de la respuesta inmune) que componen el tumor, además de las condiciones de oxigenación, pH y disponibilidad de nutrientes.

Durante el desarrollo del tumor se han podido evidenciar ciertas características biológicas distintivas entre las que se encuentran: señales de proliferación sostenida, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, bajo control en la inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y activación de la invasión y la metástasis. Más recientemente se han incluido en dicha lista la inestabilidad genómica, la inflamación, la evasión de la acción inmune sobre células malignas y la reprogramación del metabolismo energético <sup>1</sup>.

Tomando como base el metabolismo energético, algunos estudios describen la reprogramación que presentan las células cancerosas hacia un metabolismo glucolítico y el incremento en la expresión o actividad de algunas proteínas involucradas en esa vía metabólica <sup>1-7</sup>. Además, se ha profundizado en la relevancia de un *switch* metabólico, para que las células cancerosas puedan obtener los metabolitos suficientes (ácidos nucleicos y amino ácidos) que permitan la generación de macromoléculas necesarias durante la proliferación celular <sup>6,8,9</sup>. Otros estudios han demostrado que, en condiciones de normoxia, algunos tumores presentan subpoblaciones de células de cáncer que pueden estar más dirigidas hacia un metabolismo de fosforilación oxidativa pasando por la glucólisis y el ciclo de Krebs. Otras células están más dirigidas hacia un metabolismo glucolítico de producción de lactato (efecto Warburg) <sup>10-12</sup> y otras podrían consumir lactato extracelular para transformarlo a piruvato y posteriormente a Acetil-CoA dirigiéndolo al ciclo de Krebs y posteriormente a la fosforilación oxidativa (efecto Warburg reverso) <sup>13</sup>.

Otros trabajos se han enfocado en la influencia que tienen citoquinas <sup>14,15</sup>, factores de transcripción, oncogenes y supresores de tumor en la modulación del metabolismo glucolítico de las células cancerosas <sup>5,6,10,11,16,17</sup>. Sin embargo, un aspecto que se ha dejado un poco de lado en muchos de estos estudios, es la posible influencia de otras células del microambiente tumoral sobre el metabolismo glucolítico de las células de cáncer, específicamente, el efecto de las células del sistema inmune y sus posibles implicaciones en el crecimiento del tumor y en la resistencia a los tratamientos antitumorales.

### **1.1 La inflamación y su relación en la interacción entre células tumorales y CMSPs dentro del microambiente tumoral.**

En estudios sobre cáncer colorrectal se ha establecido una correlación entre la inflamación en el colon, el desarrollo y progresión del tumor. Se ha visto que alteraciones en algunos genes supresores de tumores u oncogenes podrían estar relacionadas con el microambiente tumoral, ligado directa o indirectamente a un proceso inflamatorio. Por ejemplo, la transición de un epitelio normal a un tumor maligno involucra la alteración de genes supresores de tumores (tales como APC y p53) y oncogenes (como K-ras), que podría estar vinculada a una constante activación de algunas rutas de señalización promovidas por citoquinas pro-inflamatorias o daños a nivel genómico por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. De tal modo, los tumores se benefician de las señales proliferativas y de supervivencia que se generan en dicho microambiente tumoral para continuar con su progresión <sup>14,15</sup>.

Con base en el estudio de algunas enfermedades inflamatorias que se presentan a nivel intestinal como la colitis ulcerativa o la enfermedad de Crohn, se ha podido establecer la conexión entre la inflamación y la tumorigénesis del cáncer colorrectal. A los tumores involucrados con enfermedades inflamatorias se les conoce como cáncer asociado a colitis (CAC) <sup>18,19</sup>. Sin embargo, algunos tumores colorrectales que no están asociados clínicamente con dichas enfermedades, denominados generalmente de cáncer colorrectal (CRC), también presentan infiltraciones inflamatorias y un incremento de citoquinas pro-inflamatorias <sup>14,15</sup>. Ambos tipos de tumores tienen en común la alteración de algunas vías de señalización o factores de transcripción, tales como la vía Wnt,  $\beta$ -catenina, K-ras, p53, TGF- $\beta$ , STAT-

3, NFκ-B y proteínas de reparación de errores del DNA (MMR) <sup>20-22</sup>. Algunos de estos factores de transcripción, como por ejemplo STAT-3 y NFκ-B, son esenciales en la activación de vías de respuesta inflamatoria.

Aunque la inflamación crónica puede estar involucrada en los tres estadios de desarrollo del tumor: iniciación, promoción y progresión, esta resulta ser más relevante durante la promoción y la progresión del tumor <sup>14,15</sup>. De hecho, la progresión del tumor se sustenta en la interacción entre las células tumorales y algunos componentes del microambiente tumoral, tales como: citoquinas, quimioquinas y matriz extracelular. En general los tumores están infiltrados por varios tipos de células, con una gran proporción de células del sistema inmune, entre las que se encuentran neutrófilos, mastocitos, células natural killer, células dendríticas, macrófagos asociados a tumores, algunas células supresoras derivadas de la línea mieloide, linfocitos T, linfocitos B, fibroblastos y miofibroblastos <sup>14,15</sup>.

## **1.2 Citoquinas y vías de señalización involucradas en la progresión del cáncer asociadas a inflamación.**

En el microambiente tumoral, durante la interacción entre células del sistema inmune y células de cáncer de colon, se ha visto que hay un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y algunas citoquinas anti-inflamatorias. Dentro de las citoquinas pro-inflamatorias se encuentran IL-6, IL-1, IL-1α, IL-1β, IL17, IL22, IL23, TNF y EGF <sup>14,15,23-25</sup>. Dentro de las citoquinas anti-inflamatorias se encuentran IL-10, IL-11 y TGF-β <sup>26-28</sup>. Aunque, en el microambiente tumoral, no se tiene la certeza en qué proporción estaría contribuyendo a la producción de estas citoquinas cada tipo de células, si se podría pensar que la mayor contribución vendría por parte de las células del sistema inmune que generan algún tipo de respuesta cuando están en presencia de células de cáncer de colon.

Hay varios indicios que vinculan a las citoquinas con la progresión del cáncer de colon. Por ejemplo, la IL-6 estimula la proliferación de enterocitos premalignos y de células de cáncer de colon incrementando el crecimiento del tumor <sup>26,29-31</sup>. También promueve la diferenciación de las células Th17, las cuales pueden mantener un proceso inflamatorio sostenido y regular la supervivencia de otras células T pro-inflamatorias <sup>32-36</sup>. Otro ejemplo es el TNF, el cuál actúa como un factor promotor del tumor al incrementar el proceso inflamatorio en las enfermedades intestinales. El TNF se presenta en los primeros estadios de inflamación y se relaciona con la producción de otras citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión endotelial. También incrementa la permeabilidad vascular, permitiendo el reclutamiento de más leucocitos en el sitio de inflamación <sup>25,35,37-40</sup>. Otro ejemplo de citoquinas que se ven incrementadas en los primeros estadios de inflamación, es la familia de IL-1. Esta familia de citoquinas se ha visto fuertemente asociada a varios cánceres gastrointestinales, incluyendo el cáncer gástrico y el CAC <sup>41-44</sup>.

Algunas citoquinas parecen jugar un papel paradójico, tal como el TGF-β, el cuál puede actuar de manera antitumoral en algunos cánceres gastrointestinales, a través de la inhibición de la proliferación, estimulando la apoptosis, y suprimiendo la expresión de otras citoquinas pro-tumorigénicas <sup>26,45-48</sup>. Sin embargo, en algunos estados avanzados, esta citoquina contribuye a la progresión maligna del tumor promoviendo la transición epitelial-mesenquimal y suprimiendo la actividad antitumoral de las células inmunes, para facilitar la metástasis <sup>49</sup>.

Durante el proceso inflamatorio se activan cuatro vías de señalización que llevan al desarrollo del tumor y que corresponden a la activación de NF- $\kappa$ B<sup>20</sup>, STAT-3<sup>21</sup>, Wnt/ $\beta$ catenina<sup>22</sup> y AKT-mTOR<sup>6</sup>. La activación aberrante de NF- $\kappa$ B ha sido detectada en más del 50% de tumores colorrectales o CAC<sup>20</sup>. La activación constante de esta vía induce la progresión del tumor incrementando la proliferación celular, la angiogénesis, inhibiendo la muerte celular y promoviendo la invasión y metástasis. La actividad antiapoptótica de NF- $\kappa$ B está mediada por la activación de los genes Bcl2, Bcl-xL y cFLIP<sup>20,50,51</sup>. Las citoquinas pro-inflamatorias que activan esta vía en las células de cáncer de colon son TNF, IL-1, IL-1 $\beta$ , IL17, RANKL y linfotoxina- $\beta$ <sup>14,15</sup>.

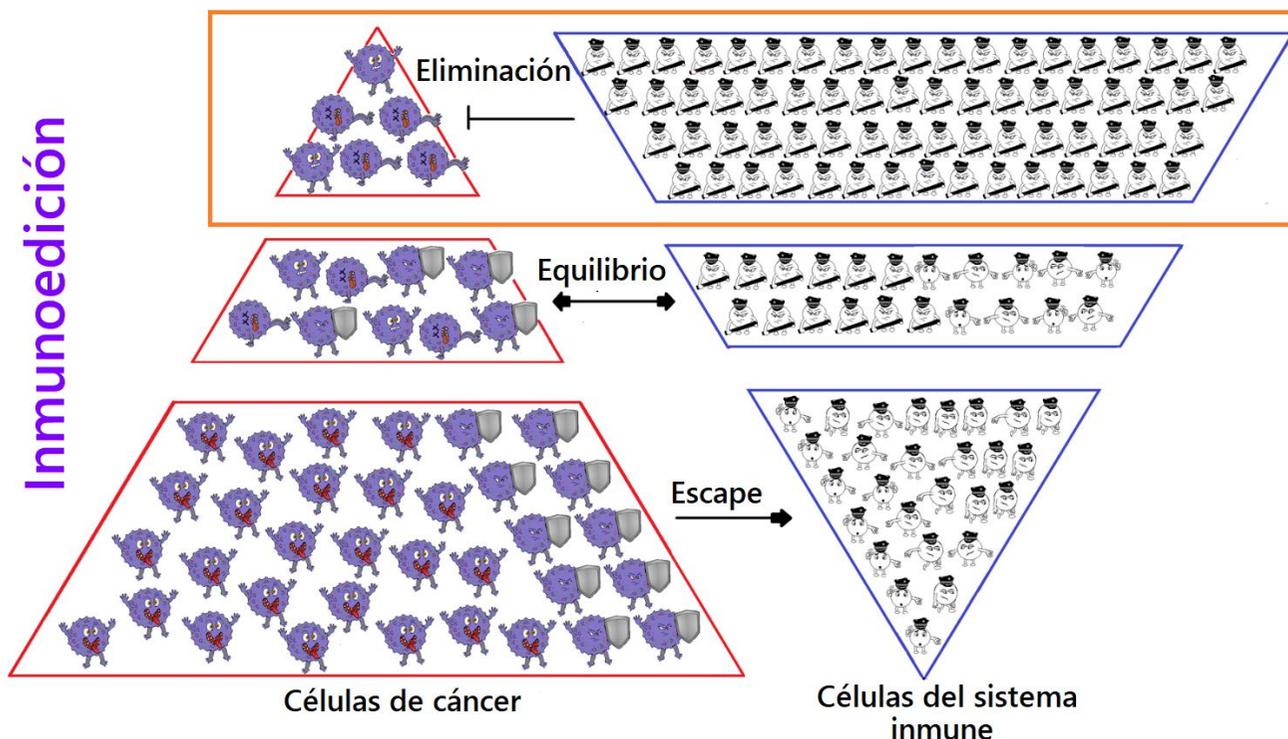
La activación del factor de transcripción STAT3 se puede dar por muchos factores de crecimiento y citoquinas<sup>14,15,21</sup>, tales como IL-11, IL-22<sup>52</sup>, el factor de crecimiento de hepatocito, ligandos del receptor EGF (TGF- $\alpha$ <sup>26</sup>, EGF), y algunas tirosina quinasas oncogénicas (c-Met o Src). Las citoquinas pro-inflamatoria más descritas en cáncer de colon que activan esta vía son IL-6<sup>29-32</sup> y IL-17<sup>34,53,54</sup>. Hasta el momento no se ha visto que la vía NF- $\kappa$ B o STAT3 presenten mutaciones que mantengan estas vías activas en cáncer colorrectal o tumores asociados a colitis<sup>14,15</sup>. Esto sugiere que la regulación alterada de estas vías se da de manera autocrina o paracrina, ya sea por las mismas células cancerosas y/o por células del sistema inmune, a través de moléculas solubles<sup>15</sup>.

Las vías Wnt/ $\beta$ catenina y AKT/mTOR, se han visto involucradas con las dos primeras vías, NF- $\kappa$ B y STAT3<sup>55-57</sup>. La activación de NF- $\kappa$ B por citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , activa indirectamente las vías AKT/mTOR y Wnt a través de las proteínas PDK1 y GSK3<sup>57-59</sup>. Al activar AKT/mTOR y Wnt se estimula la proliferación de las células tumorales dado que su activación regula la transcripción de genes involucrados en la progresión del tumor como c-myc, c-jun, ciclina-D<sup>6,22,24</sup>. Además de que AKT/mTOR y Wnt son relevantes en la progresión del tumor bajo un componente genético, también están regulando la progresión del tumor a nivel metabólico. Al activarse estas dos vías, se estimula la transcripción y traducción de las proteínas PDK y HIF-1 $\alpha$  las cuales regulan el metabolismo glucolítico<sup>57-59</sup>. De hecho, estas dos vías podrían tener una fuerte conexión que demuestre que existe un cambio metabólico de las células tumorales de cáncer de colon asociada a las citoquinas pro-inflamatorias generadas durante un proceso inflamación en el cáncer colorrectal y el cáncer asociado a colitis<sup>54,59</sup>.

### 1.3 Inmunoección

Al proceso inflamatorio que va ligado al desarrollo y la progresión del tumor se le conoce como inmunoección, figura 1. Este proceso se compone de tres etapas. La primera se le conoce como inmunovigilancia o de eliminación, la segunda se le conoce como inmunoselección o de equilibrio y la tercera se le conoce como inmunosubversión o escape tumoral. En la inmunovigilancia, se regula la detección y la eliminación de células transformadas o aberrantes y se mantiene en un estado de dormancia a los tumores pequeños. Este proceso se efectúa a través de células T CD8<sup>+</sup>, células CD4<sup>+</sup> y células Natural Killer. En la inmunoselección, se establece un balance entre una inflamación antitumoral y una inflamación protumoral. En esta etapa se inicia un proceso de inmunosupresión en las células del sistema inmune. Además, podrían estar asociados cambios de tipo metabólico, en vías de señalización, genético y epigenético a nivel de las células de cáncer, que le podrían conferir a estas, resistencia y supervivencia frente a la acción del sistema inmune. En la última etapa de escape tumoral, la inflamación protumoral sobrepasa la acción de la inmunidad antitumoral, mediante la regulación de la supervivencia de las células tumorales, regulación de la proliferación de las mismas, la inducción de angiogénesis a nivel tumoral y a través de una acción inmunosupresora por parte de algunas células T

reguladoras <sup>60-63</sup>. Todo este proceso de inmunoedición se ha visto vinculado a un estado inflamatorio claramente observado en enfermedades intestinales.



**Figura 1. Pasos de la inmunoedición.** La primera se le conoce como inmunovigilancia o de eliminación, la segunda se le conoce como inmunoselección o de equilibrio y la tercera se le conoce como inmunosubversión o escape <sup>61-64</sup>. Fuente: elaboración propia.

#### 1.4 Metabolismo glucolítico en células de cáncer.

El acceso al oxígeno es fundamental para la mayoría de los organismos. Las fluctuaciones en los niveles de este gas, han obligado a los organismos multicelulares a responder y adaptarse a estos cambios a través de elaborados mecanismos moleculares. Cuando el oxígeno se vuelve limitante, las células responden llevando su metabolismo celular hacia el bajo consumo de oxígeno y minimizando la influencia de los radicales libres de oxígeno. Como consecuencia, se presenta una disminución en la fosforilación oxidativa y un incremento en la dependencia de la glucólisis como fuente primaria de producción de ATP <sup>2-7,65-68</sup>.

Entre los cambios moleculares más importantes que buscan contrarrestar los efectos deletéreos de los bajos niveles de oxígeno se encuentran: el aumento en la expresión de genes que codifican para enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa, que permiten el cambio hacia la vía glucolítica <sup>5-7</sup>; factores de transcripción que expresan enzimas encargadas de regular el estrés oxidativo; factores angiogénicos que promueven la vascularización, para incrementar la oxigenación; y oncoproteínas, que le dan a las células tumorales hipóxicas ventajas en su crecimiento <sup>10,11,13</sup>.

La mayoría de los tumores sólidos con volúmenes mayores a 1mm<sup>3</sup> contienen tanto regiones hipóxicas como normóxicas, debido a un desequilibrio entre la disponibilidad y el consumo de oxígeno <sup>9-11,70</sup>.

Además, también se han podido observar diferencias en cuanto al metabolismo de las células cancerosas, siendo esto un reflejo de la heterogeneidad que se presenta en los tumores.

#### ***1.4.1 Efecto Warburg***

Tal vez la característica más notable en cuanto a las diferencias metabólicas que pueden presentar algunas células cancerosas, es el cambio metabólico dirigido hacia la fermentación láctica, independientemente de la disponibilidad de oxígeno. A este fenómeno se le conoce como efecto Warburg<sup>2-4,67</sup>.

Dentro de las moléculas y enzimas que se ven activadas o cuya expresión se ve incrementada, en el metabolismo glucolítico, ya sea en condiciones de hipoxia o durante el efecto Warburg, están: los transportadores de glucosa, GLUT 1, 2, 3 y 4; Hexoquinasa 2 (HK2); Aldolasa A; GAPDH; fosfoglicerato quinasa 1; fosfoglicerato mutasa; Enolasa 1; Piruvato quinasa M2 (PKM2) y lactato deshidrogenasa A (LDHA)<sup>65-67</sup>.

#### ***1.4.2 Efecto Warburg reverso***

En el efecto Warburg reverso algunas células del microambiente tumoral están dirigidas a realizar un metabolismo de glucólisis anaerobia, lo cual genera un incremento en el lactato extracelular por parte de estas. El incremento de lactato extracelular puede ser tomado como una ventaja para algunas células cancerosas y no cancerosas que captan el lactato secretado y lo incorporan para su transformación en piruvato y posteriormente en Acetil-CoA que ingresa al ciclo de Krebs<sup>13</sup>. De este modo dichas células obtienen energía a partir del lactato extracelular disponible en el microambiente tumoral<sup>13</sup>.

#### ***1.4.3 Glutaminólisis***

Otro aspecto a considerar en el microambiente tumoral es la acidosis que se genera por la presencia del lactato y protones libres en el medio extracelular. La acidosis puede repercutir en un cambio de la actividad metabólica de manera compatible y paralela al efecto Warburg reverso. Cuando hay un incremento en el lactato extracelular y una disminución en el pH se ha observado un incremento en la glutaminólisis. Esta transforma glutamina en glutamato y posteriormente en alfa-cetoglutarato para ingresar en el ciclo de Krebs, contribuyendo en la generación de ATP, siendo fuente de esqueletos carbonados para la posterior síntesis de ácidos grasos<sup>68</sup>.

Tanto en el efecto Warburg reverso como en la glutaminólisis se da una disminución en el consumo de glucosa y la glucólisis anaerobia. Sin embargo, esta disminución no llega a reducir completamente el consumo de glucosa, en vez de eso, la célula direcciona la glucosa consumida a la vía de pentosas fosfato. Este redireccionamiento tiene dos fines. El primero es la producción de esqueletos carbonados para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. El segundo y tal vez más relevante es tratar de mitigar el efecto del estrés oxidativo generado por la acidosis o la inflamación, en el microambiente tumoral, a través de la generación de NADPH que actúa como un agente reductor de las ROS presentes en la célula<sup>13,68</sup>.

#### ***1.4.1 HK2***

Como indicadores de un posible cambio sobre el metabolismo glucolítico, en este proyecto, se evaluó los niveles proteicos de las enzimas HK2 y PKM2.

Las hexoquinasas son una familia de proteínas que catalizan el primer paso del metabolismo de la glucosa, la fosforilación dependiente de ATP de la glucosa (Glc) para obtener glucosa 6 fosfato (G6P). El paso de Glc a G6P promueve y regula un gradiente de concentración que facilita la entrada de glucosa a las células. Dentro de la familia de hexoquinasas se encuentran principalmente 4 isoformas, expresadas en tejidos de mamíferos y codificadas por genes separados. Las isoformas son HK1, HK2, HK3 y HK4 (también conocida como glucoquinasa). HK1, HK2 y HK3 que tienen un peso molecular de 100kDa son isoformas de alta afinidad con un  $K_m = \sim 0.02\text{mM}$ , mientras que la HK4 con un peso de 50 kDa tiene una afinidad más baja,  $K_m = \sim 5\text{mM}$ . Dicha afinidad puede ser regulada por la concentración de G6P<sup>69-74</sup>.

Para el caso de este trabajo nos enfocamos en HK2 ya que se ha visto sobre expresada en células de cáncer, induciendo una aceleración en el flujo de glucosa hacia el interior de la célula. HK2 está expresada en altos niveles en tejidos embrionarios y en un número muy limitado de tejidos normales de adultos, tales como tejido adiposo, esquelético y de músculo cardíaco. En cáncer colorrectal se ha visto una alta expresión de HK2 en regiones del tumor donde se refleja un alto consumo de glucosa y de actividad glucolítica<sup>69-74</sup>.

HK2 tiene una estrecha relación con la mitocondria a través de la interacción con una proteína semejante a un poro que es un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) localizado en la parte externa de la membrana mitocondrial. EL VDAC permite el paso de pequeños metabolitos (peso molecular  $< 1500$ ) a través de la membrana, por ejemplo, facilitando el paso de nucleótidos de adenina hacia la cara externa de la mitocondria. Además, sirve como sitio de unión para HK y glicerol quinasas<sup>75,76</sup>.

La unión entre HK2 y VDAC es crucial para que HK2 pueda obtener ATP desde la mitocondria y pueda realizar su acción enzimática. Además dicha interacción es crítica en la prevención de la inducción de apoptosis<sup>77,78</sup>. Esto se ha podido inferir de experimentos en los cuales sobre-expresan a VDAC o mutan aminoácidos claves en la unión de HK2 a VDAC y se observa un incremento en la inducción de apoptosis en tumores<sup>79-82</sup>. Aún no es claro cómo podría estar regulándose la apoptosis debida a esta unión, sin embargo, algunas hipótesis plantean que la unión de HK2 a VDAC altera la conformación de VDAC generando un estado cerrado del canal que previene la transición de permeabilidad mitocondrial inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual genera la permeabilidad en la membrana interna mitocondrial y la liberación de citocromo C<sup>82-86</sup>. Otra hipótesis plantea que HK2 al unirse con VDAC altera su conductancia. Esto suprime la función mitocondrial y estimula la fermentación láctica<sup>76,78</sup>.

Con relación a nuestro modelo de estudio, se ha visto que en líneas celulares de cáncer colorrectal como HT-29, T84, Caco-2 y HCT116, la expresión de HK2 aumenta bajo la presencia de IL-17. La IL-17 es una citoquina pro inflamatoria secretada principalmente por linfocitos Th17<sup>53</sup>. En el microambiente tumoral la interacción entre las células tumorales y las CMSPs podría inducir la diferenciación de estas últimas hacia un fenotipo Th17 y con ello la secreción de algunas interleuquinas como la IL-17 lo que podría a su vez, aumentar la expresión de HK2 en las células HT29.

#### **1.4.2 PKM2**

Las enzimas piruvato quinasas (PKs) catalizan la transfosforilación desde el fosfoenolpiruvato (PEP) hacia ADP como último paso de la glucólisis para generar ATP y piruvato. La producción de ATP a partir de las PKs es independiente de oxígeno, lo cual facilita la supervivencia de células en condiciones de hipoxia<sup>87-89</sup>.

Existen 2 isoenzimas pertenecientes a la familia de las PKs que son codificadas por el gen PKM, la isoenzima Piruvato Quinasa de tipo M1 (PKM1) y la isoenzima Piruvato Quinasa de tipo M2 (PKM2). Se diferencian entre sí por *splicing* alternativo del exón 9 (para PKM1) y 10 (para PKM2), lo cual genera una diferencia de 23 aminoácidos en la región carboxilo terminal de la enzima. PKM1 es expresada en órganos que requieren una alta generación de energía, tales como músculo y cerebro, mientras que la PKM2 está asociada a tejidos de pulmón, islotes pancreáticos, tejido graso, retina o aquellos cuyas células están en una alta tasa de síntesis de ácidos nucleicos, como células proliferantes, células embrionarias o células tumorales<sup>88-92</sup>.

La piruvato quinasa es usualmente un homotetrámero compuesto de 4 subunidades idénticas y cada subunidad se compone de 4 dominios. PKM2 se puede encontrar en forma de dímero o tetrámero y puede ejercer diferentes funciones dependiendo de la forma en que se encuentre. La PKM2 que se encuentra activa y en su forma tetramérica, tiene una alta afinidad por el sustrato PEP para producir ATP y piruvato, mientras que cuando se encuentra en su forma dimérica, tiene una baja afinidad por el sustrato PEP y su actividad enzimática disminuye<sup>88-93</sup>.

Una célula en división requiere de dos condiciones: energía e intermediarios metabólicos (fosfometabolitos), necesarios como precursores de la síntesis de ácidos nucleicos, amino ácidos y lípidos. La primera condición se ha visto asociada a la oxidación completa de la glucosa a través de la vía glucolítica, bien sea en su culminación por la fermentación láctica o por los procesos de respiración celular; la PKM2 se mantiene en su forma tetramérica, permitiendo un flujo continuo de la vía glucolítica, y de este modo produce ATP y piruvato. La segunda condición se ha visto asociada a la vía de las pentosas fosfatos, y a la producción de fosfolípidos a partir del gliceraldehído 3 fosfato y la producción de serina a partir de glicerato 3 fosfato por la derivación de reacciones de la vía glucolítica; la PKM2 se mantiene en su forma dimérica generando un bloqueo del flujo glucolítico y una acumulación de los intermediarios de la glucólisis que pueden entrar a las diferentes vías de síntesis de precursores. A este tipo de regulación metabólica se le conoce como “*Metabolic budget system*”<sup>93</sup>.

Además de la regulación metabólica que presenta PKM2 en sus formas tetraméricas y diméricas, también se ha visto asociada a múltiples funciones no glucolíticas y a varias proteínas citosólicas y nucleares. Dentro de las proteínas con las que se ha visto involucrada están: “HERC1, A-Raf, cytoplasmic-PML, pantothenate kinase 4, octamer-4, SUMO ubiquitin E3 ligase, thyroid hormone, somatostatin”, entre otras<sup>93</sup>.

## 1.5 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

Las ROS son moléculas derivadas del oxígeno ( $O_2$ ) que pueden oxidar otras moléculas, y pueden estar en forma de radicales libres ( $O_2^-$ : anión superóxido) o como peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ )<sup>94</sup>.

Las especies reactivas de oxígeno ROS tienen un papel fundamental en el desarrollo de cáncer a través de diferentes mecanismos que incluyen: 1) Inducción de daño estructural en el DNA, alteración de oncogenes o genes supresores de tumor; 2) alteración de vías de señalización citoplasmáticas y nucleares; 3) Modulación de la actividad de genes y proteínas que responden a estrés y regulan procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis<sup>95,96</sup>.

Existen varias fuentes de ROS incluyendo: 1) La mitocondria, debido a una disrupción en la cadena de transporte de electrones, en donde la fuga de electrones en los complejos enzimáticos I y III producen  $O_2^-$  y posteriormente  $H_2O_2$ <sup>97</sup>; 2) La membrana plasmática por NADPH oxidasas, lipooxigenasas y en el espacio extracelular por xantina oxidasas; 3) Los peroxisomas, principalmente por oxidación de

ácidos grasos, D-amino oxidasa ácida, L-2 hidroxiaácido oxidasa y urato oxidasa; 4) El citosol, relacionadas con óxido nítrico sintasa, lipooxygenasa; y 5) El retículo endoplásmico (principalmente citocromo P450, enzimas b5, diamino oxidasa y Ero1) <sup>98-100</sup>.

Un aspecto interesante a recalcar es cómo podrían ser incrementados los niveles de ROS a medida que se incrementan el número de células del sistema inmune presentes en el microambiente tumoral. Esto se deduce de la acción citotóxica que ejercen los macrófagos y los linfocitos durante el proceso inflamatorio. Este incremento de ROS va vinculado a la acción de citoquinas que son secretadas al medio extracelular y/o a la inducción de apoptosis por parte de las CMSP <sup>14,101,102</sup>.

Algunos resultados asocian a citoquinas con el incremento de ROS en varios tipos celulares. Por ejemplo, TNF- $\alpha$  incrementa los niveles de ROS mitocondrial en células tumorales, células endoteliales y hepatocitos <sup>103,104</sup>; IL-1 $\beta$  estimula la producción de ROS en células de epitelio pigmentario retinal, células de anemia de Fanconi y hepatocitos <sup>101,105,106</sup>; IFN- $\gamma$  incrementa los niveles de ROS en líneas celulares de linfoblastos <sup>106,107</sup>. A pesar de las evidencias, se desconocen los mecanismos exactos o las vías de señalización por los cuales actúan cada uno de los tipos de citoquinas para generar ROS. Hasta el momento sólo se ha podido discernir que la inducción de ROS por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  es dependiente del complejo II de la cadena de transporte de electrones <sup>101</sup>, mientras que la inducción de ROS por IL-1 $\beta$  está más asociada a las NADPH oxidasas <sup>101</sup>.

El incremento de ROS en el microambiente tumoral, bajo la acción de citoquinas, en niveles tolerables (no citotóxicos) para las células cancerosas, podría contribuir en la modulación del metabolismo celular dirigido hacia glucólisis anaerobia. Esto se infiere del hecho de que las ROS están implicadas en la activación de PI3K, AKT, MAPKp38 y AMPK, las cuales están involucradas en la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  y su translocación al núcleo. Al activarse HIF-1 $\alpha$  se induce la transcripción y expresión del transportador de glucosa GLUT-1 <sup>108</sup>, lo cual favorece la glucólisis anaerobia.

## **1.6 Planteamiento del problema.**

Durante la progresión del cáncer de colon, la inmunoedición y las condiciones de normoxia e hipoxia desencadenan un proceso de selección natural que favorece la adaptación de células de cáncer al ambiente cambiante, que en la mayoría de los casos, está vinculada a la activación de vías de señalización. Dicha activación ocurre tanto en las células del sistema inmune como en las células de cáncer de colon, luego de estímulos autocrinos y paracrinos de citoquinas secretadas al medio. La activación de algunas vías de señalización pueden estar dirigidas, entre otras funciones, a generar cambios metabólicos que dan respuesta a las condiciones cambiantes del microambiente tumoral.

Si bien algunos cambios de las células del sistema inmune durante la inmunoedición han sido estudiados e igualmente existen indicios de que algunas vías de señalización posiblemente estén relacionando a las células del sistema inmune con el metabolismo de las células de cáncer, hasta el momento, no existe ningún trabajo o estudio que evalúe directamente el efecto de la presencia de las células del sistema inmune sobre el metabolismo glucolítico de las células de cáncer de colon y por consiguiente se desconoce si este efecto podría relacionarse con la supervivencia, proliferación y/o resistencia de las células tumorales.

Por tal motivo, con este estudio se busca analizar el efecto que podría tener la presencia de CMSPs sobre el metabolismo glucolítico y la producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS) en células tumorales derivadas de cáncer de colon, en un modelo *in vitro*.

## 1.7 Preguntas de investigación

- ¿Existe algún cambio en la viabilidad y/o apoptosis de la línea de cáncer de colon HT-29 al ser co-cultivadas con células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)?
- ¿Existe algún cambio a nivel metabólico, ya sea en la producción de lactato, captación de glucosa, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o en la expresión de las proteínas asociadas al metabolismo glucolítico, específicamente HK2 y PKM2, en la línea HT-29 bajo la presencia de CMSPs?

## 1.8 Objetivos

### *1.8.1 Objetivo General*

Caracterizar un modelo de co-cultivo entre células de cáncer de colon y Células Mononucleares de Sangre Periférica para el estudio del metabolismo glucolítico y el estrés oxidativo de las células tumorales.

### *1.8.2 Objetivos específicos*

1. Determinar si existen cambios en la viabilidad y apoptosis de las células HT-29 al haber estado co-cultivadas con CMSPs.
2. Determinar si existe un cambio a nivel del metabolismo glucolítico asociado a la producción de lactato, pH extracelular, captación de glucosa o expresión de las proteínas asociadas al metabolismo glucolítico HK2 y PKM2, en las células HT-29 al haber estado co-cultivadas con CMSPs.
3. Determinar si existe algún cambio en el estrés oxidativo asociado a la producción de especies reactivas de oxígeno, en las células HT-29 al haber estado co-cultivadas con CMSPs.

## CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

### 2.1 Modelo de estudio planteado

Para obtener un modelo *in vitro* que se asemeje a la primera etapa de la inmunoedición en el microambiente tumoral se trabajó con la línea celular HT-29 de adenocarcinoma de colon (células tumorales) y con Células Mononucleares de Sangre Periférica (células del sistema inmune).

Se empleó la línea celular HT-29 por ser una línea altamente proliferativa y porque puede reflejar la respuesta inflamatoria asociada a enfermedades inflamatorias del colon que se vinculan con el cáncer de colon. Las CMSP se consideraron por la fácil obtención a partir de sangre de donantes sanos.

En algunos estudios<sup>54,109</sup>, se han evaluado los efectos de varios moduladores sobre la interacción de estos tipos de células (CMSPs y HT-29) a través de co-cultivos celulares. En estos estudios se ha observado que hay un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias cuando se encuentran los dos tipos de células bajo interacción directa y sin ningún estimulante mitogénico<sup>109</sup>. Tomando en cuenta estos trabajos, se planteó realizar co-cultivos directos entre células HT-29 y CMSP para evaluar los posibles cambios sobre el metabolismo glucolítico que presentan las células HT-29. Sin embargo, debido a que no se sabía que cantidad de CMSP podrían ejercer dicho cambio metabólico, se planteó realizar los co-cultivos a diferentes relaciones manteniendo constante el número de células HT29 y variando el número de CMSP. Se optó por emplear el co-cultivo en las relaciones de HT29 a CMSP, respectivamente: 1:0 (HT-29 en monocultivo), 1:½, 1:1, 1:3, 1:5 y 1:10.

### 2.2 Preparación de las CMSPs y HT-29 antes del co-cultivo

#### 2.2.1 Aislamiento y cultivo de CMSPs

Para el aislamiento de las CMSPs las muestras de sangre de donantes sanos, fueron facilitadas por el Hemo-Centro distrital de Bogotá con previa firma del consentimiento informado. Las CMSPs fueron aisladas por centrifugación en gradiente de densidad. Para ello, se realizó una primera centrifugación de la sangre a 738xg por 15 minutos, en aceleración 1 y desaceleración 1, obteniéndose tres fases no muy bien diferenciadas, una superior que es el plasma sanguíneo, una intermedia donde se encuentran las CMSPs y una inferior donde se encuentran eritrocitos. Se realizó una segunda centrifugación utilizando de la primera centrifugación toda la fase intermedia (CMSPs) y parte de la fase superior e inferior. Para la segunda centrifugación se utilizó la solución Ficoll Paque con el fin de generar el gradiente de densidad. En un tubo de polipropileno se colocó la mitad del volumen de Ficoll por volumen de la muestra a utilizar. Cuidadosamente se adicionó la muestra de sangre sobre el Ficoll teniendo cuidado de no mezclar las dos fases. Se centrifugó a 738xg por 45 minutos, con aceleración 1 y desaceleración 0. Después de centrifugar, se obtuvieron cuatro fases bien diferenciadas una superior

(plasma sanguíneo), una capa delgada intermedia de color blanco (CMSPs), una fase transparente (Ficoll) y los eritrocitos en la fase inferior. Cuidadosamente se retiraron las CMSPs y se colocaron en un nuevo tubo de polipropileno. Se adicionaron 10 ml de buffer de lisis de eritrocitos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,155 M,  $\text{KHCO}_3$   $1 \times 10^{-2}$  M, EDTA  $1 \times 10^{-3}$  M, pH 7,4) por 5 minutos con agitación constante. Se centrifugó a 738  $\times g$  por 5 minutos aceleración 9 y desaceleración 9. Se retiró el sobrenadante y se adicionó 30 ml de medio DMEM con 10% de SFB inactivado para mantener las células en suspensión <sup>110,111</sup>.

### 2.2.2. Cultivo de HT-29

La línea celular HT-29 de adenocarcinoma colorectal (ATCC® HTB-38™) se mantuvo en platos de cultivo de 100mm, con medio DMEM suplementado con SFB inactivado al 10%. Para realizar los pases de cultivo, la monocapa de estas células se desprendió con tripsina 0,25%, incubando por 5 minutos a 37°C y deteniendo la acción de la enzima con medio DMEM suplementado con SFB al 10% <sup>112</sup>.

## 2.3 Co-cultivo a diferentes relaciones entre las CMSPs y HT-29

Para iniciar el co-cultivo se sembraron las células HT-29 a una concentración inicial de  $1 \times 10^5$  cel/cm<sup>2</sup>, y se mantuvieron creciendo por 24 horas hasta alcanzar una confluencia cercana al 50%, figura 2. En el día 2 se realizó el aislamiento de las CMSP, se contaron las células aisladas y las células HT-29<sup>113</sup> y se dispuso el co-cultivo con base a las relaciones anteriormente mencionadas, figura 2. Para realizar este paso se debió determinar la concentración de HT29 en el plato o pozo de cultivo y de las CMSP aisladas en suspensión. Se calculó el número total de HT-29 de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left( \frac{\# \text{ células HT29}}{\text{ml}} \right) \times \text{Volumen del pozo} = \text{células HT29 totales}$$

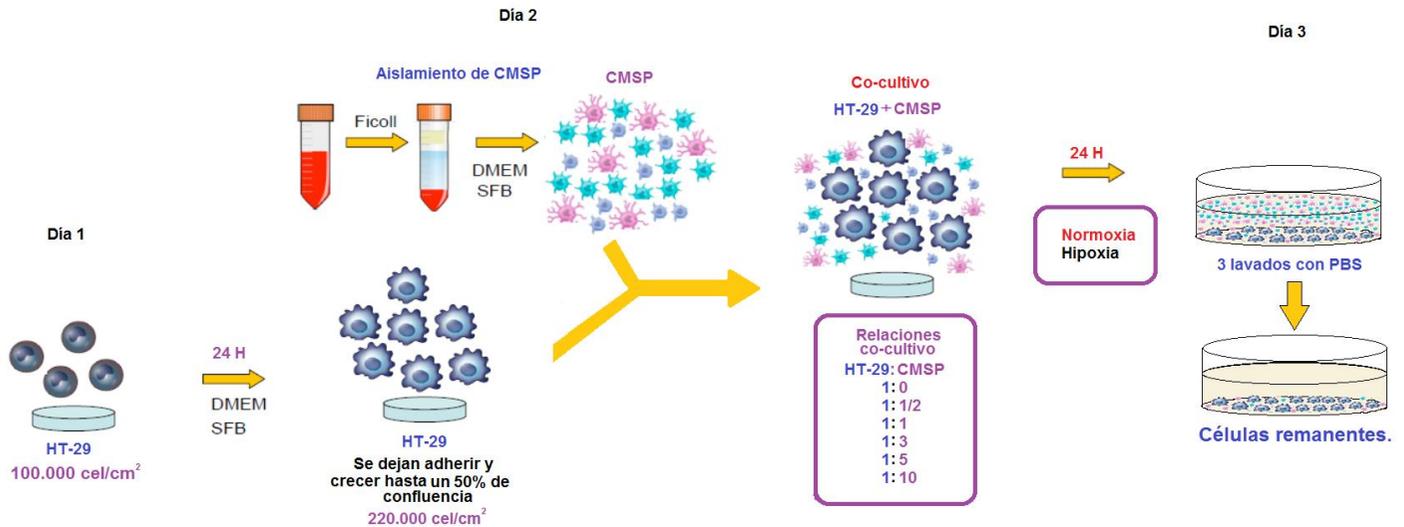
Y a partir de allí se estimó el número de CMSP necesario para cada relación del co-cultivo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\# \text{ Células HT29 totales} \times \text{relación del cocultivo} = \# \text{ CMPS en el cocultivo}$$

Posteriormente, se realizaron diluciones a partir de la concentración inicial de CMSP aisladas y teniendo como base el número estimado de CMSP a utilizar y el volumen del plato o pozo de cultivo a utilizar. De este modo se obtuvo el número de CMSP respectivas a cada relación del co-cultivo en el volumen utilizado por plato o pozo de cultivo.

Después de tener las diluciones, se retiró el medio de cultivo del plato de cultivo donde estaban las células HT-29 y se realizaron 3 lavados con PBS. Se retiró el exceso de PBS y se adicionaron las diluciones de CMSP a las respectivas relaciones del co-cultivo. Luego se colocaron las células por 24 horas en normoxia o hipoxia. En el día 3, se retiraron todas las células en suspensión y se realizaron 3 lavados con PBS, figura 2.

Para los posteriores experimentos se emplearon las células HT-29 que quedaron adheridas a la superficie del plato de cultivo después de los diferentes tratamientos y que en adelante se denominarán **células HT-29 remanentes**.



**Figura 2. Esquema general de la metodología del co-cultivo entre células de la línea celular de cáncer de colon humano HT-29 y CMSP.** En el día 1 se siembran las células HT-29 y se dejan adherir y crecer por 24 horas. Al segundo día se aíslan las CMSPs, se inicia el co-cultivo en las diferentes relaciones y se mantiene en normoxia o hipoxia por 24 horas. En el tercer día se separa el co-cultivo retirando todas las células en suspensión y se realizan 3 lavados con PBS. Las células remanentes que quedan en la superficie del plato de cultivo son las células a evaluar.

### 2.3.1 Inducción de hipoxia:

Las condiciones de hipoxia se indujeron utilizando una cámara aislada (C-Chamber) con una mezcla de O<sub>2</sub> 1% y CO<sub>2</sub> 5%, balanceado con N<sub>2</sub>. Las células se mantuvieron para todos los experimentos en estas condiciones de hipoxia aguda por 24 horas a 37°C<sup>114</sup>. Las concentraciones de gases se regularon con ayuda de un controlador de gases ProOx C-21 (Biospherix).

## 2.4 Metodología para dar respuesta al primer objetivo:

### 2.4.1 Medición del número de células HT-29 remanentes después del tratamiento.

Con el fin de establecer si la interacción entre las células de cáncer de colon y las células del sistema inmune podían simular el primer paso de la inmunoección se evaluó si existían cambios en la cantidad de células HT29 remanentes y en su viabilidad después de los tratamientos. Esto se tomó con base en las descripciones de algunos autores con respecto a la respuesta inmune que se da en modelos de co-cultivos *in vitro* con células alogénicas<sup>60,115,116</sup>.

#### 2.4.1.1. Cuento de células totales remanentes.

Para estimar el efecto de los tratamientos sobre la cantidad de células remanentes, se determinó el número total de células por el método de tinción de exclusión con azul de tripán<sup>113,117,118</sup> Como control

sin tratamiento se utilizó el número de células totales remanentes encontradas en la relación 1:0 en condición de normoxia, de tal manera que el porcentaje de células remanentes pos-tratamiento se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Células remanentes totales pos-t}(\%) = \frac{\# \text{ células remanentes totales pos-t}}{\# \text{ células remanentes totales control}} \times 100$$

La viabilidad de las células HT-29 remanentes se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad}(\%) = \frac{\# \text{ células vivas}}{\# \text{ células vivas} + \text{muertas}} \times 100$$

#### ***2.4.2 Medición viabilidad celular, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis en células HT-29 después del co-cultivo.***

##### **Citometría de flujo.**

A partir de las células remanentes, se determinaron los porcentajes de células vivas y células en los estadios de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis, mediante citometría de flujo empleando marcación con Anexina V e Ioduro de Propidio. Para este ensayo los co-cultivos se dispusieron en cajas de 6 pozos y luego del tratamiento, se retiró el medio y las células remanentes se lavaron tres veces con PBS 1X, se desprendieron con tripsina 0,25%, y se resuspendieron en medio en un tubo de citometría. Se centrifugaron por 5 min a 400xg y el pellet resultante se resuspendió en 300 ul de PBS1X. Para la marcación se emplearon 3 µl de Anexina V conjugada con FITC de *Sigma-Aldrich* y 3 µl de Ioduro de Propidio 1µg/ml por cada tubo. Las células se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos protegidas de la luz. Se determinó la fluorescencia de forma inmediata con un citómetro FACS Canto II, con los canales para Anexina V-FITC (Excitación a 488 nm; Emisión a 530nm), y para Ioduro de Propidio (Excitación a 535nm; Emisión a 617nm), se consideraron 30.000 eventos por tratamiento.

Aparte de las muestras a evaluar, se incluyeron controles positivos de compensación de los marcadores, control positivo de las células en apoptosis temprana inducidas con 5µM de estaurosporina (*Sigma-Aldrich* S5921) por 24 h, control positivo de necrosis inducidas con 100mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 4 h, y un blanco de células vivas sin marcar.

#### ***2.4.3. Estimación del porcentaje de CMSP adheridas a la superficie del plato de cultivo.***

Como el interés era analizar la respuesta metabólica de las células cancerosas y para verificar si los lavados posteriores al tratamiento habían sido exitosos, se decidió estimar la proporción de las CMSP que podrían permanecer adheridas a la superficie del plato de cultivo.

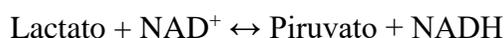
Para estimar el porcentaje de células CMSP que permanecieron adheridas al plato de cultivo después de los tratamientos, se realizaron tinciones de los núcleos con el colorante fluorescente Hoescht (2µg/ml) partiendo de los monocultivos de CMSP y HT-29 además de la relación del co-cultivo con mayor número de CMSP, la relación 1:10 en normoxia. Los análisis de microscopía de fluorescencia se hicieron sobre las células en monocultivo HT-29 y CMSP adheridas, el monocultivo de CMSP en suspensión, además de las HT-29 remanentes después del co-cultivo. También se hizo análisis de

citometría de flujo tomando como referencia el Tamaño vs. Complejidad de los dos tipos celulares en monocultivo o en co-cultivo en la relación 1:10. Para el análisis de citometría el *gate* se estableció teniendo en cuenta los bordes de las poblaciones de CMSP en el monocultivo y de las HT-29 en el monocultivo, con esto se fijaron las líneas límites para distinguir entre las poblaciones observadas en el co-cultivo en la relación 1:10 en normoxia.

## **2.5 Metodología para dar respuesta al segundo objetivo:**

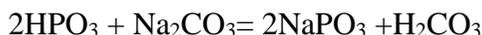
### ***2.5.1 Medición de la producción de lactato.***

La producción de lactato secretado al medio extracelular se detectó de manera indirecta a través de la reacción enzimática de la Lactato deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la oxidación de lactato a piruvato, con la reducción concomitante de  $\text{NAD}^+$  a NADH.



Dado que la reacción es 1 a 1, el NADH producido es proporcional a la cantidad de lactato que se encuentre en el medio. El producto NADH fue cuantificado a través de la medición de compuestos de formazán detectados por colorimetría <sup>119</sup>. Para este ensayo se empleó el *kit* II de ensayo de lactato (Sigma-Aldrich, MAK065).

Para preparar las muestras se tomó el sobrenadante platos de cultivo de 100mm a las 24 h de haber estado en co-cultivo, se trasladó a tubos cónicos de polipropileno y se centrifugó a 400xg por 5 min. El sobrenadante se trató con ácido metafosfórico 0,5M y se centrifugó a 10.000xg con el fin de remover todas las proteínas que puedan alterar el ensayo. Luego se tomó el sobrenadante y se neutralizó el pH de la muestra con carbonato de sodio 2,8M teniendo como base la siguiente reacción:



Después de tener el sobrenadante purificado y a pH 7,4, se depositaron 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra en los pozos de una placa de 96. Luego se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla que contenían un buffer de ensayo de lactato proporcionado por el *kit*, el  $\text{NAD}^+$  en exceso, la enzima lactato deshidrogenasa y las sales de tetrazolio. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se cuantificaron los complejos de formazán por absorbancia a 450 nm. Posteriormente, se estableció la concentración de lactato en el medio extracelular a partir de una curva de calibración realizada con patrones suministrados por el *kit*, ver Capítulo 7, Anexo 7.1.

### ***2.5.2 Medición de la captación de glucosa.***

Después del co-cultivo, las células se lavaron tres veces con PBS y se les adicionó 500  $\mu\text{l}$  de una mezcla entre Hoechst 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  y sonda 2-NBDG (2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-ylamino-2-deoxyglucosa) 300 $\mu\text{M}$ , una forma fluorescente y no metabolizable de la glucosa. En oscuridad, se incubó a 37° C durante 50 minutos en normoxia o hipoxia. El exceso de sonda se retiró con 3 lavados con PBS y se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo para la adquisición de imágenes de fluorescencia. Se tomaron 3 imágenes por pozo, de tres réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas para cada tratamiento. Posteriormente las imágenes se analizaron con un *plugin* diseñado para el software image J, en el cual

se restó el *background* de las células, se identificaron las células a partir del núcleo y se midió la fluorescencia de toda la célula<sup>120</sup>.

### **2.5.3 Evaluación de la expresión de los genes *HK2* y *PKM2*, por western blot.**

El co-cultivo se realizó en platos de 100mm y después de los respectivos tratamientos, las células se lavaron con PBS 1X. Las células se lisaron con 500 µl de Buffer RIPA (Radio immunoprecipitation assay buffer) que contenía: Tris-HCl (Tris base-Ácido Clorhídrico) pH 7,4 50mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 0,5%, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Ortovanadato de sodio) 10mM y cocktail inhibidor de proteasas (Bio-Rad®) y empleando un raspador de células por 5 minutos en frío. El lisado celular se centrifugó a 8500xg por 5 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso. Se tomó una alícuota para la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico.

### **2.5.4 Cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA)**

Para determinar la concentración de proteína se empleó el kit “Pierce™ BCA Protein Assay” de Thermo Fisher. A 10 µl del extracto proteico o del blanco (PBS) se adicionaron 200 µL de solución de trabajo (50 partes de reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1 M) y 1 parte de reactivo B (Sulfato cúprico 4%) y se incubó por 30 min a 37°C en placa de 96 pozos. Posteriormente se hizo la lectura de absorbancia en el Equipo lector de multiplacas de lectura multi-modo Cytation 3 Imagine Reader (BioTek®) (λ: 562 nm) y la concentración de proteína se determinó empleando una curva de calibración construida con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina.

### **2.5.5 Inmunoblot**

Se determinó el volumen necesario de extracto celular para obtener 60 µg de proteína. Se prepararon geles de 1,5 mm de ancho a una concentración del 7% de bisacrilamida para realizar SDS PAGE. Se corrió la electroforesis SDS PAGE a 120 V por 2 horas o hasta observar una separación suficiente de las bandas de 35 y 55 kDa. Después de la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), a un voltaje de 30 V durante toda la noche. La inmunodetección se dirigió contra las proteínas HK2 (102 kDa), PK-M2 (58 kDa) y como control de carga β actina (42 kDa). Para HK2 se bloqueó con leche al 5% por 2 horas, luego se incubó toda la noche con anticuerpo primario policlonal hecho en cabra dirigido contra HKII (Santa Cruz Biotechnology HXK II (C-14): sc-6521) en una dilución 1:500 en leche al 2%. Para PKM2 se bloqueó con leche al 5% por 2 horas, luego se incubó toda la noche con anticuerpo primario policlonal hecho en conejo dirigido contra PKM2 (Cell Signaling #3198) en una dilución 1:1000 en leche al 2%. Para β actina se bloqueó con BSA 3% por 2 horas, luego se incubó por 2 horas con anticuerpo primario monoclonal hecho en ratón dirigido contra β actina (Santa Cruz Biotechnology β-actin (C-4): sc-47778) en una dilución 1:5000 en BSA al 1%. Los anticuerpos secundarios empleados respectivamente fueron: Anti-cabra IgG conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific) a una dilución 1:5000, Anti-conejo conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific) a una dilución 1:10000, Anti-ratón conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific) a una dilución 1:5000. Para la detección de las bandas se empleó el kit de sustrato quimioluminiscente para la detección de HRP (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate).

## **2.6 Metodología para dar respuesta al tercer objetivo:**

### ***2.6.1 Medición de la producción de especies reactivas de oxígeno.***

Para determinar la producción celular de ROS se empleó el marcador fluorogénico diacetato de 5(6)-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceína (H2DFCDA) del *kit* Image-iT™ LIVE Green ROS Detection (Invitrogen). El marcador fluorogénico Carboxy-H2DCFDA es una forma acetilada de la fluoresceína, la cual es usada como un indicador general de especies reactivas de oxígeno. Esta molécula no fluorescente es fácilmente convertida a una forma verde fluorescente por la oxidación con ROS. Para corroborar que la fluorescencia observada se debe a la generación de especies reactivas de oxígeno se empleó como antioxidante N-acetilcisteína (5mM), 2 horas antes de desmontar el co-cultivo.

Para este ensayo el co-cultivo se dispuso en placas de 12 pozos. Pasadas 24 horas, las células del co-cultivo se separaron y a las tumorales remanentes se les adicionaron 400 µl de Carboxy-H2DCFDA 1,0µM en PBS por pozo, se incubó protegiendo de la luz a 37°C por 30 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X, las células se lisaron con Buffer RIPA y después de centrifugar, el sobrenadante se trasladó a una placa negra de lectura de 96 pozos. La fluorescencia se evaluó por fluorometría en el equipo lector de multiplacas de lectura multi-modo Cytation 3 Imagine Reader (BioTek®) a un  $\lambda$  de excitación de 492nm y un  $\lambda$  de emisión de 527nm. Los resultados de fluorescencia obtenidos fueron normalizados por microgramo (µg) de proteína, empleando para su cuantificación el método del ácido bicinonínico.

Para comparar entre réplicas biológicas, primero se estimó las veces de cambio de las especies reactivas de oxígeno con relación al control (relación 1:0 en normoxia) y luego se realizó el promedio de las veces de cambio entre las réplicas biológicas.

### **2.7 Análisis estadístico:**

Para conocer si existían diferencias significativas entre los tratamientos se aplicaron pruebas t de *student* en todos los experimentos que cumplieran con los criterios de normalidad de los datos. En caso de no cumplir el supuesto de normalidad se aplicaba la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Para los diferentes experimentos se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas por tratamiento evaluado, a excepción de los ensayos de citometría en el cual se realizaron 4 réplicas biológicas y la medición de la concentración de lactato extracelular en el cual se realizaron 2 réplicas técnicas y 2 réplicas biológicas. El análisis estadístico se realizó con el software JMP.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

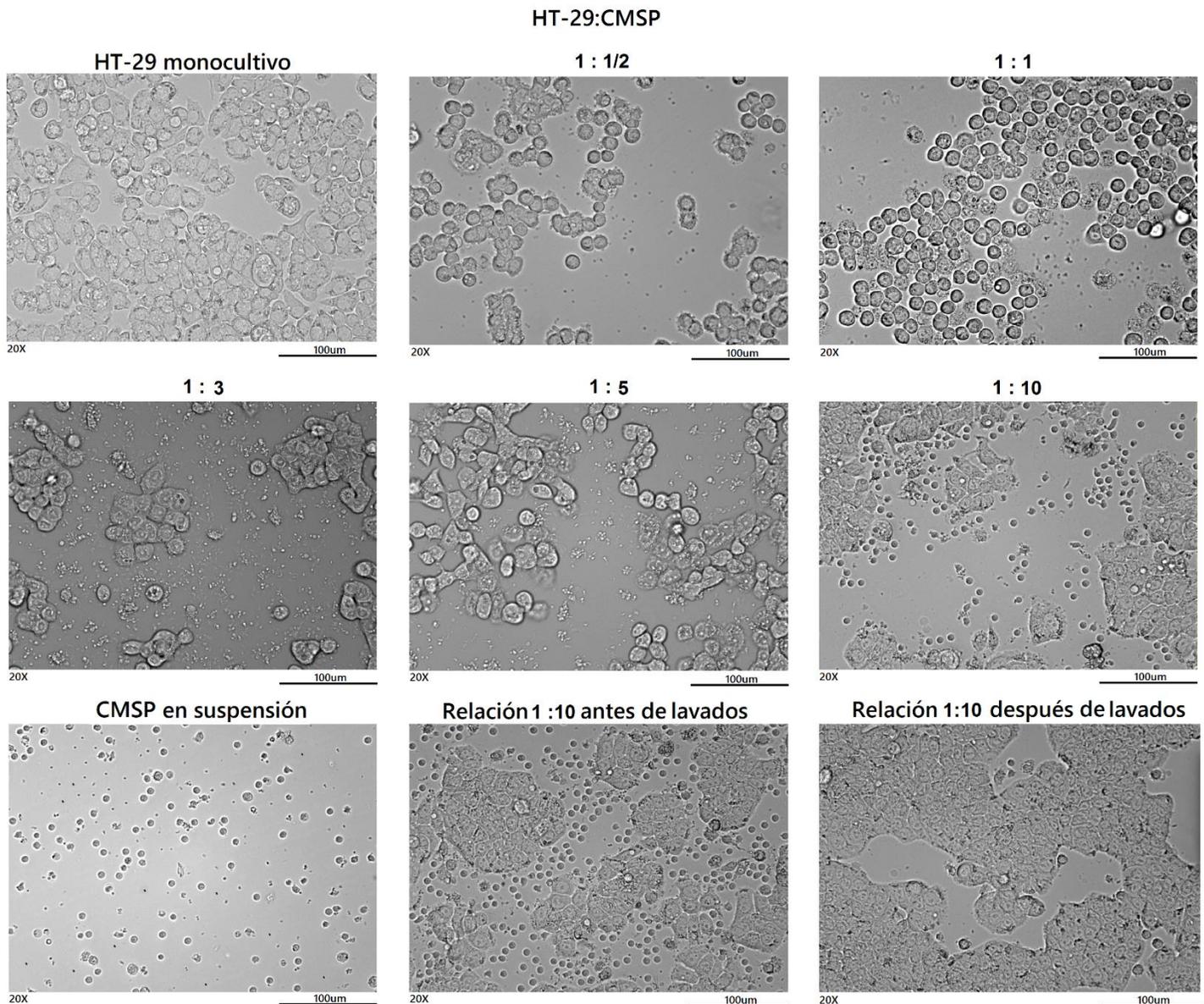
### 3.1 Cambios en la cantidad de células remanentes y en su viabilidad celular.

Aunque existe un trabajo que ha desarrollado co-cultivos directos entre células HT-29 y PBMCs<sup>54,109</sup>, en dicho trabajo no se realizó una variación en el número de CMSP en el co-cultivo sino el número de células HT-29. Esto implica que no se ha observado el efecto de la variación de la cantidad de CMSP sobre las células HT-29. Por tal motivo dado que se desconocía el efecto de la variación del número de las CMSP, se planteó realizar co-cultivos directos a diferentes relaciones, manteniendo constante el número de células HT-29 y variando el número de CMSP. Por lo tanto, se establecieron las siguientes relaciones de co-cultivo (HT-29:CMSP): 1:0 (HT-29 en monocultivo), 1:½, 1:1, 1:3, 1:5 y 1:10.

La Figura 3 muestra por microscopía de luz, las células en las diferentes relaciones del co-cultivo después de 24 horas de haber estado en normoxia y previo a realizar los lavados con PBS. Al retirar el medio de cultivo y al realizar los lavados con PBS, se logró retirar una gran cantidad de CMSP que se mantenían en suspensión. También se observó que a mayores relaciones de cultivo, se favorecía el desprendimiento de las células tumorales y por consiguiente quedaban menos células remanentes en el plato.

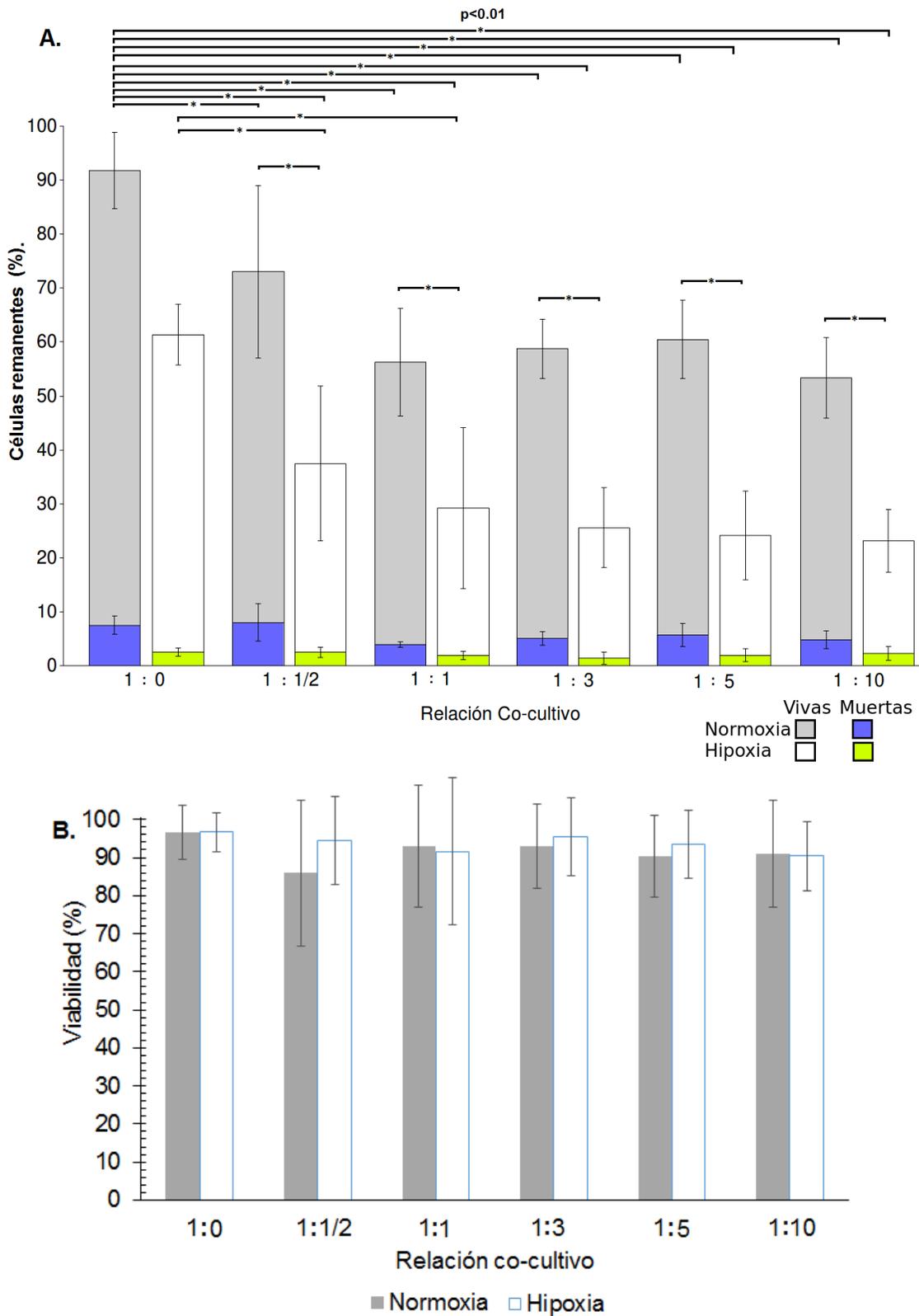
A partir de esta observación y teniendo en cuenta que el objetivo del trabajo era trabajar con las células HT-29 remanentes, se quiso determinar su número en cada relación de co-cultivo. De este análisis se observó que al incrementar el número de CMSP y por consiguiente la relación en el co-cultivo, el porcentaje de células HT-29 remanentes disminuyó de manera significativa ( $p < 0.01$ ) con respecto al control en normoxia y con mucha más relevancia en las condiciones de hipoxia, figura 4A. También se observó que los niveles de células muertas oscilaban entre el 3 y 10% para todos los tratamientos. A medida que se aumentaba la cantidad de CMSP se reducía el número de células HT-29 remanentes vivas. En normoxia se observó que el número de células remanentes vivas pasó de un 90% en las células HT-29 en monocultivo a un 50% en la relación 1:10. En hipoxia pasó de un 60% en las células HT-29 en monocultivo a un 20% en la relación 1:10, Figura 4A.

Este resultado sugiere que el contacto de las CMSP genera una respuesta por parte de las células del sistema inmune sobre las células de cáncer de colon HT-29, que trae como consecuencia el desprendimiento de las células HT-29, lo que podría sugerir un efecto citotóxico o la posible inducción de la muerte de las células tumorales, condición que se ve agravada por la baja disponibilidad de oxígeno.



**Figura 3. Imágenes en campo claro de las diferentes relaciones del co-cultivo entre HT-29 y CMSP.** Diferentes relaciones del co-cultivo entre HT29 y CMSPs, antes de ser retirado el medio de cultivo y de realizar los lavados respectivos. En la última fila se muestran las CMSP en suspensión; la relación 1:10 antes de retirar el medio y lavar con PBS; y el co-cultivo a la misma relación después de lavar con PBS.

Con relación al porcentaje de viabilidad de las células remanentes, Figura 4B, se observó que para los distintos tratamientos había en promedio entre un 80 a 90% de viabilidad sin que se observaran diferencias significativas entre ellos. Esto sugiere que a pesar del efecto de desprendimiento, asociado a la cantidad de CMSP y la hipoxia, la pequeña fracción de células remanentes conserva su viabilidad. Sin embargo, dado que el método de azul de tripán es un método de tinción por exclusión en el que solo se distinguen las células muertas que tengan disrupción de la membrana plasmática, este resultado no sugiere si de las células remanentes hay algún porcentaje que esté en algún estadio de apoptosis.



Con el fin de evaluar con mayor detalle los cambios en las células HT-29 remanentes inducidos por la presencia de las CMSP y la hipoxia, en cuanto a la viabilidad y el tipo de muerte celular que se pudiese estar presentando, se realizaron ensayos de citometría de flujo empleando como marcador de apoptosis temprana Anexina V y como marcador de necrosis, Ioduro de Propidio. Un doble marcaje entre Anexina V e Ioduro de Propidio indica apoptosis tardía.

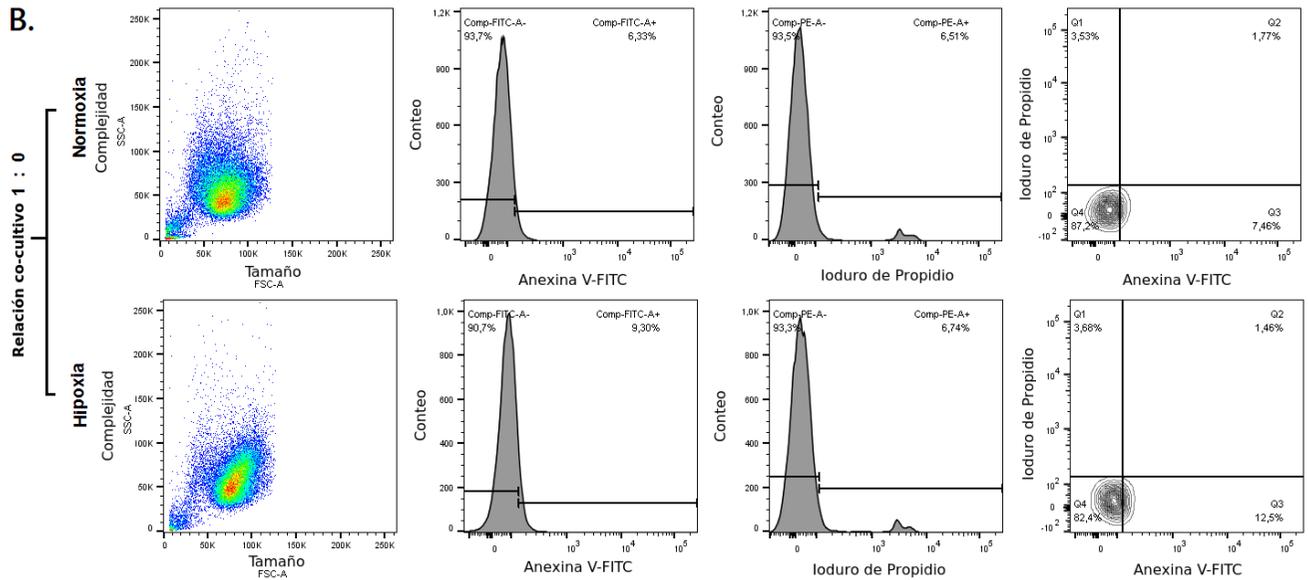
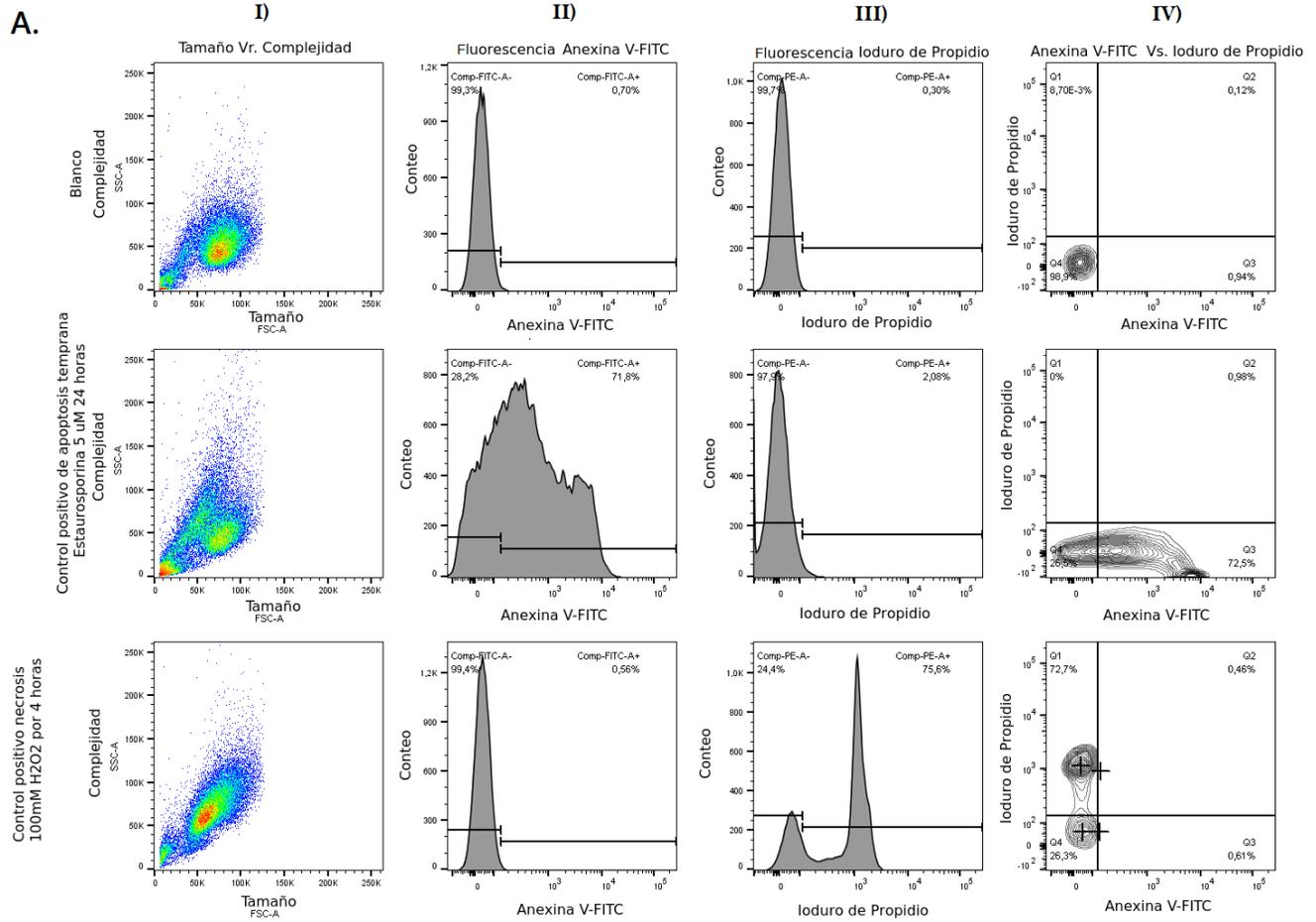
En los ensayos de citometría, para cada tratamiento se evaluó el tamaño vs. la complejidad (I), la intensidad de fluorescencia de Anexina V (II), la intensidad de fluorescencia de Ioduro de Propidio (III) y la intensidad de fluorescencia de Anexina V vs. la intensidad de fluorescencia de Ioduro de Propidio (IV), Figura 5.

Se consideraron tres controles en el monocultivo de HT-29 en condiciones de normoxia: un blanco o control negativo sin ningún marcaje usado para fijar el *gate* y poder determinar desde qué punto comienzan las células a ser fluorescentes debido a los tratamientos; un control positivo para apoptosis temprana en el cual se empleó estaurosporina, 5 uM por 24 horas; y un control positivo para necrosis, en el cual se empleó peróxido de hidrógeno, 100mM por 4 horas, Figura 5A.

El resultado para las células remanentes en las diferentes relaciones de co-cultivo en condiciones de normoxia e hipoxia se muestran desde la Figura 5B hasta la Figura 5G.

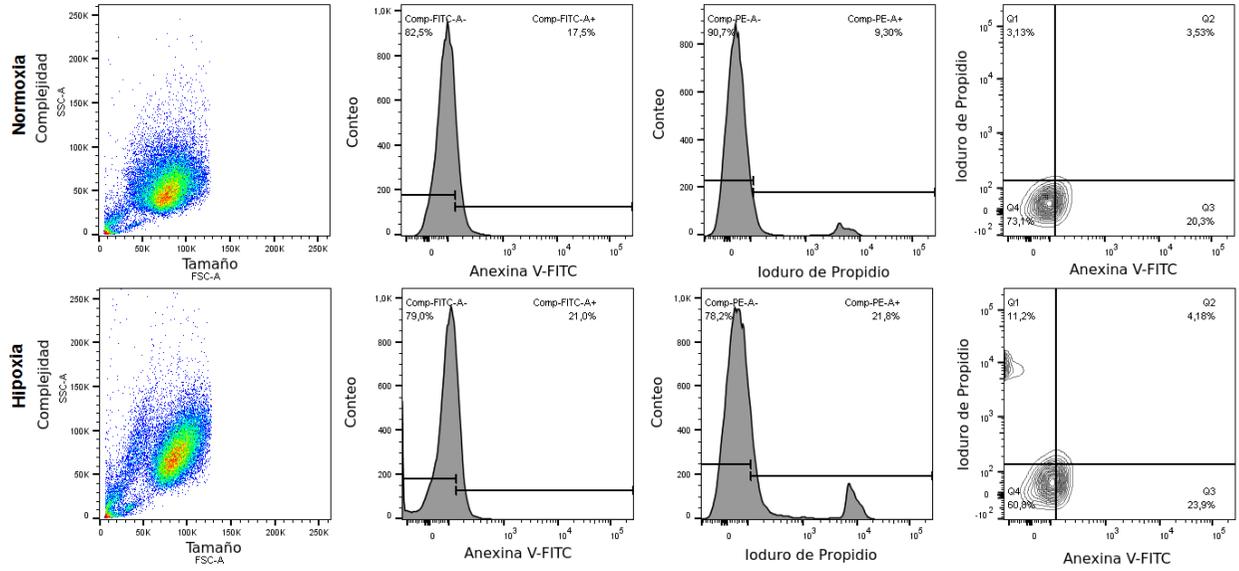
Una vez establecido el *gate*, se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia para Anexina V, en las células que se estimularon con estaurosporina demostrando el estado de apoptosis temprana inducida por el tratamiento. De igual manera se observó la inducción de necrosis en las células estimuladas con peróxido de hidrógeno para cerca del 76% de la población, Figura 5A.

Al analizar los resultados sobre las células remanentes en las diferentes relaciones del co-cultivo, se observó que al incrementar el número de CMSP, había una disminución en el porcentaje de células vivas y un incremento en los niveles de fluorescencia para apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis, tanto en normoxia como en hipoxia, Figura 5B-5G.



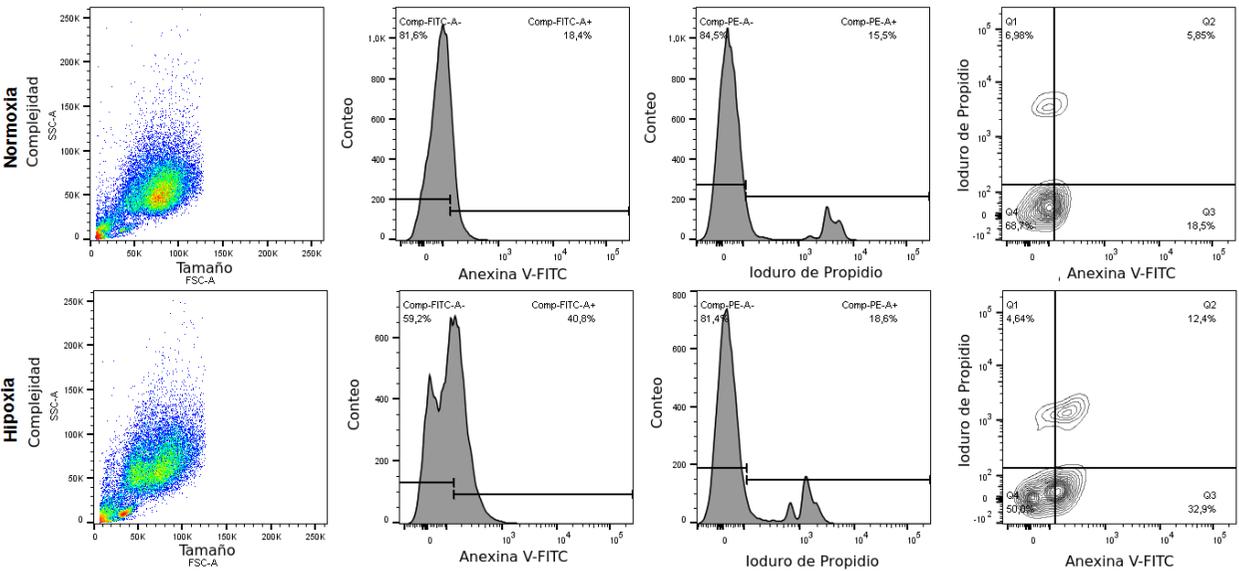
**C.**

Relación co-cultivo 1 : 1/2



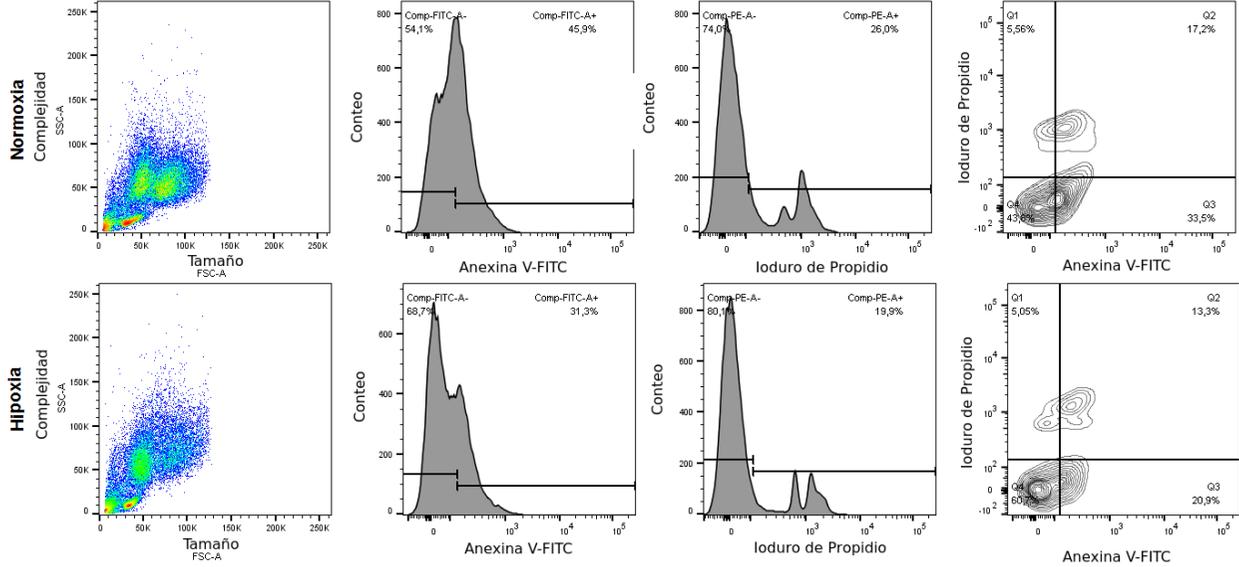
**D.**

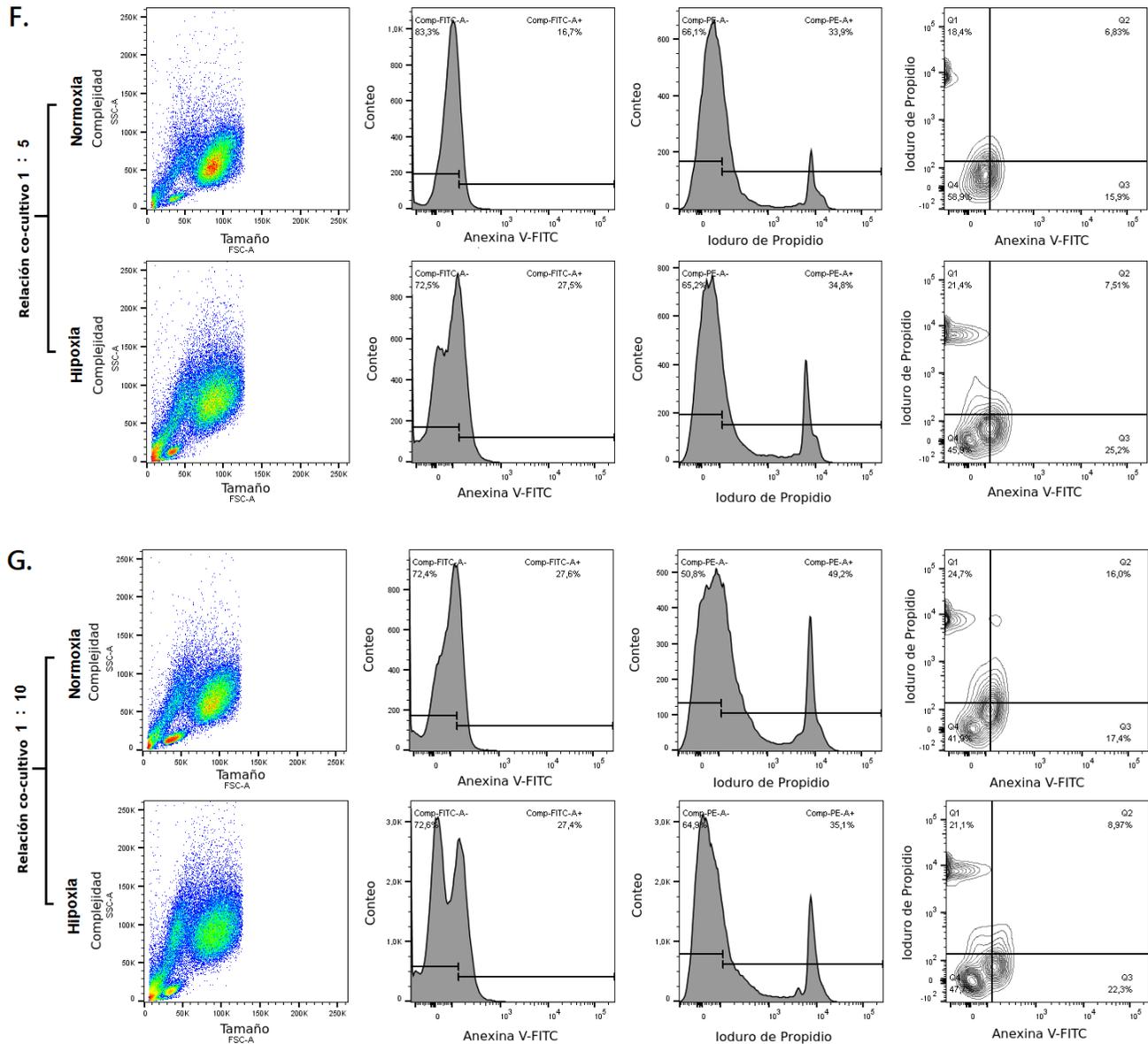
Relación co-cultivo 1 : 1



**E.**

Relación co-cultivo 1 : 3





**Figura 5. Determinación de los diferentes estadios de viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis por citometría de flujo y marcación con Anexina V y Ioduro de Propidio para una de las réplicas biológicas evaluadas. A.** Controles: negativo o blanco, co-cultivo sin marcaje; control positivo para apoptosis temprana, estaurosporina (5  $\mu$ M) por 24 horas en monocultivo de células HT-29 en normoxia; control positivo para necrosis,  $H_2O_2$  (100mM) por 4 horas en monocultivo de células HT-29 en normoxia. **B.** Relaciones de co-cultivo 1:0 (monocultivo HT29); **C.** 1:1/2, **D.** 1:1, **E.** 1:3, **F.** 1:5 y **G.** 1:10, en normoxia e hipoxia **I)** Tamaño vs. Complejidad de las células remanentes para los diferentes tratamientos. **II)** Intensidad de fluorescencia de Anexina V. **III)** Intensidad de fluorescencia de Ioduro de Propidio. **IV)** Intensidad de fluorescencia de Anexina V vs. Intensidad de fluorescencia de Ioduro de Propidio.

La Figura 6A muestra en diagramas de barras para cada condición del co-cultivo el promedio de los porcentajes obtenidos en la citometría de 4 réplicas biológicas. Para el monocultivo en hipoxia se observó una ligera disminución en la viabilidad celular que no fue significativa con respecto al monocultivo en normoxia y se evidenció un incremento del 7% del número de células en apoptosis temprana. Los niveles de apoptosis tardía y necrosis se mantuvieron similares tanto para normoxia como para hipoxia.

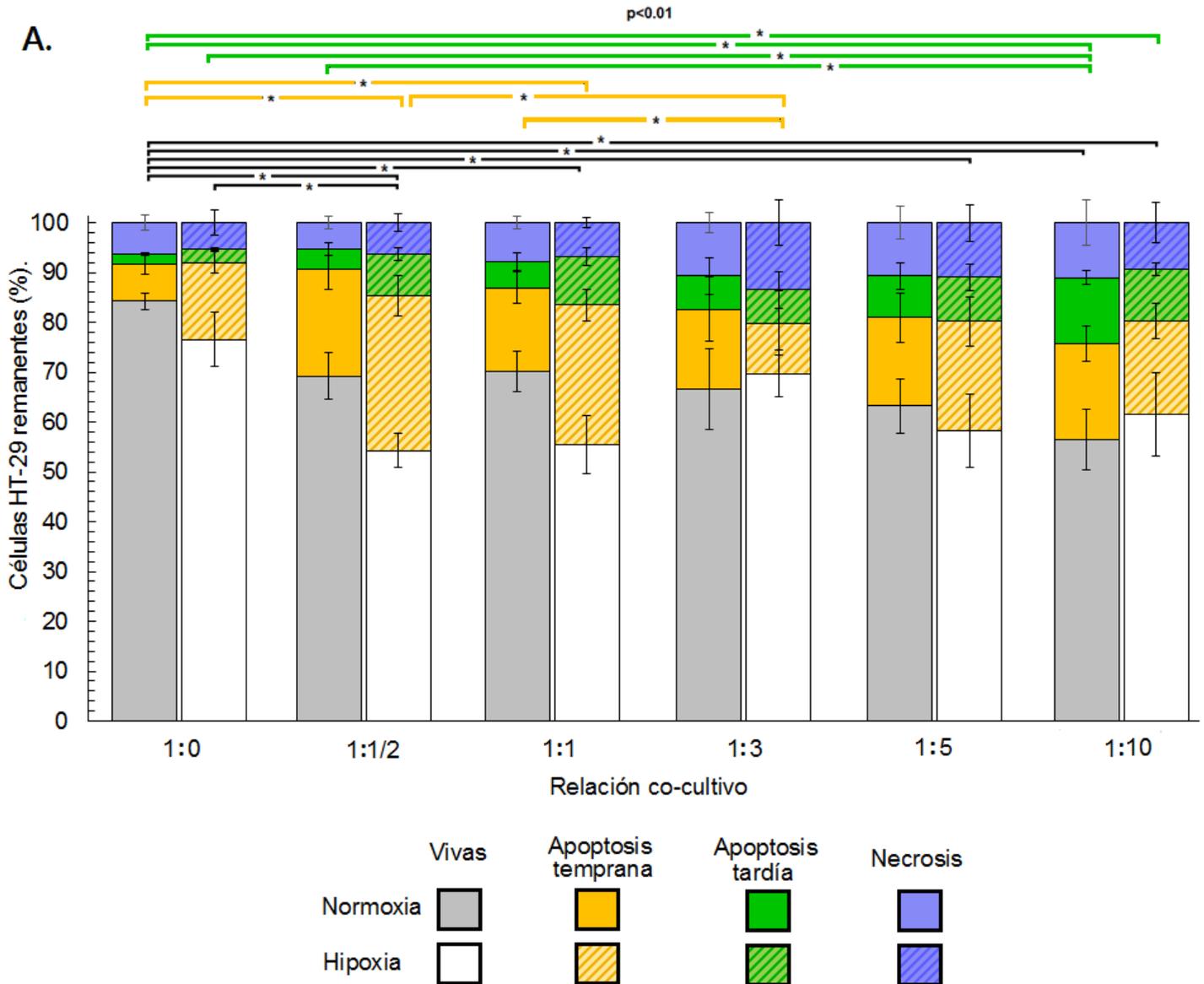
Para las relaciones 1:½ y 1:1 se observó una disminución de la viabilidad entre un 15 a 20% comparado con el monocultivo en normoxia, esta disminución fue significativamente ( $p < 0.01$ ) más notoria para hipoxia que para normoxia. También, se observó un incremento del 10% en el porcentaje de células en apoptosis temprana para normoxia y un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de un 15% en hipoxia. Los niveles de apoptosis tardía aumentaron ligeramente comparado con los niveles de apoptosis tardía en las células en monocultivo; este aumento fue más notorio para hipoxia con un 8% que para normoxia 3%. Para estas relaciones los porcentajes de células necróticas se mantuvieron constantes, Figura 6A y 6B.

Para la relación 1:3 se observó una disminución de la viabilidad del 15% comparado con el monocultivo en normoxia. Dicha disminución fue muy similar tanto para normoxia como para hipoxia. Con relación a la apoptosis temprana se observó un incremento del 9% en normoxia comparado con el monocultivo en normoxia, sin embargo, los niveles de células en apoptosis temprana en hipoxia se mantuvieron semejantes al monocultivo en normoxia. Los niveles de apoptosis tardía aumentaron un 4% comparado con las células en monocultivo en normoxia; este aumento fue igual tanto para normoxia como para hipoxia. El porcentaje de células necróticas para esta relación aumento un 5% para normoxia y un 3% para hipoxia con respecto a las células en monocultivo en normoxia, Figura 6A y 6B.

Para las relaciones 1:5 y 1:10 se observó una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) en la viabilidad entre el 20 y 25% pero no se observaron diferencias entre normoxia e hipoxia. Los porcentajes de células en apoptosis temprana para estas relaciones se incrementó entre un 10 y 15% con respecto a las células en monocultivo en normoxia, además, no se observó diferencias entre normoxia e hipoxia. Con relación al porcentaje de células en apoptosis tardía se observó un incremento entre un 7 y 12% con respecto al monocultivo en normoxia, para este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre normoxia e hipoxia, pero sí se observaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre la relación 1:10 y el monocultivo en normoxia. El porcentaje de células necróticas para estas relaciones aumentó un 5% tanto para normoxia como para hipoxia con respecto al monocultivo en normoxia, Figura 6A y 6B.

Si se comparan los diferentes estadios (viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis) en la misma relación del co-cultivo, se aprecia que en general para todas las relaciones el porcentaje de células vivas es significativamente ( $p < 0.001$ ) mayor que el porcentaje de los diferentes estadios de muerte celular. Interesantemente, los porcentajes de apoptosis temprana son significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores que los porcentajes de apoptosis tardía o necrosis en las relaciones bajas, 1:½ y 1:1. Para las relaciones altas, 1:3, 1:5 y 1:10, los porcentajes de los diferentes estadios de muerte celular tienden a equipararse entre sí, Figura 6A y 6B.

En general los resultados de citometría mostraron un incremento en los diferentes estadios de muerte celular de las células HT-29 a medida que se incrementaban las CMSP tanto en normoxia como en hipoxia. Sin embargo, es de notar que para las relaciones bajas del co-cultivo 1:½ y 1:1 la presencia de las CMSP en hipoxia estimula la apoptosis temprana en las células HT-29, mientras que en las relaciones más altas 1:3, 1:5 y 1:10 podría estar más asociado a un efecto de inducción de la apoptosis tardía y necrosis.



## B.

| Cambios en viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis para cada relación del co-cultivo. |       |       |       |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Relación co-cultivo   | 1:0   | 1:1/2 | 1:1   | 1:3   | 1:5   | 1:10  |
| <b>Vivas normoxia</b>   |       |       |       |       |       |       |
| Porcentaje de células   | 84,27 | 69,24 | 70,08 | 66,61 | 63,24 | 56,45 |
| Error estándar  | 1,62  | 4,76  | 4,05  | 8,06  | 5,51  | 6,07  |
| <b>Vivas hipoxia</b>  |       |       |       |       |       |       |
| Porcentaje de células   | 76,56 | 54,28 | 55,53 | 69,69 | 58,19 | 61,54 |
| Error estándar  | 5,49  | 3,50  | 5,85  | 4,70  | 7,39  | 8,33  |
| <b>Apoptosis temprana normoxia</b>  |       |       |       |       |       |       |
| Porcentaje de células   | 7,48  | 21,31 | 16,89 | 16,07 | 17,68 | 19,29 |
| Error estándar  | 2,13  | 4,06  | 3,17  | 6,50  | 4,93  | 3,58  |
| <b>Apoptosis temprana hipoxia</b>   |       |       |       |       |       |       |
| Porcentaje de células   | 15,47 | 30,96 | 28,03 | 10,15 | 22,05 | 18,70 |
| Error estándar  | 6,02  | 3,56  | 3,27  | 5,10  | 5,39  | 5,19  |
| <b>Apoptosis tardía normoxia</b>  |       |       |       |       |       |       |
| Porcentaje de células   | 1,99  | 4,12  | 5,23  | 6,65  | 8,34  | 13,23 |
| Error estándar  | 0,21  | 1,22  | 1,80  | 3,71  | 2,67  | 1,32  |
| <b>Apoptosis tardía hipoxia</b>   |       |       |       |       |       |       |
| Porcentaje de células   | 2,70  | 8,38  | 9,61  | 6,72  | 8,88  | 10,40 |
| Error estándar  | 1,07  | 2,10  | 2,84  | 3,44  | 1,20  | 1,89  |
| <b>Necrosis normoxia</b>  |       |       |       |       |       |       |
| Porcentaje de células   | 6,26  | 5,33  | 7,80  | 10,68 | 10,73 | 11,03 |
| Error estándar  | 1,47  | 1,17  | 1,25  | 2,12  | 3,21  | 4,66  |
| <b>Necrosis hipoxia</b>   |       |       |       |       |       |       |
| Porcentaje de células   | 5,27  | 6,38  | 6,83  | 13,44 | 10,88 | 9,36  |
| Error estándar  | 2,47  | 1,75  | 1,09  | 4,56  | 3,69  | 3,99  |

**Figura 6. Cambios en viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis para cada relación del co-cultivo.**  
**A.** Diagrama de barras donde se muestra el cálculo del promedio de los porcentajes obtenidos por citometría de flujo de 4 réplicas biológicas. Marcación con Anexina V/ Ioduro de propidio para cada una de las relaciones del co-cultivo, en condiciones de normoxia e hipoxia. n=4 t de student, \* = p value < 0.01. **B.** Tabla de datos para la construcción de la parte A.

### ***3.2 Estimación del porcentaje de CMSP adheridas a la superficie del plato de cultivo.***

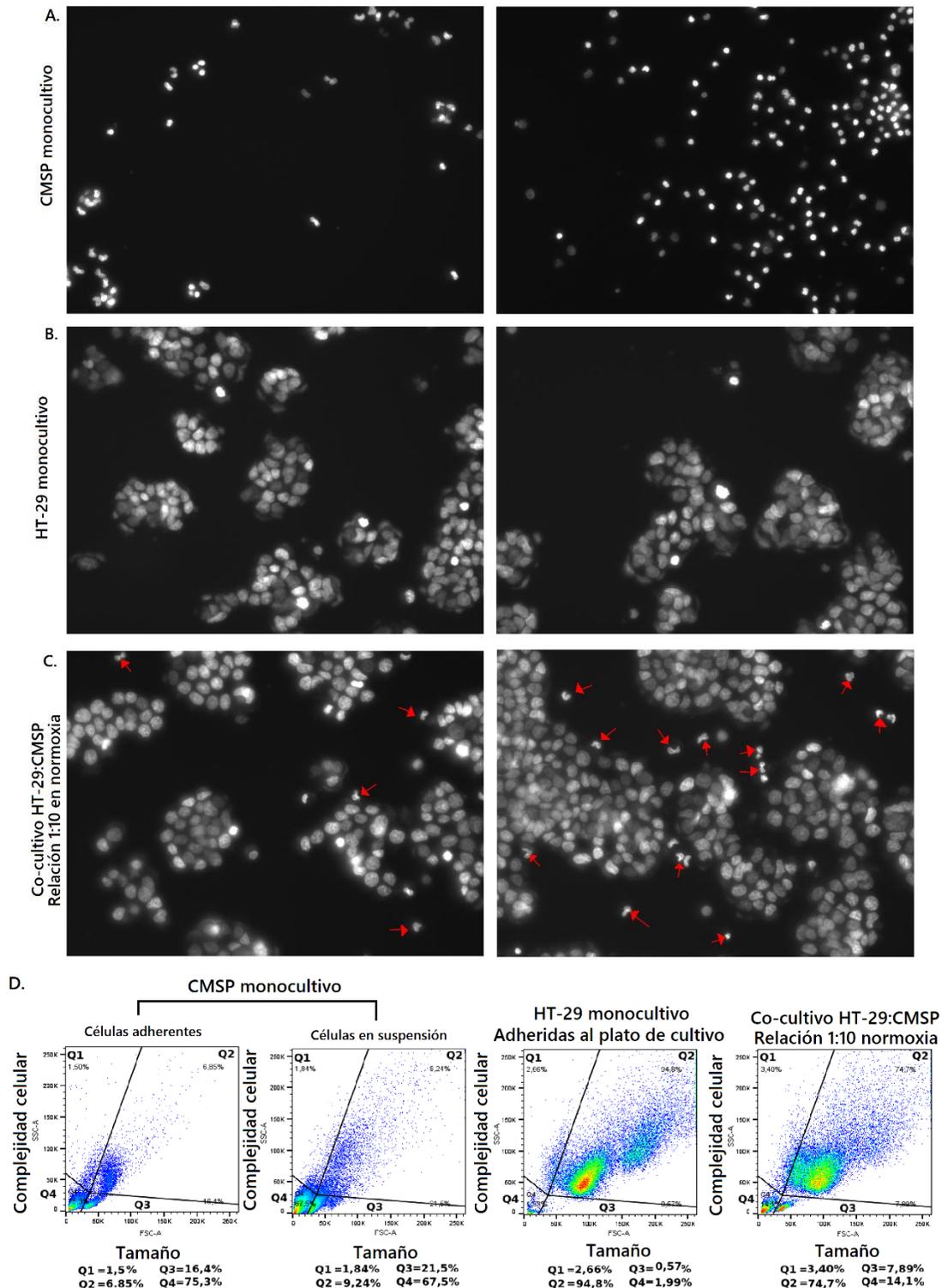
Como el interés era analizar la respuesta metabólica de las células cancerosas y para verificar si los lavados posteriores al tratamiento habían sido exitosos, se decidió estimar la proporción de las CMSP que podrían permanecer adheridas a la superficie del plato de cultivo. Para ello se tomaron fotografías de fluorescencia de los monocultivos de las CMSP y las HT-29 y del co-cultivo en la relación más alta (1:10) habiendo marcado los núcleos con Hoechst.

Se observó que el tamaño de las células HT-29 y las CMSP eran lo suficientemente distintos para distinguirlas entre sí (ver Figura 3 y 7). En el monocultivo de las CMSP, se observó una notable proporción de células adheridas al plato luego de 24 horas de cultivo, Figura 7A. Igualmente con el monocultivo de las células HT-29, se observó una confluencia del 50%, Figura 7B. Sin embargo, al co-cultivar las células HT-29 y las CMSP se observó una baja proporción de CMSP adheridas a los espacios en los que no había HT-29, Figura 7C.

Adicionalmente, esta adherencia se estimó de manera semicuantitativa por citometría de flujo observando el Tamaño vs. La Complejidad de los monocultivos y el co-cultivo anteriormente mencionados, Figura 7D.

Los resultados de este experimento dejaron ver la presencia de varias poblaciones de células en el co-cultivo, por lo que se determinó el porcentaje de células en cada una de ellas. A partir de esto, por el tamaño de las células, se observó que las CMSP se concentraban en los subgrupos Q3 y Q4, aunque no se puede descartar que el aporte de Q4 corresponda también al aumento de detritos celulares derivado de la acción inmune; las células HT-29 por su parte, se concentraban en el sub-grupo Q2. Con esta información se logró determinar que para la relación del co-cultivo 1:10 (la relación donde hay más CMSP), había entre un 10-20% de células CMSP adheridas al plato de cultivo y detritos celulares, Figura 7D. Aproximadamente el 80% de las células restantes eran HT-29, Figura 7D.

Con estos dos resultados se puede esperar que los posibles cambios metabólicos evaluados en las células adherentes principalmente provengan de las células HT-29 y no de las CMSP adheridas al plato.



**Figura 7. Estimación del porcentaje de CMSP adheridas a la superficie del plato de cultivo.** **A.** Tinción de núcleos con Hoechst del monocultivo de CMSP que permanecieron adheridas al plato de cultivo, en normoxia. **B.** Tinción de núcleos con Hoechst del monocultivo de HT-29, en normoxia. **C.** Tinción de núcleos con Hoechst de las células HT-29 y CMSP remanentes, relación 1:10 en normoxia. Las flechas rojas indican los posibles núcleos de las CMSP que se adhieren a la superficie del plato de cultivo. **D.** Citometría de flujo observando el tamaño vs. Complejidad del monocultivo de CMSP, adheridas al plato de cultivo y en suspensión; monocultivo HT-29; y remanentes del co-cultivo en una relación 1:10, en normoxia.

### 3.3. Estado del metabolismo glucolítico en las células HT-29 remanentes.

Con el fin de determinar si en las células remanentes había un cambio en el metabolismo glucolítico se determinó la concentración de lactato y pH en el medio extracelular, y el consumo de glucosa por parte de las células HT-29, como una medida del direccionamiento metabólico seguido por estas células.

Cuando se midió el pH extracelular se observó una disminución gradual estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) a medida que se incrementaba el número de CMSP en el co-cultivo, esto comparado con el monocultivo en normoxia. Para la relación 1:10 en hipoxia, la disminución del pH fue más prominente, reduciéndose una unidad de 7.8 a 6.8 comparado con el monocultivo en normoxia, por lo cual hay un incremento de protones  $H^+$  de 10 veces en el medio extracelular, Figura 8.

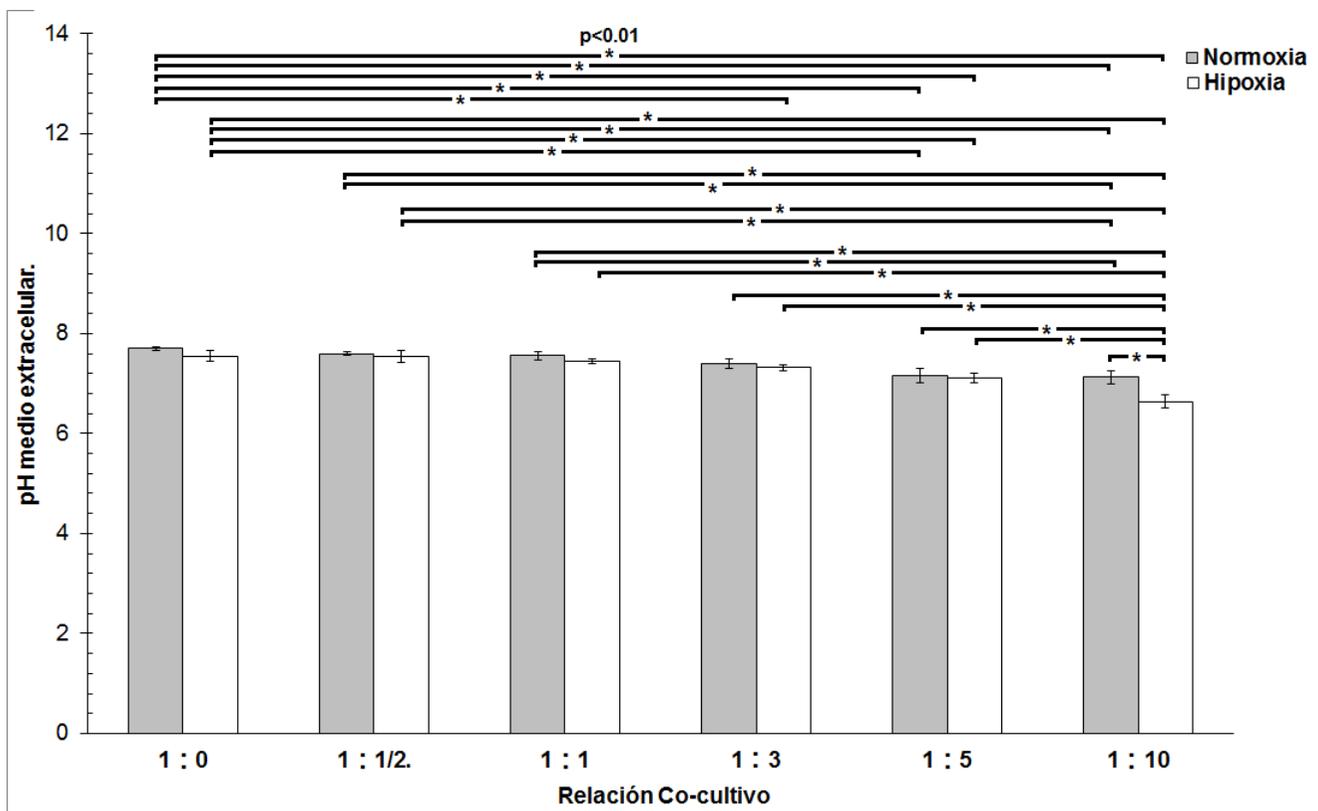


Figura 8. pH del medio de cultivo para las diferentes relaciones del co-cultivo. n=3, t de student, \* = p value < 0.01

Cuando se midió la concentración de lactato en el medio extracelular se observó que al incrementar el número de CMSP se dio un ligero incremento de 0.4 nmoles/ul, estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), en la concentración para todas las relaciones del co-cultivo exceptuando la relación 1:10 en normoxia, Figura 9. Curiosamente no se observaron diferencias significativas entre normoxia e hipoxia para cada una de las relaciones de co-cultivo, contrario a lo esperado de un mayor incremento en hipoxia.

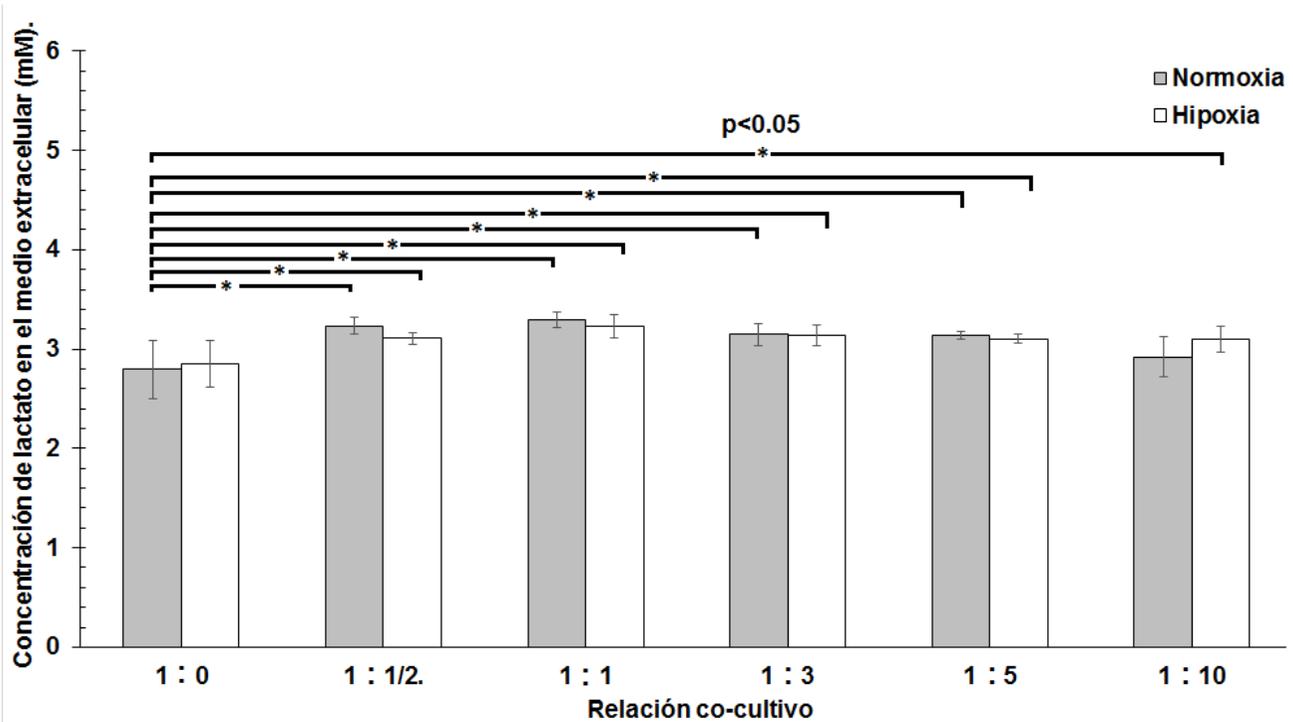
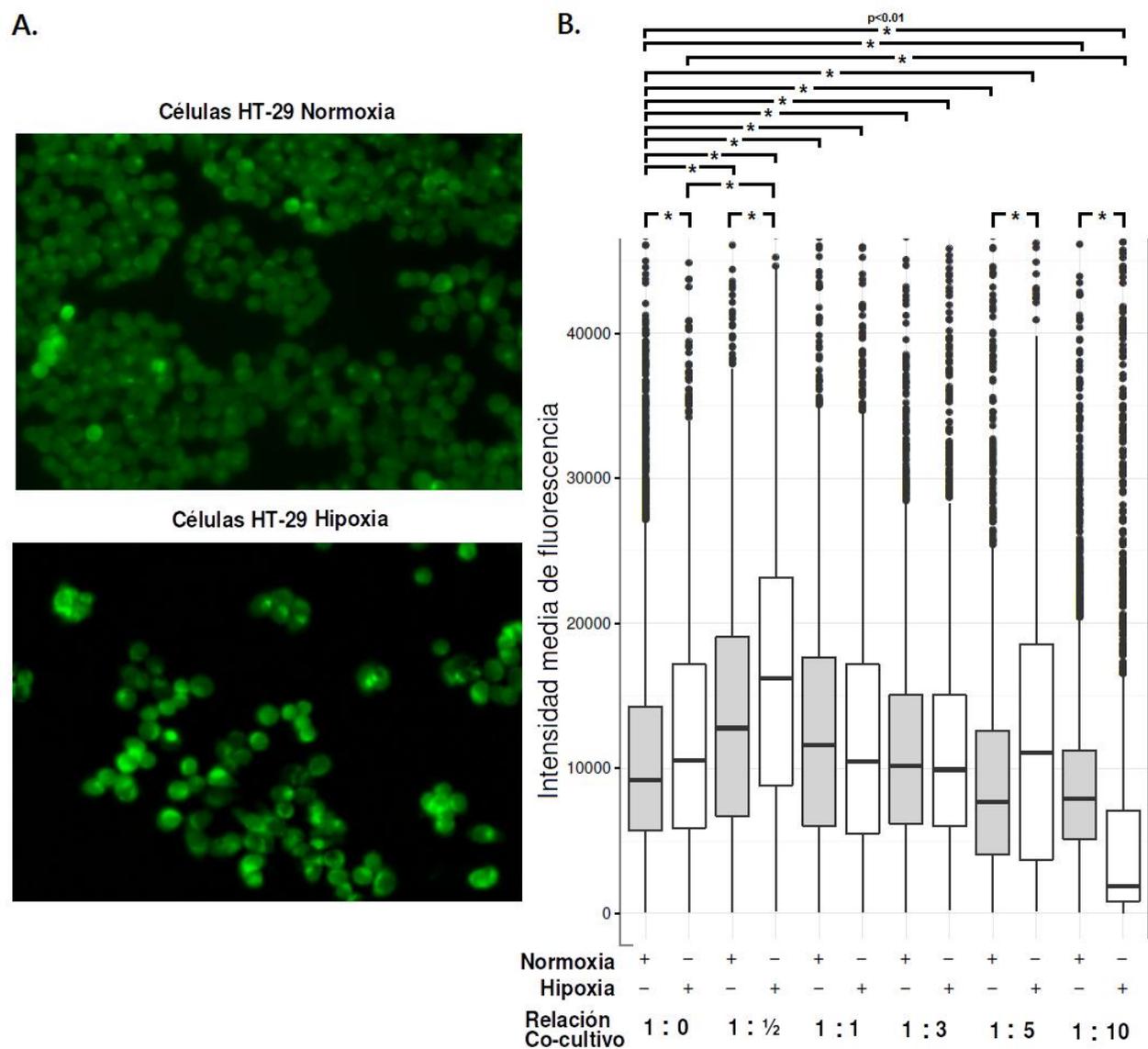


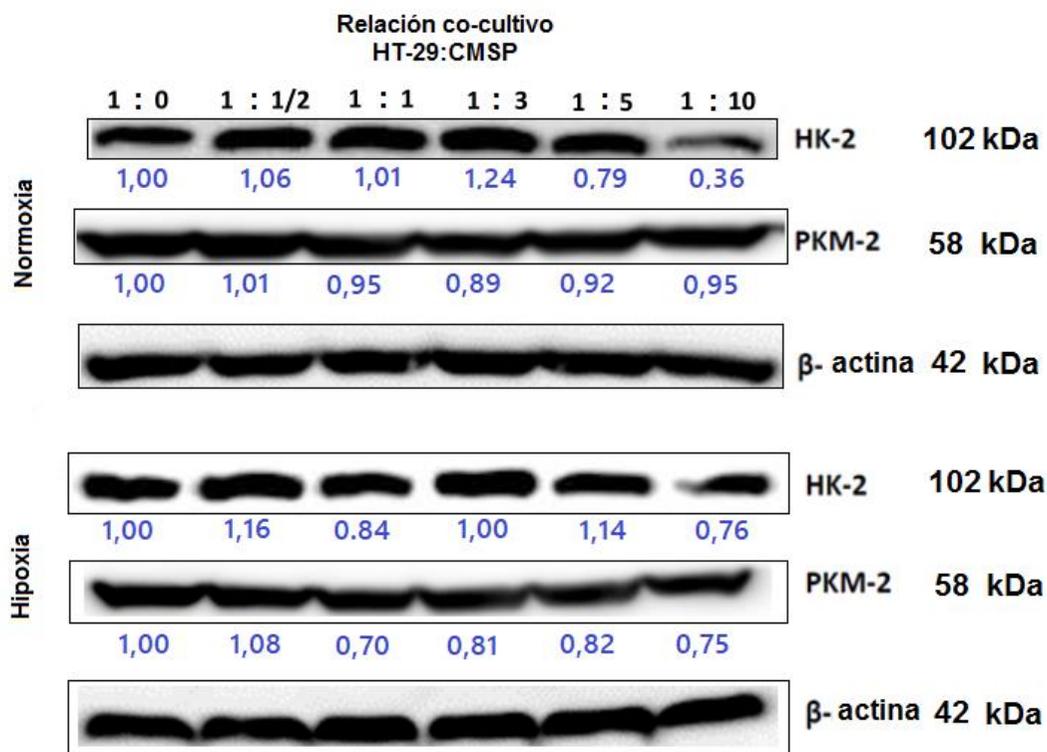
Figura 9. Concentración de lactato en el medio extracelular para las diferentes relaciones del co-cultivo. n=2, t de student test, \* = p value < 0.05

Con relación a la captación de glucosa en las células HT-29, después del co-cultivo, se pudo observar que las células presentaban un consumo de glucosa bastante heterogéneo entre ellas, Figura 10A. Al realizar el procesamiento de las imágenes de las poblaciones de células se observó un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en la captación de glucosa para las relaciones 1:½ y 1:1 con respecto al monocultivo de las células HT-29 en normoxia, Figura 10B. La relación 1:3 se mantuvo en un rango muy similar al monocultivo, Figura 10B. Para las relaciones más altas 1:5 y 1:10 se observó una tendencia a disminuir los niveles de fluorescencia, Figura 10B. Al comparar normoxia e hipoxia, se observó que para las relaciones 1:0, 1:½ y 1:5 se presentaba significativamente ( $p < 0.01$ ) una mayor captación de glucosa en la población de células que estaban en hipoxia. Para las relaciones 1:1 y 1:3 la captación de glucosa fue muy similar entre normoxia e hipoxia. Curiosamente para la relación 1:10 los niveles de captación de glucosa en normoxia fueron significativamente ( $p < 0.01$ ) mayores que en hipoxia, Figura 10B.



**Figura 10. Captación de glucosa por las células remanentes.** **A.** Imágenes representativas de la captación de glucosa en las células HT-29 para normoxia e hipoxia, asociada a la fluorescencia de la sonda 2-NBDG. **B.** Resultados del procesamiento de imágenes para todos los tratamientos del co-cultivo. n=3, Wilcoxon test, \* = p value < 0.05

Al evaluar los niveles de expresión de las proteínas HK2 y PKM2 se encontró que para el caso de PKM2 no se apreciaron cambios considerables en ninguna de las relaciones del co-cultivo, ni en normoxia ni en hipoxia. Para el caso de HK2, se observó una ligera disminución de los niveles de HK2 en normoxia para la relación 1:10, sin embargo, se mantuvo constante para el resto de tratamientos, Figura 11.



**Figura 11. Niveles de expresión de las proteínas HK2 y PKM2 en las células remanentes** para las diferentes relaciones de co-cultivo, medidas a través de Western Blot. Como control de carga se empleó B-actina. En azul se muestran los valores de veces de cambio con respecto al monocultivo en normoxia o hipoxia.

### 3.4. Estado del estrés oxidativo en las células HT-29 remanentes

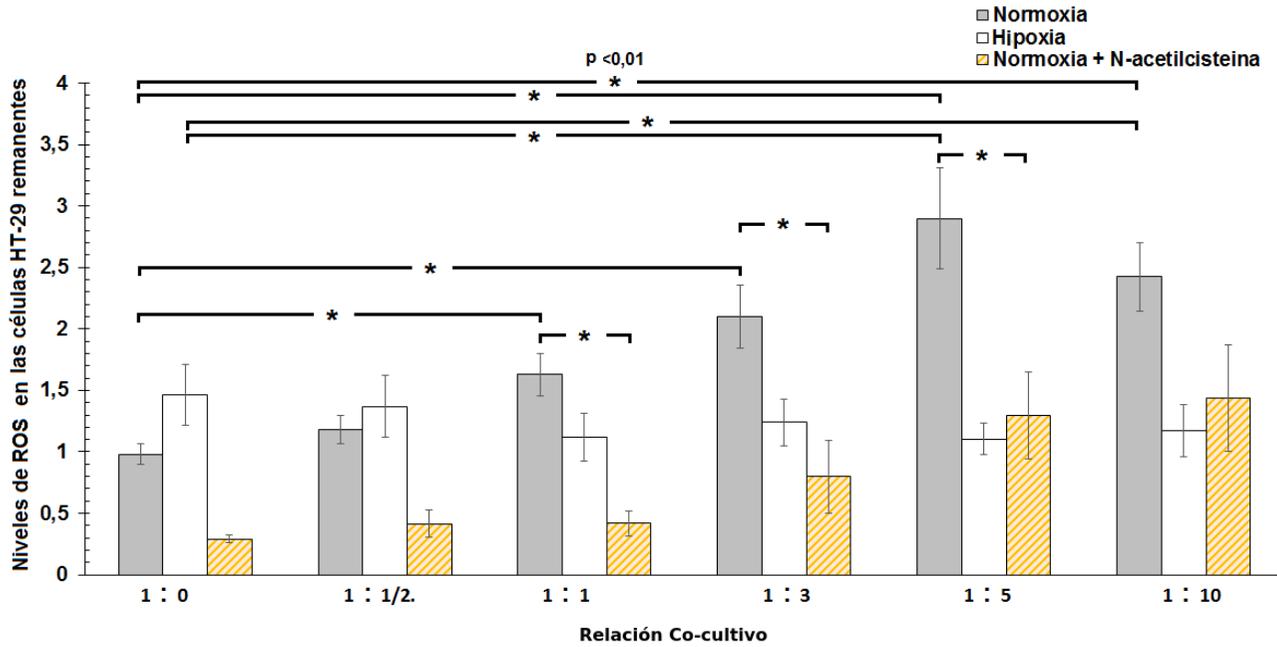
Para evaluar si existían cambios en los niveles de estrés oxidativo, se determinó el cambio de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de las células HT-29 después del tratamiento, Figura 12.

En condiciones de normoxia se observó un incremento gradual en las especies reactivas de oxígeno con respecto al control, a medida que se incrementaba el número de CMSP en el co-cultivo. Dicho incremento mostró diferencias significativas a partir de la relación 1:1. Interesantemente de la relación 1:5 a la relación 1:10 hay una disminución en los niveles de ROS. En condiciones de hipoxia se observó que para el monocultivo de HT29 (relación 1:0) se incrementaron ligeramente los niveles de ROS con respecto al control pero sin cambios significativos, sin embargo estos niveles se mantuvieron constantes para las demás relaciones. El uso del antioxidante N-acetilcisteína, logró disminuir los niveles de ROS en condiciones de normoxia, Figura 12.

Estos resultados indican que para las células HT-29 remanentes que se han mantenido en condiciones de normoxia, el estrés oxidativo incrementa en el co-cultivo al aumentar el número de CMSP.

Aunque el mecanismo de producción de ROS en hipoxia aún es motivo de controversia, en este caso se observó que el monocultivo de HT-29 en hipoxia hay una ligera tendencia de incremento con relación

a su control en normoxia, el cual es un comportamiento ya reportado, sin embargo, el hecho de que los niveles de ROS no se incrementen significativamente en hipoxia cuando se incrementa el número de CMSP podría estar indicando que la generación de ROS es dependiente de oxígeno.



**Figura 12. Veces de cambio de los niveles de ROS de las células HT-29 remanentes, para las diferentes relaciones de co-cultivo.** Las veces de cambio se normalizaron con relación al monocultivo control (relación 1:0 en normoxia). n=3, T-student, \* p value <0,01.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Cambios en la adherencia y viabilidad celular.

La inmunoección se compone de tres etapas. La primera se le conoce como inmunovigilancia o de eliminación, la segunda se le conoce como inmunoselección o de equilibrio y la tercera se le conoce como inmunosubversión o escape tumoral<sup>61-63</sup>. Para nuestro interés era de gran relevancia poder realizar un paralelo entre nuestro modelo y la primera etapa porque posiblemente en esa etapa se están dando cambios metabólicos que confieren supervivencia a las células tumorales y se inicia un proceso de inmunosupresión en las células del sistema inmune. Tomando como base el primer paso de la inmunoección, se consideró en nuestro modelo que la presencia de las CMSP sobre las células tumorales podría alterar la adherencia y la viabilidad celular de las células tumorales presentando un efecto citotóxico similar a dicho proceso de eliminación. Esto se espera de las observaciones de modelos allogénicos *in vitro*, en los que se ha observado como el contacto directo de las CMSP con células tumorales induce la muerte de las células tumorales y el desprendimiento de la superficie en la que están adheridas<sup>115,116,121-123</sup> y que podrían asemejarse a la respuesta antitumoral de las células inmunes en modelos “*in vivo*”<sup>124</sup>, específicamente basándonos en el efecto de Anoikis estimulado por el ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)<sup>125-128</sup>.

De acuerdo con los resultados de la Figura 4A el modelo de co-cultivo planteado generó una mayor respuesta inmune citotóxica sobre las células de cáncer de colon HT-29 al aumentar la concentración de CMSP y como consecuencia se observa un mayor desprendimiento de las células cancerosas. A parte de la acción que puede ejercer TRAIL y que puede explicar el desprendimiento de las células tumorales, la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) por parte de las células del sistema inmune innato<sup>129-131</sup>, podrían estar generando un mecanismo de eliminación de las células tumorales semejante a la Anoikis<sup>132-134</sup>. El hecho de que en hipoxia se dé un mayor desprendimiento de las células HT-29 estaría asociado a una regulación a la baja de moléculas de adhesión celular, especialmente integrinas<sup>135,136</sup> o a modificaciones postraduccionales de glicosilación que sufren las integrinas en estas condiciones y que estarían afectando su translocación a la membrana<sup>137</sup>. No obstante, se observó que una proporción de células, en dependencia del número de células inmunes presentes, escapa a estos mecanismos y permanece adherida a la superficie del plato de cultivo. Estas células, que en este proyecto se denominaron remanentes, conservan además su viabilidad Figura 4B y muestran mecanismos de inicio o progresión de muerte celular como se evidenció por los resultados de citometría, Figuras 5 y 6.

La inducción de apoptosis por las células del sistema inmune podría darse a través de la activación de las vías extrínsecas de TNF y Fas<sup>105,138,139</sup>. Los resultados de citometría, Figuras 5 y 6, mostraron que para las relaciones bajas del co-cultivo 1:½ y 1:1 la presencia de las CMSP en hipoxia estimula la

apoptosis temprana en las células HT-29, mientras que en las relaciones más altas 1:3, 1:5 y 1:10 se estimuló la apoptosis tardía y necrosis. Estos resultados están indicando varios procesos de eliminación de las células tumorales dependiente de la cantidad de CMSP presentes en el co-cultivo. Para el caso de las relaciones 1:½ y 1:1 en hipoxia podría estar dándose una mayor activación de las vías extrínsecas de apoptosis, ya sea por la activación de Fas/FasL a través de linfocitos T citotóxicos activados o a través de la vía TNF inducida por macrófagos y monocitos<sup>39,138-144</sup>. Para el caso de las relaciones más altas 1:3, 1:5 y 1:10, posiblemente también se están activando la vía extrínseca de apoptosis, pero además, por el hecho de que hay una mayor cantidad de CMSP, se generaría un efecto más citotóxico debido a la mayor cantidad de células NK, macrófagos y linfocitos T citotóxicos presentes en el co-cultivo<sup>145</sup>. El aumento en la cantidad de este tipo de células puede inducir la secreción de perforinas por células NK y linfocitos T citotóxicos. La interacción entre perforinas y  $Ca^{2+}$  extracelular permite establecer poros en las membranas de las células tumorales por los cuales puede darse un flujo de granzimas desde los linfocitos T citotóxicos que estimulan la apoptosis celular<sup>146</sup>.

Además de la acción de las células del sistema inmune la disminución del pH extracelular y la explosión oxidativa en el microambiente del co-cultivo podrían inducir la muerte celular a través de la vía intrínseca de apoptosis<sup>147,148</sup> y por necrosis<sup>149</sup>. Cuando se da una disminución del pH como lo observamos en nuestros resultados, Figura 8, se genera un estrés dependiente del pH que conlleva a un estrés en el retículo endoplásmico. El estrés en el retículo endoplásmico genera la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplásmico y la inducción de la proteína pro-apoptótica bax que conllevan a la permeabilidad de la membrana mitocondrial, la liberación de citocromo c y la activación del apoptosoma iniciando el clivaje y activación de caspasas<sup>150</sup>. Además de esto, el estrés dependiente del pH está vinculado con un aumento en la expresión de p53 y p21 a través de NF- $\kappa$ B<sup>150</sup>, que también conlleva a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis<sup>151</sup>.

Los resultados de las Figuras 4, 5 y 6 reflejan la inducción de la respuesta inmune contra las células HT-29, la cual se incrementa con la mayor proporción de las CMSP en el co-cultivo. De tal modo, estos resultados muestran una eliminación drástica de las células tumorales, similar a lo esperado en el primer paso de la inmunoección, en dependencia de las altas concentraciones de células inmunes y de condiciones de estrés hipóxico en el microambiente.

Aunque en este proyecto no se evaluaron los cambios en las proporciones de los diferentes tipos de células del sistema inmune (en suspensión) en las 24 horas del co-cultivo, sí se espera haber inducido un incremento en la diferenciación de algunas células asociadas al proceso de que pudiesen estar explicando los resultados encontrados. De acuerdo con Burkholder y colaboradores (2014)<sup>60</sup>, el proceso de eliminación induce la activación y diferenciación de las células inmunes asociadas a un efecto de inflamación agudo antitumoral, tanto del sistema inmune innato como adaptativo. De esta manera, se estimula un incremento en la activación y acción de linfocitos  $CD8^+$ , linfocitos  $CD4^+$  y linfocitos B, células Th1, células NK, macrófagos de tipo 1, neutrófilos de tipo 1, eosinófilos y células dendríticas maduras, que estaría regulado por la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IFN $\gamma$ . Igualmente, se espera un incremento en el número de células T naive que estén listas para su activación a través de la presentación de antígenos por parte de células dendríticas, linfocitos B o macrófagos<sup>60</sup>.

De los resultados de las Figuras 4, 5 y 6 no se puede inferir que se esté dando el proceso de inmunoselección o equilibrio en las relaciones de co-cultivo, sin embargo, el hecho de que se observe un remanente de células vivas, incluso en la relación más alta, podría estar vinculado a algún tipo de

adaptación de las células HT-29 a las condiciones del entorno. No se descarta que dichas adaptaciones estén vinculadas a cambios genéticos, epigenéticos <sup>152</sup> o en el caso de este estudio, a nivel metabólico.

Para conocer si este tipo de adaptaciones llegasen a modificar el microambiente, aproximándolo al segundo paso de la inmunoección, se debería evaluar en tiempos más prolongados de co-cultivo el repertorio de células inmunes presentes y cómo están actuando a nivel funcional. De tal modo se podrían esperar alteraciones en la activación y diferenciación en las células del sistema inmune adaptativo. Dentro del repertorio de células que se verían más alteradas estarían las células T CD4<sup>+</sup>, en las cuales se ha visto una disminución en su proliferación y supervivencia debido a la expresión por parte de las células tumorales de Indolamina 2,3-deoxygenasa (el cual elimina el triptófano de las células CD4<sup>+</sup>) o de citoquinas que tienen un efecto inmunosupresor tales como TGFβ y VEGF. Paradójicamente existe un grupo de células del sistema inmune que al aumentar su proporción en el co-cultivo podrían ejercer un efecto inmunosupresor. Este grupo de células incluyen macrófagos de tipo 2, células Th2, células Treg, neutrófilos de tipo 2 y células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSCs)<sup>60</sup>. Otro aspecto interesante que se esperaría observar es una disminución en la diferenciación y la función de células dendríticas por la presencia del ácido láctico y disminución del pH a nivel del microambiente tumoral, asociado a un cambio en el metabolismo glucolítico de las células dendríticas <sup>67,153-158</sup>.

El modelo de co-cultivo directo planteó un interrogante importante sobre la adherencia de algunas células inmunes que pudiesen permanecer junto con las células remanentes, una vez concluido el tratamiento. Los análisis realizados de los resultados de la Figura 7, aunque poco específicos por la falta de marcaciones específicas para cada tipo celular, dejaron ver que entre el 80 y 90% de células correspondía a las células tumorales con lo cual se puede inferir que los cambios metabólicos observables, en su mayoría, provienen de este tipo celular.

## **4.2 El estado del metabolismo glucolítico en las células HT-29 remanentes cambia dependiendo de la cantidad de CMSP en el co-cultivo.**

Como medida del posible direccionamiento metabólico que podrían sufrir las células tumorales asociado a la cantidad de CMSP o a la hipoxia, se determinó el pH en el medio extracelular, la concentración de lactato y el consumo de glucosa por parte de las células HT-29 remanentes.

Cuando se midió el pH extracelular, Figura 8, se observó una disminución gradual a medida que se incrementaba el número de CMSP en el co-cultivo, para la relación 1:10 en hipoxia, la disminución del pH fue de una unidad con respecto al monocultivo en normoxia, lo cual refleja 10 veces más protones H<sup>+</sup> en el medio extracelular. La disminución del pH en el medio extracelular estaría ligado a dos posibles mecanismos: el primero es el incremento de H<sup>+</sup> que se genera durante la glucólisis anaerobia, por la producción de ácido láctico que es transportado a través de los transportadores simporter de lactato-H<sup>+</sup>, (MCT4), al medio extracelular. En el segundo mecanismo se da un incremento de CO<sub>2</sub> y H<sup>+</sup> derivados del ciclo de Krebs, cuando la célula toma la vía de fosforilación oxidativa. El CO<sub>2</sub> en solución acuosa se transforma a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sup>+</sup> a nivel extracelular a través de las anhidrasas carbónicas CAIX y CAXII, las cuales se ubican sobre la cara externa de la membrana plasmática. Posteriormente el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede ser internalizado por las células tumorales con el fin de regular el pH intracelular y generar de este modo la disminución en el pH extracelular <sup>155,159,160</sup>.

La concentración de lactato extracelular en este modelo de estudio tuvo un incremento muy bajo, Figura 9, sin cambios aparentes ante la hipoxia o el incremento en la proporción de las células inmunes y contrario a lo esperado por el aumento de la glucólisis anaerobia, como se ha reportado en este tipo de células en cultivos independientes<sup>161</sup>. Estos resultados y la disminución del pH extracelular sugieren que posiblemente existe un mecanismo de regulación diferencial de los niveles del lactato extracelular, en dependencia de las concentraciones de células inmunes presentes en el microambiente; para las relaciones bajas del co-cultivo el lactato producido se excreta y permanece en el medio extracelular, mientras que en las relaciones más altas del co-cultivo el lactato excretado podría estar siendo internalizado por algunas células tumorales para ser usado como combustible, haciendo evidente la adaptación metabólica de las células tumorales remanentes al estrés generado, de una manera similar al efecto Warburg reverso<sup>13</sup>. Estos resultados estarían apoyados por investigaciones previas en las que se muestra la existencia de subpoblaciones celulares definidas por los cambios en las presiones parciales de oxígeno y la concentración de metabolitos en el medio extracelular, en tumores inducidos con células SiHa de carcinoma de cérvix<sup>162</sup>. En estos tumores se encontraron células con fenotipos celulares marcados hacia el metabolismo oxidativo y la presencia de MCT1, un transportador con mayor afinidad por el lactato exógeno ( $K_m = 3.5\text{--}10\text{ mM}$ )<sup>162</sup>. En otras palabras, en las relaciones bajas del co-cultivo se podría estar favoreciendo el efecto Warburg<sup>4</sup>, mientras que para las relaciones altas del co-cultivo se podría favorecer un efecto Warburg inverso<sup>13</sup>.

Tomando como base los posibles mecanismos de disminución del pH extracelular y los resultados de lactato se podría pensar que en las relaciones bajas del co-cultivo el pH disminuye debido al primer mecanismo asociado a la glucólisis anaerobia y secreción de lactato, mientras que, en las relaciones altas del co-cultivo el exceso de lactato extracelular, secretado por subgrupos de células, ingresa en conjunto con protones  $H^+$  al interior de las células a través de los transportadores MCT1<sup>10,162</sup>, luego el lactato es transformado a piruvato por la LDH y entra al ciclo de Krebs, incrementando los niveles de  $CO_2$  y  $H^+$ . Además de esto, los protones internalizados y los que se generan debido al ciclo de Krebs posiblemente retornan al medio extracelular a través de bombas de  $H^+$ , como el intercambiador  $Na^+/H^+$  1 (NHE1), o son regulados por anhidrasas carbónicas<sup>159,160</sup>. Todo este proceso explicaría los niveles bajos de lactato y de pH en el medio extracelular. También, es posible que los cambios a nivel metabólico observados estén asociados a un mecanismo de respuesta que intenta mitigar la disminución del pH extracelular<sup>155</sup>.

Las células remanentes derivadas de los diferentes co-cultivos, muestra un comportamiento diferencial en cuanto a la captación de glucosa asociada a los niveles de fluorescencia del homólogo de glucosa, 2-NBDG. Al comparar con el control del monocultivo en normoxia, las relaciones 1:½ y 1:1 aumentaron la captación de glucosa, la relación 1:3 se mantuvo constante y las relaciones más altas 1:5 y 1:10 mostraron una tendencia a disminuir, Figura 10 B.

Se plantearon dos posibles explicaciones para estos resultados: La primera es que la disminución en la captación de glucosa en las relaciones altas se asocia con el aumento del número de células que entran en apoptosis tardía y necrosis, Figura 5 y 6, debido a que estas células pierden función y disminuyen su actividad metabólica<sup>163-165</sup>. Sin embargo, con esta posibilidad no está muy claro por qué hay un incremento en la captación de glucosa en las relaciones más bajas 1:½ y 1:1, dado que en estas relaciones también había un incremento en el número de células en apoptosis temprana, Figura 6. La segunda explicación es que se está dando una reprogramación del metabolismo glucolítico en las células remanentes dependiente del número de CMSP en el co-cultivo. Las relaciones más bajas del co-cultivo 1:½ y 1:1 podrían estar asociadas al efecto Warburg<sup>7</sup>, en donde hay un mayor consumo de glucosa,

Figura 10B y un aumento en la producción de lactato, Figura 9. Las relaciones más altas del co-cultivo 1:5 y 1:10 podrían estar asociadas a un efecto Warburg reverso<sup>13</sup>, en donde algunas células consumen el lactato del medio extracelular y disminuyen el consumo de glucosa, Figura 9 y 10. La relación 1:3 podría estar en un estado intermedio entre los dos efectos, dado a que los niveles de fluorescencia son muy parecidos al control, Figura 10B.

A pesar de que no se evaluaron los cambios que podrían tener las células tumorales con relación a la glutaminólisis, se espera observar que en las relaciones altas del co-cultivo, en donde se da una mayor acidosis y posiblemente el efecto Warburg reverso, se incremente la glutaminólisis; transformando a la glutamina en glutamato y posteriormente en alfa-cetoglutarato para ingresar en el ciclo de Krebs<sup>68</sup>.

Con el fin de observar si los cambios vistos tenían relación con la cantidad de proteínas asociadas al metabolismo glucolítico se evaluaron los niveles de las proteínas HK2 y PKM2, Figura 11. No se observaron cambios significativos en la expresión de estas dos proteínas que se correlacionaran con los cambios vistos en la captación de glucosa y la producción de lactato. Tan solo la disminución para HK2 en la relación 1:10 en normoxia podría estar relacionada con la disminución en la captación de glucosa en esta relación del co-cultivo. Estos resultados indican que al menos para estas dos proteínas no hay un cambio significativo a nivel de la regulación en su expresión, sin embargo, no se descarta que pueda existir un cambio en los niveles de la proteína PKM2 en su forma de dímero o tetrámero sin que se vea alterada la cantidad total de proteína observada<sup>88,89,93</sup>. Tampoco se descarta que se incremente o disminuya la expresión de otras enzimas involucradas en el metabolismo glucolítico. Además, puede existir una modulación asociada a la actividad enzimática de cada proteína para cada una de las relaciones del co-cultivo, sin que se vea alterada su expresión.

Aunque no fue evaluado en este trabajo, otro aspecto importante a recalcar es la concentración de  $Ca^{2+}$  a nivel citosólico y su relación con el metabolismo glucolítico. Se ha visto que un metabolismo dirigido hacia la glucólisis anaerobia resulta ser la fuente primordial de ATP que necesita la bomba de  $Ca^{2+}$  dependiente de ATP (PMCA) para secretar  $Ca^{2+}$  al medio extracelular. Un cambio hacia un metabolismo mitocondrial (fosforilación oxidativa) conlleva a una disminución en la actividad de esta bomba, generando un incremento en el calcio intracelular (citosólico) que trae como consecuencia la inducción de apoptosis en las células tumorales<sup>166</sup> lo cual tendría relación con lo observado en los resultados de la Figura 6.

En la Figura 13 se muestra un esquema hipotético de los cambios en el direccionamiento del metabolismo glucolítico de las células de cáncer de colon HT-29 al incrementar el número de CMSP en normoxia e hipoxia.

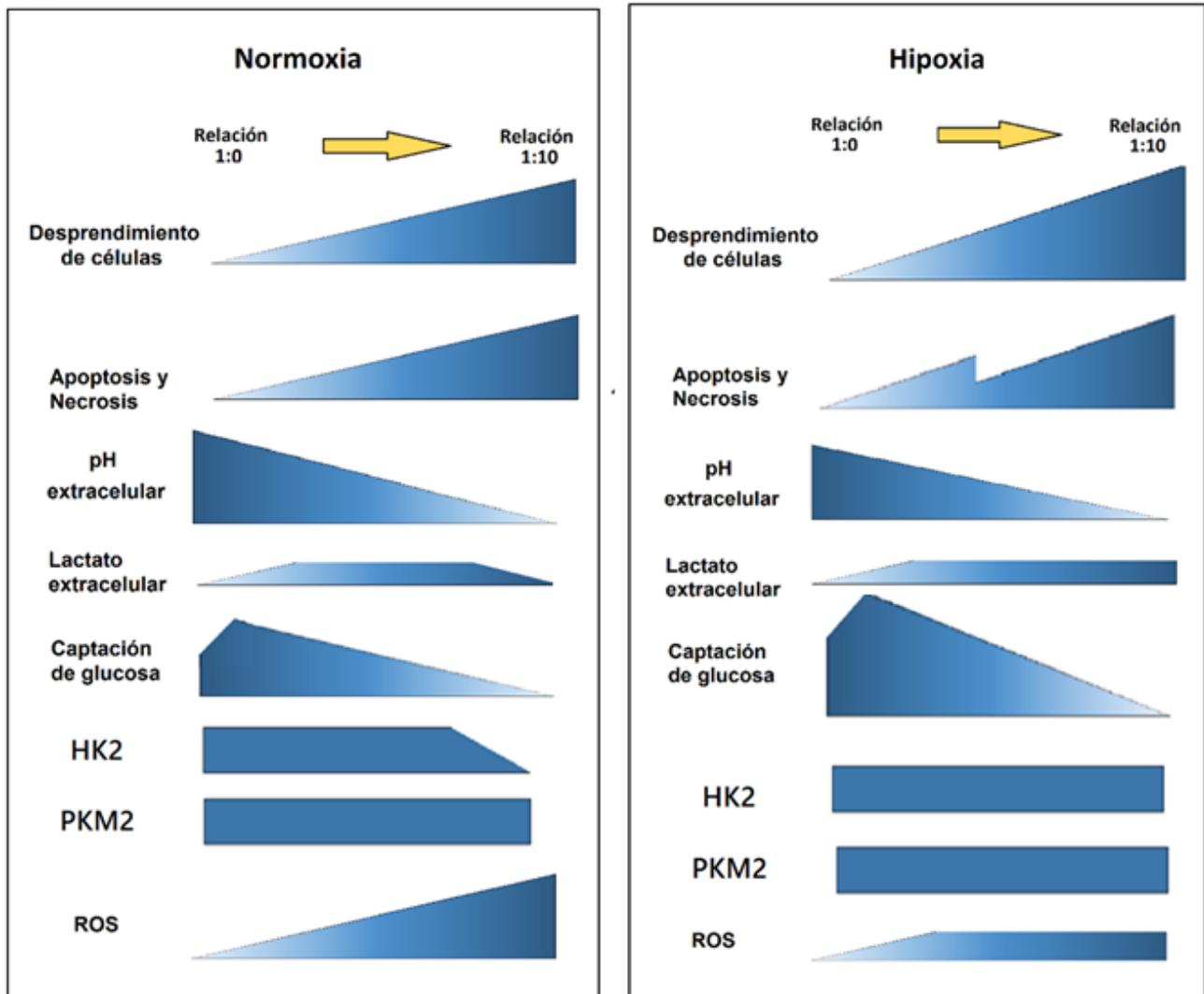
### **4.3 El estado del estrés oxidativo en las células HT-29 remanentes varía dependiendo de la disponibilidad de $O_2$ .**

El aumento de los niveles de ROS en normoxia en las células HT-29 cuando se incrementa el número de CMSP en el co-cultivo, Figura 12, posiblemente está asociado a la secreción de citoquinas y factores de crecimiento (IL-1,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , EGF,  $TGF\beta$ ) por parte de macrófagos, monocitos y neutrófilos, que inducen la activación de vías de señalización sobre las células remanentes y fomentan la actividad de NADPH oxidasas y la disrupción de la cadena de transporte durante la explosión oxidativa<sup>99,167</sup>. Esta respuesta que trae como resultado la generación de ROS, que a su vez estaría estrechamente vinculada a la inducción de muerte celular por parte de las CMSP<sup>100,102</sup>, Figura 6.

En condiciones de hipoxia, el mecanismo de producción de ROS en células tumorales aún es motivo de controversia, debido a que algunos autores reportan su incremento<sup>168-170</sup>, mientras que otros plantean su disminución<sup>171,172</sup>. En nuestro caso, Figura 12, se observó que el monocultivo de HT-29 en hipoxia tiene un ligero incremento con relación a su control en normoxia, sin embargo, ese ligero incremento se mantuvo constante en todas las relaciones del co-cultivo. El hecho de que los niveles de ROS no se incrementen gradualmente en hipoxia cuando se incrementa el número de CMSP podría estar indicando que la generación de ROS es dependiente de la cantidad de oxígeno disponible. En otras palabras, dado que la producción de ROS a nivel mitocondrial depende de la disrupción en la cadena de electrones y se necesita de oxígeno como aceptor de los electrones que se fugan de la cadena, se puede pensar que la producción de ROS llegará hasta un umbral que dependerá de la disponibilidad del oxígeno presente en la célula.

Otra posible explicación de la regulación a la baja de los niveles de ROS intracelular en las células tumorales en co-cultivo podría estar asociado a un incremento de agentes antioxidantes estimulados por la activación de NF- $\kappa$ B que a su vez está influenciado por el exceso de ROS en el medio extracelular derivado de la explosión oxidativa<sup>173,174</sup>. La hipoxia también podría inducir un sistema de regulación redox a través del metabolismo serina-glicina de un carbono (SGOC) a nivel mitocondrial<sup>175,176</sup> o a través de la regulación de la glucólisis y/o glutaminólisis<sup>177</sup>. Dentro de los antioxidantes que podrían incrementar su acción estarían las superóxido dismutasas (SODs), catalasas, glutatión peroxidasas, peroxiredoxinas, tioredoxinas<sup>177,178</sup>. Además, en las relaciones bajas del co-cultivo podría darse, además de la glucólisis anaerobia, un mayor estímulo de la producción de agentes antioxidantes como NADPH a través de la vía de pentosas fosfatos para la regeneración del glutatión reducido y un mejor control de las ROS<sup>179</sup>.

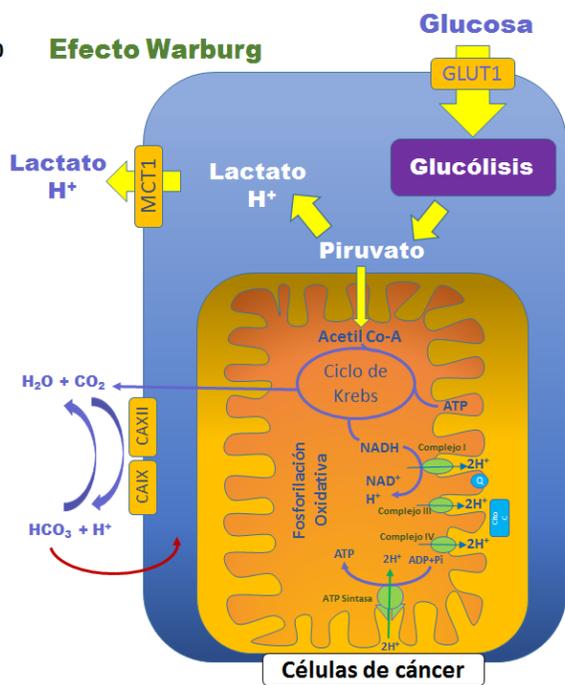
A.



**Figura 13. Esquema hipotético de los cambios en el metabolismo de las células de cáncer de colon HT-29 al incrementar el número de CMSP en normoxia e hipoxia. A.** Resumen de todos los cambios observados. **B.** Modelo de los cambios en normoxia. **C.** Modelo de los cambios en hipoxia. El posible cambio va desde un metabolismo asociado al efecto Warburg o glucólisis anaerobia cuando hay un número bajo de CMSP hasta un metabolismo asociado al efecto Warburg Inverso, en el cual en un grupo de células se da un mayor consumo de lactato y una disminución en el consumo de glucosa, cuando hay un mayor número de CMSP. Las diferencias más notables entre normoxia e hipoxia fueron los niveles de ROS y un mayor consumo de glucosa en hipoxia para las relaciones más bajas del co-cultivo.

B.

Relación 1:0

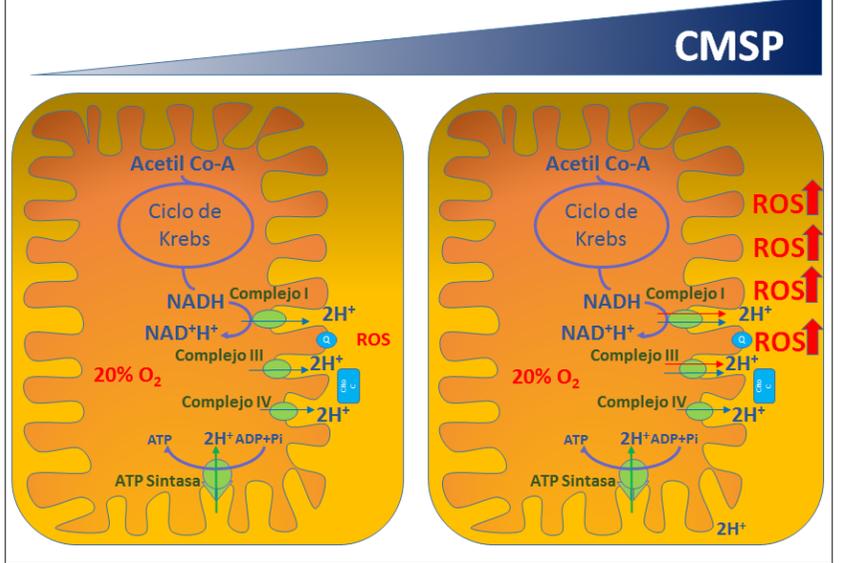


Normoxia 20% O<sub>2</sub>

Mitocondria

Relación 1:0

Relación 1:10



**Efecto Warburg**

Glucosa

GLUT1

Glucólisis

Piruvato

Lactato H<sup>+</sup>

MCT1

Lactato H<sup>+</sup>

Piruvato

Acetil Co-A

Ciclo de Krebs

ATP

Fosforilación Oxidativa

NADH → Complejo I → 2H<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup>H<sup>+</sup> → Complejo III → 2H<sup>+</sup>

H<sup>+</sup> → Complejo IV → 2H<sup>+</sup>

ATP Sintasa → 2H<sup>+</sup> ADP+Pi → ATP

H<sub>2</sub>O + CO<sub>2</sub> ← CAIX, CAXII

HCO<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>

**Células del sistema inmune**

**Efecto Warburg reverso**

Glucosa

GLUT1

Glucólisis

Piruvato

Lactato H<sup>+</sup>

MCT1

Lactato H<sup>+</sup>

Piruvato

Acetil Co-A

Ciclo de Krebs

ATP

Fosforilación Oxidativa

NADH → Complejo I → 2H<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup>H<sup>+</sup> → Complejo III → 2H<sup>+</sup>

H<sup>+</sup> → Complejo IV → 2H<sup>+</sup>

ATP Sintasa → 2H<sup>+</sup> ADP+Pi → ATP

H<sub>2</sub>O + CO<sub>2</sub> ← CAIX, CAXII

HCO<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>

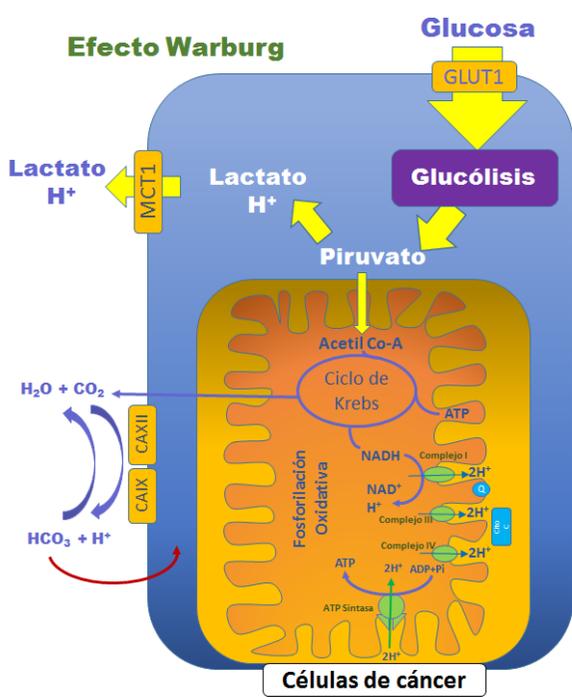
**Células de cáncer**

**CMSP**

Relación 1:10

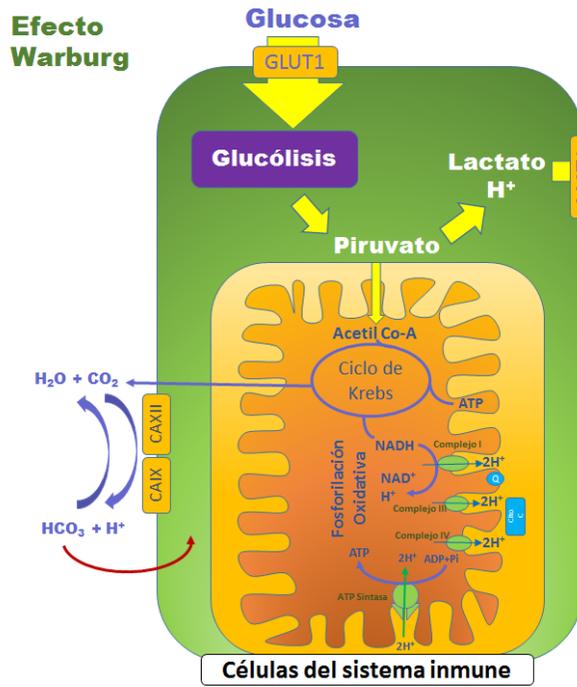
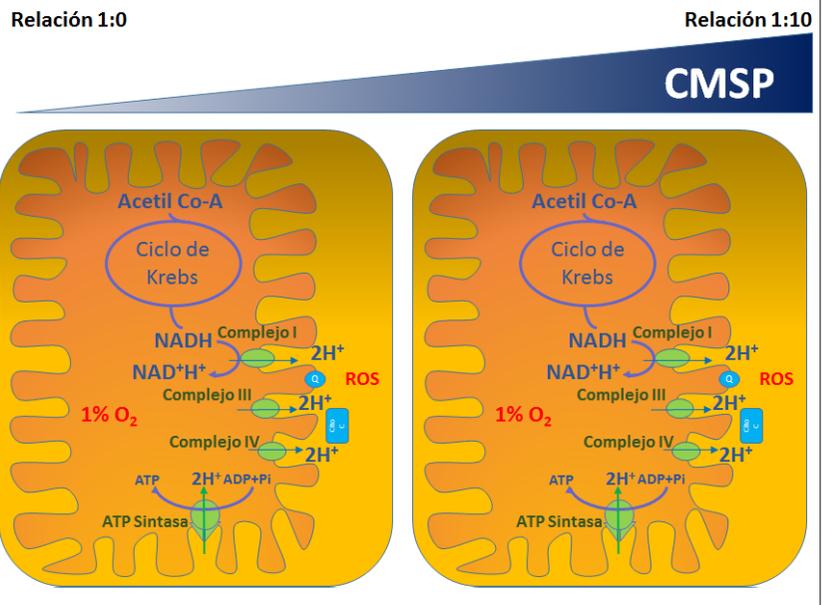
C.

Relación 1:0

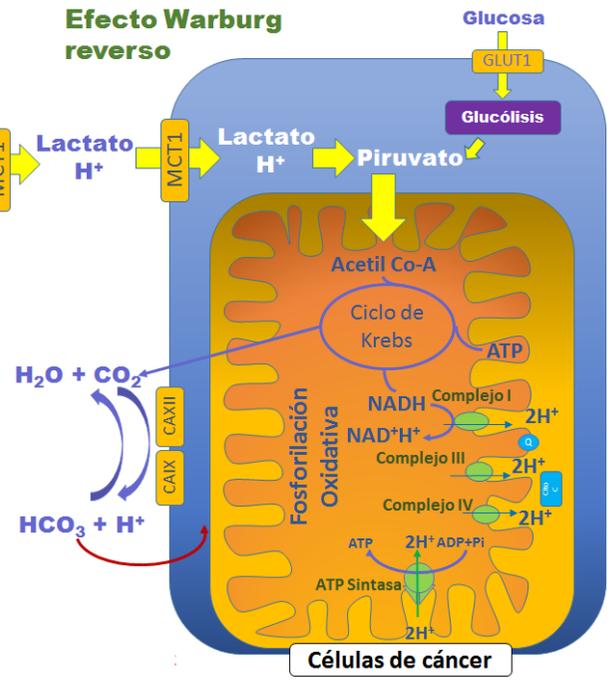


Hipoxia 1% O<sub>2</sub>

Mitocondria



**Efecto Warburg reverso**



CMSP

Relación 1:10

## **CAPÍTULO 5: PERSPECTIVAS A FUTURO**

Este trabajo es un buen inicio para el estudio del microambiente tumoral con co-cultivos en 2D y de los cambios asociados a la interacción entre las células de cáncer de colon y las células CMSP. A su vez, genera bastantes interrogantes y se abre un abanico de posibilidades para continuar con el estudio de la regulación del metabolismo glucolítico y el estrés oxidativo en las células tumorales en su interacción con las células del sistema inmune. A continuación se mencionan algunas:

### **5.1 A corto plazo:**

Evaluar si los cambios encontrados a nivel de captación de glucosa se relacionan directamente con una reprogramación metabólica o son debidos al aumento de apoptosis y necrosis en las células HT-29. Se plantea, adicionar a los ensayos de captación de glucosa algún marcador específico de apoptosis y necrosis para microscopía de fluorescencia en vivo, que permita discriminar la captación de glucosa tanto en células vivas como en células en apoptosis o necrosis.

Evaluar los posibles cambios a nivel de proliferación celular y/o quiescencia que puedan tener las células en las diferentes relaciones del co-cultivo. Utilizar un marcador de proliferación celular como Ki67 y realizar un análisis de la población celular por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

Determinar si existe algún tipo de cambio a nivel transcripcional del mRNA que codifica para las proteínas HK2 y PKM2, esto a través de qRT-PCR.

### **5.2 A mediano plazo:**

Evaluar los posibles cambios a nivel de viabilidad, metabolismo glucolítico y estrés oxidativo en las CMSP.

Cuantificar y determinar qué tipo de citoquinas son secretadas al medio extracelular en las diferentes relaciones del co-cultivo.

Evaluar la expresión de otras proteínas involucradas en el metabolismo glucolítico, tales como: GLUT-1, fosfofructoquinasa 1 y 2 (PFK-1,2), Aldolasa A, Triosa fosfato isomerasa, GAPDH, fosfoglicerato quinasa 1, fosfoglicerato mutasa, Enolasa 1, Piruvato quinasa, Piruvato deshidrogenasa (PDH), lactato deshidrogenasa A (LDHA) y piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1). Además de los posibles cambios de dímero o tetrámero que puede sufrir PKM2.

### **5.3 A largo plazo:**

Evaluar otras rutas metabólicas que pudieran tener influencia en la supervivencia de las células de cáncer de colon, entre ellas, la glutaminólisis, la ruta de pentosas fosfato, la síntesis y degradación de aminoácidos y lípidos. Posiblemente para lograr una mejor aproximación de esto, se podría emplear alguna técnica de marcaje de isotópico acoplado con espectrometría de masas para rastrear los posibles metabolitos y la direccionalidad de cada una de las fuentes (Glucosa, Glutamina, Lactato o Acetil-coA).

Evaluar las posibles rutas de señalización que involucren la regulación del metabolismo glucolítico y que sean activadas por citoquinas presentes en el medio extracelular del co-cultivo.

Evaluar los posibles cambios a nivel del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y extracelular, asociándolos con los cambios vistos en el metabolismo glucolítico.

Evaluar si se dan cambios metabólicos empleando otros tipos de células en co-cultivo; por ejemplo, fibroblastos además de otras líneas celulares de cáncer de colon.

Este modelo *in vitro* puede emplearse a futuro como modelo de evaluación de agentes quimioterapéuticos que tengan efecto sobre la viabilidad, proliferación, capacidad apoptótica y metabolismo del microambiente celular de células de cáncer de colon y CMSPs. Esto traería ventajas en tiempo y ampliaría el estudio sobre metabolismo en microambiente tumoral, en modelos *in vitro*, en contraste de los modelos animales cuestionados muchas veces desde el punto de vista la bioético.

## **CAPÍTULO 6: VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL MODELO**

### **Ventajas:**

- Se pueden manipular las concentraciones de oxígeno (normoxia o hipoxia) y se pueden manejar diferentes tiempos.
- A semeja el primer paso de la inmunoección: Eliminación.
- Es económico, rápido y de fácil manejo.
- Permite ser escalable desde cajas de 24 pozos hasta platos de cultivo de 100 mm, dependiendo de lo que se quiera evaluar.
- Se puede seleccionar alguna relación del co-cultivo de acuerdo a lo que se desee evaluar.

### **Limitaciones:**

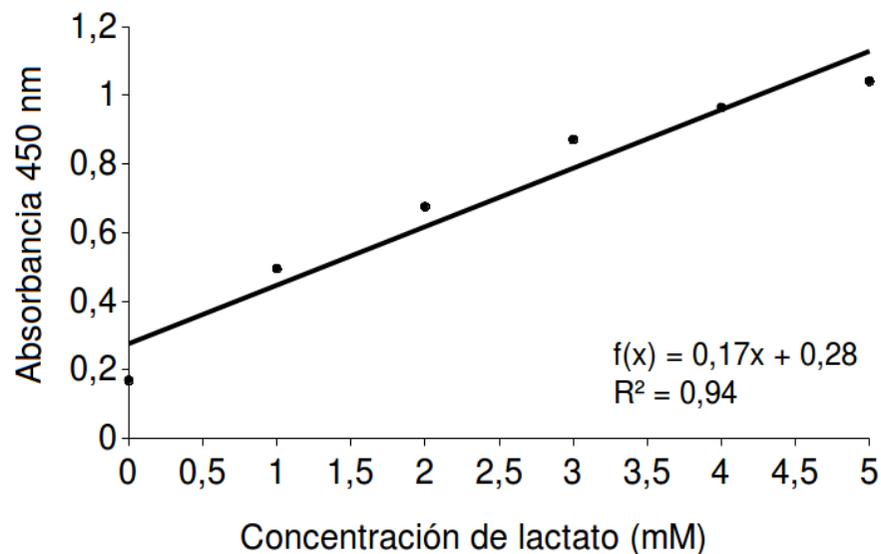
- No asemeja los pasos de equilibrio y/o escape de la inmunoección. Al menos durante este tiempo de co-cultivo.
- Es un modelo in vitro y no abarca todos los procesos que se pueden dar en un organismo.
- Al ser un modelo alogénico puede variar los resultados comparado con un modelo singénico.
- Los cambios observables del metabolismo de las células remanentes son derivados de la interacción de las células tumorales con el conjunto de poblaciones celulares (CMSP) y no de una población específica.

## CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

1. Este modelo de co-cultivos mostró la acción de las células del sistema inmune de manera similar al primer paso de la inmunomodulación. En las relaciones bajas induce la apoptosis temprana, lo que podría estar asociado a la activación de vías de señalización como la vía extrínseca de apoptosis. En las relaciones altas se induce la apoptosis tardía y la necrosis. Esto podría relacionarse con un efecto citotóxico posiblemente asociado a la explosión oxidativa, el pH extracelular y las señales de inducción de apoptosis y necrosis.
2. Este modelo de co-cultivos mostró cambios en el metabolismo glucolítico, posiblemente asociados tanto a la viabilidad celular y los estadios de apoptosis, como también a la reprogramación metabólica debida al microambiente del co-cultivo. La reprogramación metabólica indica que en dependencia de la cantidad de células inmunes presentes en el microambiente, las células tumorales presentan un comportamiento metabólico diferencial; a relaciones bajas (1:½ y 1:1) las células se comportan como si estuvieran en el efecto Warburg, a la relación intermedia (1:3) el comportamiento está entre el efecto Warburg y el efecto Warburg reverso, y en relaciones altas (1:5 y 1:10) las células tienden a comportarse como en el efecto Warburg reverso.
3. Las células HT-29 remanentes mostraron cambios en el estrés oxidativo por el efecto del aumento de las CMSP en normoxia pero no en hipoxia. Este efecto aparentemente estaría dependiendo de la disponibilidad de oxígeno para la generación de ROS o de la regulación por parte de algunos mecanismos antioxidantes.
4. Este trabajo desarrolló un modelo útil de co-cultivos *in vitro* en 2D, que permite el estudio de los cambios metabólicos y el estrés oxidativo que sufren las células de cáncer de colon cuando se encuentran en condiciones de normoxia, hipoxia y en presencia de células del sistema inmune.

## CAPÍTULO 8: ANEXOS

### 8.1 Curva de calibración de concentración de lactato vs. Absorbancia.



**Figura 14.** Curva de calibración de concentración de lactato vs Absorbancia a partir de varios estándares incluidos en el kit II de ensayo de lactato (Sigma-Aldrich, MAK065).

### 8.2 Consideraciones éticas.

En el proyecto se manejaron muestras de sangre para el aislamiento de las células mono nucleares de sangre periférica. Las muestras provenían de donantes voluntarios adultos, sanos, entre los 20 a 50 años de edad, que fueron facilitadas por el Hemo-Centro distrital de Bogotá con previa firma del consentimiento informado.

El consentimiento informado está enmarcado en un proyecto más grande en el cual se dió la evaluación y aprobación por el comité de ética en investigación de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario y por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Para dicha aprobación se presentó el diseño del consentimiento informado tomando como base la resolución 8430 de 1993 y 002378 de 2008 del Ministerio de la Protección Social.

El proyecto se enmarca como Investigación con riesgo mínimo, tomando como base la resolución 8430 de 1993 y 002378 de 2008 del Ministerio de la Protección Social.

En el consentimiento informado se le indica al donante voluntario que va a participar en el estudio firmando el consentimiento informado y permitiendo que la sangre que done se utilice para separar las células mononucleares y con ellas, realizar los experimentos planteados en el proyecto en mención. Estos experimentos permitirán ver el comportamiento de las células sanguíneas y tumorales y la respuesta de estas últimas ante los tratamientos contra el cáncer. También, al donante voluntario se le indica que va a participar en una Investigación con riesgo mínimo: “Son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios entre los que se consideran pesar al sujeto, ECG, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico, al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de uñas y pelo sin causar desfiguración, **extracción de sangre por punción venosa en adultos con buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos**, pruebas psicológicas a grupos o individuos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico y registrados ante el Ministerio o su autoridad delegada, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos que se definen en el artículo 55 de la resolución 8430 de 1993”.

En este estudio el donante no va a obtener ningún BENEFICIO económico pero si tendrá el beneficio de que la sangre que done sea utilizada en un proyecto que genere recomendaciones de optimización de la terapia contra el cáncer.

La información que el donante nos brinde va a ser conocida y manejada por investigadores éticamente calificados, que no divulgarán la información personal a personas externas al estudio, cumpliendo con el secreto profesional.

### **8.3 Contribución a la línea de investigación del grupo.**

A partir del 2010, teniendo en cuenta la creciente participación en la investigación científica por parte de la Universidad del Rosario, y a sabiendas de la importancia que tienen los aspectos bioquímicos y moleculares en la resolución de los interrogantes relacionados con diversas enfermedades que afectan la calidad de vida de los seres humanos, el grupo Bio-Bio inició el desarrollo de la línea de investigación “Mecanismos bioquímicos y moleculares de la respuesta celular activada por estrés”. A través de esta línea de investigación, se busca fortalecer la investigación dentro del grupo, apoyar la formación de alto nivel de los nuevos científicos colombianos, e identificar y aportar soluciones a problemas existentes en la práctica médica.

Con la participación de Investigadores Jóvenes en el desarrollo de este proyecto, el grupo Bio-Bio busca mejorar la comprensión de los procesos moleculares y bioquímicos implicados en la respuesta celular a estresores, como la hipoxia y la respuesta inmune, que están asociados a la resistencia tumoral a tratamientos como la Radio- y la Quimioterapia. Adicionalmente, el desarrollo de este proyecto permitirá consolidar la alianza entre el grupo Bio-Bio y el Laboratorio de Reumatología e Inmunología, del Departamento de Pediatría, de la Universidad de Würzburg, permitiendo el desarrollo de investigación conjunta a largo plazo en la bioquímica del cáncer y la radio-oncología, generando así herramientas que permitan optimizar la eficacia de dichos tratamientos.

### 8.4. Análisis estadístico.

**Informe de las diferencias ordenadas**

| Nivel             | - Nivel           | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p |
|-------------------|-------------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 5 Hipoxia     | 76,38663   | 7,318235                        | 57,0984                    | 95,67480                   | <.0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 3 Hipoxia     | 74,63488   | 7,318235                        | 55,3467                    | 93,92305                   | <.0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 1 Hipoxia     | 70,08288   | 7,318235                        | 50,7947                    | 89,37105                   | <.0001* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 10 Hipoxia    | 59,66063   | 7,318235                        | 40,3724                    | 78,94880                   | <.0001* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 5 Hipoxia     | 57,52313   | 7,318235                        | 38,2349                    | 76,81130                   | <.0001* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 3 Hipoxia     | 55,77138   | 7,318235                        | 36,4832                    | 75,05955                   | <.0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 1/2 Hipoxia   | 53,11688   | 7,318235                        | 33,8287                    | 72,40505                   | <.0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 3 Normoxia    | 52,13175   | 7,318235                        | 32,8436                    | 71,41993                   | <.0001* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 10 Hipoxia    | 51,92438   | 7,318235                        | 32,6362                    | 71,21255                   | <.0001* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 1 Hipoxia     | 51,21938   | 7,318235                        | 31,9312                    | 70,50755                   | <.0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 10 Normoxia   | 50,40888   | 7,318235                        | 31,1207                    | 69,69705                   | <.0001* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 5 Hipoxia     | 49,78688   | 7,318235                        | 30,4987                    | 69,07505                   | <.0001* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 3 Hipoxia     | 48,03513   | 7,318235                        | 28,7469                    | 67,32330                   | <.0001* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 1 Hipoxia     | 43,48313   | 7,318235                        | 24,1949                    | 62,77130                   | <.0001* |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 10 Hipoxia    | 41,59475   | 7,318235                        | 22,3066                    | 60,88293                   | <.0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 1 Normoxia    | 40,73550   | 7,318235                        | 21,4473                    | 60,02368                   | <.0001* |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 5 Hipoxia     | 39,45725   | 7,318235                        | 20,1691                    | 58,74543                   | <.0001* |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 10 Hipoxia    | 37,78863   | 7,318235                        | 18,5004                    | 57,07680                   | <.0001* |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 3 Hipoxia     | 37,70550   | 7,318235                        | 18,4173                    | 56,99368                   | <.0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 5 Normoxia    | 36,92938   | 7,318235                        | 17,6412                    | 56,21755                   | <.0001* |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 5 Hipoxia     | 35,65113   | 7,318235                        | 16,3629                    | 54,93930                   | <.0001* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 1/2 Hipoxia   | 34,25338   | 7,318235                        | 14,9652                    | 53,54155                   | <.0001* |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 3 Hipoxia     | 33,89938   | 7,318235                        | 14,6112                    | 53,18755                   | <.0001* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 3 Normoxia    | 33,26825   | 7,318235                        | 13,9801                    | 52,55643                   | <.0001* |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 1 Hipoxia     | 33,15350   | 7,318235                        | 13,8653                    | 52,44168                   | <.0001* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 10 Normoxia   | 31,54538   | 7,318235                        | 12,2572                    | 50,83355                   | <.0001* |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 1 Hipoxia     | 29,34738   | 7,318235                        | 10,0592                    | 48,63555                   | 0,0001* |
| 1 a 10 Normoxia   | 1 a 10 Hipoxia    | 28,11525   | 7,318235                        | 8,8271                     | 47,40343                   | 0,0002* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 1/2. Normoxia | 26,59975   | 7,318235                        | 7,3116                     | 45,88793                   | 0,0005* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 1/2 Hipoxia   | 26,51713   | 7,318235                        | 7,2289                     | 45,80530                   | 0,0005* |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 10 Hipoxia    | 26,39238   | 7,318235                        | 7,1042                     | 45,68055                   | 0,0005* |
| 1 a 10 Normoxia   | 1 a 5 Hipoxia     | 25,97775   | 7,318235                        | 6,6896                     | 45,26593                   | 0,0006* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 3 Normoxia    | 25,53200   | 7,318235                        | 6,2438                     | 44,82018                   | 0,0008* |
| 1 a 1/2 Hipoxia   | 1 a 10 Hipoxia    | 25,40725   | 7,318235                        | 6,1191                     | 44,69543                   | 0,0008* |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 5 Hipoxia     | 24,25488   | 7,318235                        | 4,9667                     | 43,54305                   | 0,0014* |
| 1 a 10 Normoxia   | 1 a 3 Hipoxia     | 24,22600   | 7,318235                        | 4,9378                     | 43,51418                   | 0,0014* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 10 Normoxia   | 23,80913   | 7,318235                        | 4,5209                     | 43,09730                   | 0,0016* |
| 1 a 1/2 Hipoxia   | 1 a 5 Hipoxia     | 23,26975   | 7,318235                        | 3,9816                     | 42,55793                   | 0,0021* |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 3 Hipoxia     | 22,50313   | 7,318235                        | 3,2149                     | 41,79130                   | 0,0028* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 1 Normoxia    | 21,87200   | 7,318235                        | 2,5838                     | 41,16018                   | 0,0037* |
| 1 a 1/2 Hipoxia   | 1 a 3 Hipoxia     | 21,51800   | 7,318235                        | 2,2298                     | 40,80618                   | 0,0042* |
| 1 a 10 Normoxia   | 1 a 1 Hipoxia     | 19,67400   | 7,318235                        | 0,3858                     | 38,96218                   | 0,0087* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 0 Hipoxia     | 18,86350   | 7,318235                        | -0,4247                    | 38,15168                   | 0,0117* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 5 Normoxia    | 18,06588   | 7,318235                        | -1,2223                    | 37,35405                   | 0,0156* |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 1 Hipoxia     | 17,95112   | 7,318235                        | -1,3371                    | 37,23930                   | 0,0162* |
| 1 a 1/2 Hipoxia   | 1 a 1 Hipoxia     | 16,96600   | 7,318235                        | -2,3222                    | 36,25418                   | 0,0229* |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 1/2 Hipoxia   | 16,18750   | 7,318235                        | -3,1007                    | 35,47568                   | 0,0297* |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 3 Normoxia    | 15,20238   | 7,318235                        | -4,0858                    | 34,49055                   | 0,0408* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 1 Normoxia    | 14,13575   | 7,318235                        | -5,1524                    | 33,42393                   | 0,0568  |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 10 Normoxia   | 13,47950   | 7,318235                        | -5,8087                    | 32,76768                   | 0,0690  |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 1/2 Hipoxia   | 12,38138   | 7,318235                        | -6,9068                    | 31,66955                   | 0,0944  |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 3 Normoxia    | 11,39625   | 7,318235                        | -7,8919                    | 30,68443                   | 0,1232  |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 5 Normoxia    | 10,32962   | 7,318235                        | -8,9586                    | 29,61780                   | 0,1618  |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 10 Normoxia   | 9,67338    | 7,318235                        | -9,6148                    | 28,96155                   | 0,1898  |
| 1 a 1 Hipoxia     | 1 a 10 Hipoxia    | 8,44125    | 7,318235                        | -10,8469                   | 27,72943                   | 0,2520  |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 1/2. Normoxia | 7,73625    | 7,318235                        | -11,5519                   | 27,02443                   | 0,2935  |
| 1 a 1 Hipoxia     | 1 a 5 Hipoxia     | 6,30375    | 7,318235                        | -12,9844                   | 25,59193                   | 0,3915  |
| 1 a 1 Hipoxia     | 1 a 3 Hipoxia     | 4,55200    | 7,318235                        | -14,7362                   | 23,84018                   | 0,5356  |
| 1 a 3 Hipoxia     | 1 a 10 Hipoxia    | 3,88925    | 7,318235                        | -15,3989                   | 23,17743                   | 0,5965  |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 1 Normoxia    | 3,80613    | 7,318235                        | -15,4821                   | 23,09430                   | 0,6044  |
| 1 a 10 Normoxia   | 1 a 1/2 Hipoxia   | 2,70800    | 7,318235                        | -16,5802                   | 21,99618                   | 0,7123  |
| 1 a 5 Hipoxia     | 1 a 10 Hipoxia    | 2,13750    | 7,318235                        | -17,1507                   | 21,42568                   | 0,7709  |
| 1 a 3 Hipoxia     | 1 a 5 Hipoxia     | 1,75175    | 7,318235                        | -17,5364                   | 21,03993                   | 0,8114  |
| 1 a 10 Normoxia   | 1 a 3 Normoxia    | 1,72288    | 7,318235                        | -17,5653                   | 21,01105                   | 0,8145  |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 1/2 Hipoxia   | 0,98512    | 7,318235                        | -18,3031                   | 20,27330                   | 0,8932  |

Tabla 1.. Análisis estadístico para el porcentaje de células remanentes, figura 4A. Prueba t de student, n=3.

| Nivel           | - Nivel          | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p |
|-----------------|------------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 1/2 Normoxia | 10,73201   | 20,79829                        | -30,6277                   | 52,09169                   | 0,6072  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 1/2 Normoxia | 10,65428   | 20,79829                        | -30,7054                   | 52,01396                   | 0,6098  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 1/2 Normoxia | 9,49538    | 20,79829                        | -31,8643                   | 50,85505                   | 0,6492  |
| 1 a 1/2 Hipoxia | 1 a 1/2 Normoxia | 8,54497    | 20,79829                        | -32,8147                   | 49,90465                   | 0,6822  |
| 1 a 5 Hipoxia   | 1 a 1/2 Normoxia | 7,50523    | 20,79829                        | -33,8545                   | 48,86490                   | 0,7191  |
| 1 a 1 Normoxia  | 1 a 1/2 Normoxia | 7,07502    | 20,79829                        | -34,2847                   | 48,43469                   | 0,7346  |
| 1 a 3 Normoxia  | 1 a 1/2 Normoxia | 6,97460    | 20,79829                        | -34,3851                   | 48,33428                   | 0,7382  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 5 Normoxia   | 6,46516    | 20,79829                        | -34,8945                   | 47,82483                   | 0,7567  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 5 Normoxia   | 6,38743    | 20,79829                        | -34,9722                   | 47,74710                   | 0,7595  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 10 Hipoxia   | 6,35983    | 20,79829                        | -34,9998                   | 47,71950                   | 0,7605  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 10 Hipoxia   | 6,28210    | 20,79829                        | -35,0776                   | 47,64177                   | 0,7634  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 10 Normoxia  | 5,72615    | 20,79829                        | -35,6335                   | 47,08582                   | 0,7837  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 10 Normoxia  | 5,64842    | 20,79829                        | -35,7113                   | 47,00809                   | 0,7866  |
| 1 a 1 Hipoxia   | 1 a 1/2 Normoxia | 5,62626    | 20,79829                        | -35,7334                   | 46,98593                   | 0,7874  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 5 Normoxia   | 5,22852    | 20,79829                        | -36,1312                   | 46,58820                   | 0,8021  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 10 Hipoxia   | 5,12319    | 20,79829                        | -36,2365                   | 46,48287                   | 0,8060  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 1 Hipoxia    | 5,10575    | 20,79829                        | -36,2539                   | 46,46543                   | 0,8067  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 1 Hipoxia    | 5,02802    | 20,79829                        | -36,3317                   | 46,38770                   | 0,8096  |
| 1 a 10 Normoxia | 1 a 1/2 Normoxia | 5,00586    | 20,79829                        | -36,3538                   | 46,36554                   | 0,8104  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 10 Normoxia  | 4,48951    | 20,79829                        | -36,8702                   | 45,84919                   | 0,8296  |
| 1 a 10 Hipoxia  | 1 a 1/2 Normoxia | 4,37218    | 20,79829                        | -36,9875                   | 45,73186                   | 0,8340  |
| 1 a 1/2 Hipoxia | 1 a 5 Normoxia   | 4,27812    | 20,79829                        | -37,0816                   | 45,63780                   | 0,8375  |
| 1 a 5 Normoxia  | 1 a 1/2 Normoxia | 4,26685    | 20,79829                        | -37,0928                   | 45,62653                   | 0,8379  |
| 1 a 1/2 Hipoxia | 1 a 10 Hipoxia   | 4,17279    | 20,79829                        | -37,1869                   | 45,53247                   | 0,8415  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 1 Hipoxia    | 3,86912    | 20,79829                        | -37,4906                   | 45,22880                   | 0,8529  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 3 Normoxia   | 3,75741    | 20,79829                        | -37,6023                   | 45,11709                   | 0,8571  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 3 Normoxia   | 3,67968    | 20,79829                        | -37,6800                   | 45,03936                   | 0,8600  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 1 Normoxia   | 3,65700    | 20,79829                        | -37,7027                   | 45,01667                   | 0,8608  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 1 Normoxia   | 3,57927    | 20,79829                        | -37,7804                   | 44,93894                   | 0,8638  |
| 1 a 1/2 Hipoxia | 1 a 10 Normoxia  | 3,53911    | 20,79829                        | -37,8206                   | 44,89879                   | 0,8653  |
| 1 a 5 Hipoxia   | 1 a 5 Normoxia   | 3,23837    | 20,79829                        | -38,1213                   | 44,59805                   | 0,8766  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 5 Hipoxia    | 3,22679    | 20,79829                        | -38,1329                   | 44,58646                   | 0,8771  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 5 Hipoxia    | 3,14905    | 20,79829                        | -38,2106                   | 44,50873                   | 0,8800  |
| 1 a 5 Hipoxia   | 1 a 10 Hipoxia   | 3,13304    | 20,79829                        | -38,2266                   | 44,49272                   | 0,8806  |
| 1 a 1/2 Hipoxia | 1 a 1 Hipoxia    | 2,91872    | 20,79829                        | -38,4410                   | 44,27839                   | 0,8887  |
| 1 a 1 Normoxia  | 1 a 5 Normoxia   | 2,80816    | 20,79829                        | -38,5515                   | 44,16784                   | 0,8929  |
| 1 a 3 Normoxia  | 1 a 5 Normoxia   | 2,70775    | 20,79829                        | -38,6519                   | 44,06742                   | 0,8967  |
| 1 a 1 Normoxia  | 1 a 10 Hipoxia   | 2,70283    | 20,79829                        | -38,6568                   | 44,06251                   | 0,8969  |
| 1 a 3 Normoxia  | 1 a 10 Hipoxia   | 2,60242    | 20,79829                        | -38,7573                   | 43,96209                   | 0,9007  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 3 Normoxia   | 2,52078    | 20,79829                        | -38,8389                   | 43,88045                   | 0,9038  |
| 1 a 5 Hipoxia   | 1 a 10 Normoxia  | 2,49936    | 20,79829                        | -38,8603                   | 43,85904                   | 0,9046  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 1 Normoxia   | 2,42036    | 20,79829                        | -38,9393                   | 43,78004                   | 0,9076  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 1/2 Hipoxia  | 2,18704    | 20,79829                        | -39,1726                   | 43,54671                   | 0,9165  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 1/2 Hipoxia  | 2,10931    | 20,79829                        | -39,2504                   | 43,46898                   | 0,9195  |
| 1 a 1 Normoxia  | 1 a 10 Normoxia  | 2,06915    | 20,79829                        | -39,2905                   | 43,42883                   | 0,9210  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 5 Hipoxia    | 1,99015    | 20,79829                        | -39,3695                   | 43,34983                   | 0,9240  |
| 1 a 3 Normoxia  | 1 a 10 Normoxia  | 1,96874    | 20,79829                        | -39,3909                   | 43,32841                   | 0,9248  |
| 1 a 5 Hipoxia   | 1 a 1 Hipoxia    | 1,87897    | 20,79829                        | -39,4807                   | 43,23865                   | 0,9282  |
| 1 a 1/2 Hipoxia | 1 a 3 Normoxia   | 1,57037    | 20,79829                        | -39,7893                   | 42,93005                   | 0,9400  |
| 1 a 1/2 Hipoxia | 1 a 1 Normoxia   | 1,46996    | 20,79829                        | -39,8897                   | 42,82963                   | 0,9438  |
| 1 a 1 Normoxia  | 1 a 1 Hipoxia    | 1,44876    | 20,79829                        | -39,9109                   | 42,80843                   | 0,9446  |
| 1 a 1 Hipoxia   | 1 a 5 Normoxia   | 1,35940    | 20,79829                        | -40,0003                   | 42,71908                   | 0,9480  |
| 1 a 3 Normoxia  | 1 a 1 Hipoxia    | 1,34834    | 20,79829                        | -40,0113                   | 42,70802                   | 0,9485  |
| 1 a 1 Hipoxia   | 1 a 10 Hipoxia   | 1,25407    | 20,79829                        | -40,1056                   | 42,61375                   | 0,9521  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 3 Hipoxia    | 1,23663    | 20,79829                        | -40,1230                   | 42,59631                   | 0,9527  |
| 1 a 0 Hipoxia   | 1 a 3 Hipoxia    | 1,15890    | 20,79829                        | -40,2008                   | 42,51858                   | 0,9557  |
| 1 a 1/2 Hipoxia | 1 a 5 Hipoxia    | 1,03975    | 20,79829                        | -40,3199                   | 42,39942                   | 0,9602  |
| 1 a 3 Hipoxia   | 1 a 1/2 Hipoxia  | 0,95040    | 20,79829                        | -40,4093                   | 42,31008                   | 0,9637  |
| 1 a 10 Normoxia | 1 a 5 Normoxia   | 0,73901    | 20,79829                        | -40,6207                   | 42,09869                   | 0,9717  |
| 1 a 10 Normoxia | 1 a 10 Hipoxia   | 0,63368    | 20,79829                        | -40,7260                   | 41,99336                   | 0,9758  |
| 1 a 1 Hipoxia   | 1 a 10 Normoxia  | 0,62039    | 20,79829                        | -40,7393                   | 41,98007                   | 0,9763  |
| 1 a 5 Hipoxia   | 1 a 3 Normoxia   | 0,53063    | 20,79829                        | -40,8291                   | 41,89030                   | 0,9797  |
| 1 a 5 Hipoxia   | 1 a 1 Normoxia   | 0,43021    | 20,79829                        | -40,9295                   | 41,78989                   | 0,9835  |
| 1 a 10 Hipoxia  | 1 a 5 Normoxia   | 0,10533    | 20,79829                        | -41,2543                   | 41,46501                   | 0,9960  |
| 1 a 1 Normoxia  | 1 a 3 Normoxia   | 0,10041    | 20,79829                        | -41,2593                   | 41,46009                   | 0,9962  |
| 1 a 0 Normoxia  | 1 a 0 Hipoxia    | 0,07773    | 20,79829                        | -41,2819                   | 41,43741                   | 0,9970  |

Tabla 2. Análisis estadístico para el porcentaje de viabilidad, figura 4B. Prueba t de student, n=3.

#### Informe de las diferencias ordenadas

| Nivel                  | - Nivel                | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p |
|------------------------|------------------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 29,99170   | 8,131053                        | 7,8794                     | 52,10397                   | 0,0007* |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 1 vivas hipoxia    | 28,74459   | 8,131053                        | 6,6323                     | 50,85686                   | 0,0011* |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 10 vivas normoxia  | 27,82755   | 8,131053                        | 5,7153                     | 49,93983                   | 0,0016* |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 5 vivas hipoxia    | 26,08177   | 8,131053                        | 3,9695                     | 48,19404                   | 0,0028* |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 10 vivas hipoxia   | 22,73285   | 8,131053                        | 0,6206                     | 44,84513                   | 0,0083* |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 22,27821   | 8,131053                        | 0,1659                     | 44,39049                   | 0,0095* |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 1 vivas hipoxia    | 21,03110   | 8,131053                        | -1,0812                    | 43,14338                   | 0,0139* |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 5 vivas normoxia   | 21,03089   | 8,131053                        | -1,0814                    | 43,14317                   | 0,0139* |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 10 vivas normoxia  | 20,11407   | 8,131053                        | -1,9982                    | 42,22634                   | 0,0182* |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 5 vivas hipoxia    | 18,36829   | 8,131053                        | -3,7440                    | 40,48056                   | 0,0300* |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 3 vivas normoxia   | 17,66874   | 8,131053                        | -4,4435                    | 39,78102                   | 0,0364* |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 15,79244   | 8,131053                        | -6,3198                    | 37,90471                   | 0,0600  |
| 1 a 3 vivas hipoxia    | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 15,41031   | 8,131053                        | -6,7020                    | 37,52258                   | 0,0661  |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 1/2 vivas normoxia | 15,03274   | 8,131053                        | -7,0795                    | 37,14501                   | 0,0727  |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 10 vivas hipoxia   | 15,01937   | 8,131053                        | -7,0929                    | 37,13164                   | 0,0730  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 14,95896   | 8,131053                        | -7,1533                    | 37,07123                   | 0,0741  |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 3 vivas hipoxia    | 14,58139   | 8,131053                        | -7,5309                    | 36,69366                   | 0,0813  |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 3 vivas hipoxia    | 14,54533   | 8,131053                        | -7,5669                    | 36,65760                   | 0,0821  |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 1 vivas normoxia   | 14,19926   | 8,131053                        | -7,9130                    | 36,31153                   | 0,0893  |
| 1 a 3 vivas hipoxia    | 1 a 1 vivas hipoxia    | 14,16320   | 8,131053                        | -7,9491                    | 36,27547                   | 0,0901  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia | 1 a 1 vivas hipoxia    | 13,71185   | 8,131053                        | -8,4004                    | 35,82412                   | 0,1004  |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 10 vivas normoxia  | 13,62830   | 8,131053                        | -8,4840                    | 35,74057                   | 0,1024  |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 5 vivas normoxia   | 13,31741   | 8,131053                        | -8,7949                    | 35,42968                   | 0,1102  |
| 1 a 3 vivas hipoxia    | 1 a 10 vivas normoxia  | 13,24617   | 8,131053                        | -8,8661                    | 35,35844                   | 0,1120  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia | 1 a 10 vivas normoxia  | 12,79482   | 8,131053                        | -9,3175                    | 34,90709                   | 0,1243  |
| 1 a 3 vivas normoxia   | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 12,32295   | 8,131053                        | -9,7893                    | 34,43522                   | 0,1384  |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 5 vivas hipoxia    | 11,88251   | 8,131053                        | -10,2298                   | 33,99478                   | 0,1526  |
| 1 a 3 vivas hipoxia    | 1 a 5 vivas hipoxia    | 11,50038   | 8,131053                        | -10,6119                   | 33,61265                   | 0,1658  |
| 1 a 3 vivas normoxia   | 1 a 1 vivas hipoxia    | 11,07584   | 8,131053                        | -11,0364                   | 33,18812                   | 0,1816  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia | 1 a 5 vivas hipoxia    | 11,04903   | 8,131053                        | -11,0632                   | 33,16131                   | 0,1826  |
| 1 a 3 vivas normoxia   | 1 a 10 vivas normoxia  | 10,15881   | 8,131053                        | -11,9535                   | 32,27108                   | 0,2196  |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 3 vivas normoxia   | 9,95526    | 8,131053                        | -12,1570                   | 32,06753                   | 0,2288  |
| 1 a 5 vivas normoxia   | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 8,96080    | 8,131053                        | -13,1515                   | 31,07307                   | 0,2778  |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 10 vivas hipoxia   | 8,53360    | 8,131053                        | -13,5787                   | 30,64587                   | 0,3009  |
| 1 a 3 vivas normoxia   | 1 a 5 vivas hipoxia    | 8,41302    | 8,131053                        | -13,6992                   | 30,52530                   | 0,3077  |
| 1 a 3 vivas hipoxia    | 1 a 10 vivas hipoxia   | 8,15146    | 8,131053                        | -13,9608                   | 30,26374                   | 0,3228  |
| 1 a 5 vivas normoxia   | 1 a 1 vivas hipoxia    | 7,71369    | 8,131053                        | -14,3986                   | 29,82597                   | 0,3491  |
| 1 a 0 vivas normoxia   | 1 a 0 vivas hipoxia    | 7,71348    | 8,131053                        | -14,3988                   | 29,82576                   | 0,3491  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia | 1 a 0 vivas hipoxia    | 7,70012    | 8,131053                        | -14,4122                   | 29,81239                   | 0,3500  |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 1/2 vivas normoxia | 7,31925    | 8,131053                        | -14,7930                   | 29,43152                   | 0,3740  |
| 1 a 10 vivas hipoxia   | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 7,25884    | 8,131053                        | -14,8534                   | 29,37112                   | 0,3779  |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 3 vivas hipoxia    | 6,86791    | 8,131053                        | -15,2444                   | 28,98018                   | 0,4039  |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 5 vivas normoxia   | 6,83164    | 8,131053                        | -15,2806                   | 28,94391                   | 0,4063  |
| 1 a 5 vivas normoxia   | 1 a 10 vivas normoxia  | 6,79666    | 8,131053                        | -15,3156                   | 28,90893                   | 0,4087  |
| 1 a 0 vivas hipoxia    | 1 a 1 vivas normoxia   | 6,48577    | 8,131053                        | -15,6265                   | 28,59805                   | 0,4303  |
| 1 a 3 vivas hipoxia    | 1 a 5 vivas normoxia   | 6,44951    | 8,131053                        | -15,6628                   | 28,56178                   | 0,4329  |
| 1 a 10 vivas hipoxia   | 1 a 1 vivas hipoxia    | 6,01173    | 8,131053                        | -16,1005                   | 28,12401                   | 0,4645  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia | 1 a 5 vivas normoxia   | 5,99816    | 8,131053                        | -16,1141                   | 28,11043                   | 0,4655  |
| 1 a 10 vivas hipoxia   | 1 a 10 vivas normoxia  | 5,09470    | 8,131053                        | -17,0176                   | 27,20698                   | 0,5349  |
| 1 a 3 vivas normoxia   | 1 a 10 vivas hipoxia   | 5,06411    | 8,131053                        | -17,0482                   | 27,17638                   | 0,5373  |
| 1 a 5 vivas normoxia   | 1 a 5 vivas hipoxia    | 5,05087    | 8,131053                        | -17,0614                   | 27,16315                   | 0,5384  |
| 1 a 5 vivas hipoxia    | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 3,90993    | 8,131053                        | -18,2023                   | 26,02220                   | 0,6335  |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 3 vivas normoxia   | 3,46949    | 8,131053                        | -18,6428                   | 25,58176                   | 0,6721  |
| 1 a 3 vivas normoxia   | 1 a 5 vivas normoxia   | 3,36215    | 8,131053                        | -18,7501                   | 25,47442                   | 0,6817  |
| 1 a 10 vivas hipoxia   | 1 a 5 vivas hipoxia    | 3,34892    | 8,131053                        | -18,7634                   | 25,46119                   | 0,6829  |
| 1 a 3 vivas hipoxia    | 1 a 3 vivas normoxia   | 3,08736    | 8,131053                        | -19,0249                   | 25,19963                   | 0,7064  |
| 1 a 5 vivas hipoxia    | 1 a 1 vivas hipoxia    | 2,66282    | 8,131053                        | -19,4495                   | 24,77509                   | 0,7452  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia | 1 a 3 vivas normoxia   | 2,63601    | 8,131053                        | -19,4763                   | 24,74828                   | 0,7477  |
| 1 a 10 vivas normoxia  | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 2,16414    | 8,131053                        | -19,9481                   | 24,27641                   | 0,7916  |
| 1 a 5 vivas hipoxia    | 1 a 10 vivas normoxia  | 1,74579    | 8,131053                        | -20,3665                   | 23,85806                   | 0,8312  |
| 1 a 5 vivas normoxia   | 1 a 10 vivas hipoxia   | 1,70196    | 8,131053                        | -20,4103                   | 23,81423                   | 0,8354  |
| 1 a 1 vivas hipoxia    | 1 a 1/2 vivas hipoxia  | 1,24711    | 8,131053                        | -20,8652                   | 23,35938                   | 0,8790  |
| 1 a 10 vivas normoxia  | 1 a 1 vivas hipoxia    | 0,91703    | 8,131053                        | -21,1952                   | 23,02931                   | 0,9108  |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 1/2 vivas normoxia | 0,83348    | 8,131053                        | -21,2788                   | 22,94575                   | 0,9189  |
| 1 a 3 vivas hipoxia    | 1 a 1/2 vivas normoxia | 0,45135    | 8,131053                        | -21,6609                   | 22,56362                   | 0,9560  |
| 1 a 1 vivas normoxia   | 1 a 3 vivas hipoxia    | 0,38213    | 8,131053                        | -21,7301                   | 22,49440                   | 0,9628  |

Tabla 3. Análisis estadístico para los diferentes tratamientos del porcentaje de células vivas vistas por citometría de flujo, figura 6. Prueba t de student, n=4.

Informe de las diferencias ordenadas

| Nivel                               | - Nivel                             | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 23,47997   | 6,483498                        | 5,8482                     | 41,11174                   | 0,0009* |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 20,80947   | 6,483498                        | 3,1777                     | 38,44124                   | 0,0028* |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 20,55478   | 6,483498                        | 2,9230                     | 38,18656                   | 0,0031* |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 17,88428   | 6,483498                        | 0,2525                     | 35,51606                   | 0,0091* |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 15,48643   | 6,483498                        | -2,1453                    | 33,11821                   | 0,0223* |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 14,89054   | 6,483498                        | -2,7412                    | 32,52231                   | 0,0276* |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 14,57104   | 6,483498                        | -3,0607                    | 32,20282                   | 0,0306* |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 14,06560   | 6,483498                        | -3,5662                    | 31,69737                   | 0,0367* |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 13,83322   | 6,483498                        | -3,7986                    | 31,46499                   | 0,0398* |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 13,27876   | 6,483498                        | -4,3530                    | 30,91053                   | 0,0479* |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 12,56125   | 6,483498                        | -5,0705                    | 30,19302                   | 0,0606  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 12,26004   | 6,483498                        | -5,3717                    | 29,89181                   | 0,0667  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 11,96535   | 6,483498                        | -5,6664                    | 29,59713                   | 0,0732  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 11,90054   | 6,483498                        | -5,7312                    | 29,53232                   | 0,0747  |
| 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 11,81194   | 6,483498                        | -5,8198                    | 29,44371                   | 0,0768  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 11,66803   | 6,483498                        | -5,9637                    | 29,29980                   | 0,0803  |
| 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 11,21993   | 6,483498                        | -6,4118                    | 28,85170                   | 0,0921  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 11,16272   | 6,483498                        | -6,4691                    | 28,79449                   | 0,0937  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 11,14042   | 6,483498                        | -6,4914                    | 28,77219                   | 0,0943  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 10,35358   | 6,483498                        | -7,2782                    | 27,98535                   | 0,1190  |
| 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 10,20121   | 6,483498                        | -7,4306                    | 27,83298                   | 0,1244  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 9,64675    | 6,483498                        | -7,9850                    | 27,27853                   | 0,1455  |
| 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 9,41437    | 6,483498                        | -8,2174                    | 27,04614                   | 0,1551  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 9,33486    | 6,483498                        | -8,2969                    | 26,96663                   | 0,1586  |
| 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 9,14144    | 6,483498                        | -8,4903                    | 26,77321                   | 0,1671  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 8,90892    | 6,483498                        | -8,7229                    | 26,54070                   | 0,1779  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 8,74284    | 6,483498                        | -8,8889                    | 26,37462                   | 0,1859  |
| 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 8,58943    | 6,483498                        | -9,0423                    | 26,22121                   | 0,1936  |
| 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 8,54943    | 6,483498                        | -9,0823                    | 26,18120                   | 0,1956  |
| 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 7,99353    | 6,483498                        | -9,6382                    | 25,62531                   | 0,2256  |
| 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 7,53071    | 6,483498                        | -10,1011                   | 25,16248                   | 0,2531  |
| 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 6,74387    | 6,483498                        | -10,8879                   | 24,37564                   | 0,3052  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 6,72157    | 6,483498                        | -10,9102                   | 24,35334                   | 0,3068  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 6,57751    | 6,483498                        | -11,0543                   | 24,20928                   | 0,3171  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 5,98374    | 6,483498                        | -11,6480                   | 23,61551                   | 0,3622  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 5,98161    | 6,483498                        | -11,6502                   | 23,61339                   | 0,3624  |
| 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 5,91893    | 6,483498                        | -11,7128                   | 23,55071                   | 0,3674  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 5,83968    | 6,483498                        | -11,7921                   | 23,47146                   | 0,3737  |
| 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 5,32303    | 6,483498                        | -12,3087                   | 22,95481                   | 0,4170  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 5,24378    | 6,483498                        | -12,3880                   | 22,87556                   | 0,4239  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 5,15668    | 6,483498                        | -12,4751                   | 22,78845                   | 0,4316  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 4,41885    | 6,483498                        | -13,2129                   | 22,05062                   | 0,4999  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 4,36984    | 6,483498                        | -13,2619                   | 22,00161                   | 0,5046  |
| 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 3,81841    | 6,483498                        | -13,8134                   | 21,45018                   | 0,5596  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 3,63201    | 6,483498                        | -13,9998                   | 21,26378                   | 0,5788  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 3,35112    | 6,483498                        | -14,2807                   | 20,98289                   | 0,6084  |
| 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 3,22639    | 6,483498                        | -14,4054                   | 20,85817                   | 0,6218  |
| 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 3,22251    | 6,483498                        | -14,4093                   | 20,85428                   | 0,6222  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 2,92518    | 6,483498                        | -14,7066                   | 20,55696                   | 0,6546  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 2,75910    | 6,483498                        | -14,8727                   | 20,39088                   | 0,6730  |
| 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 2,67050    | 6,483498                        | -14,9613                   | 20,30227                   | 0,6829  |
| 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 2,63050    | 6,483498                        | -15,0013                   | 20,26227                   | 0,6873  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 2,61329    | 6,483498                        | -15,0185                   | 20,24506                   | 0,6893  |
| 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 2,39757    | 6,483498                        | -15,2342                   | 20,02935                   | 0,7137  |
| 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 2,20767    | 6,483498                        | -15,4241                   | 19,83945                   | 0,7355  |

Tabla 4. Análisis estadístico para los diferentes tratamientos del porcentaje de células en apoptosis temprana vistas por citometría de flujo, figura 6. Prueba t de student, n=4.

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

**Informe de las diferencias ordenadas**

| Nivel   | - Nivel                   | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p  |          |         |
|---------|---------------------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|----------|---------|
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 11,24405                   | 3,106572                   | 2,79578  | 19,69233 | 0,0009* |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 0      | apoptosis tardía hipoxia        | 10,52944                   | 3,106572                   | 2,08117  | 18,97772 | 0,0017* |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 1/2    | apoptosis tardía normoxia       | 9,10988                    | 3,106572                   | 0,66160  | 17,55815 | 0,0058* |
| 1 a 10  | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 8,41060                    | 3,106572                   | -0,03767 | 16,85887 | 0,0103* |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 1      | apoptosis tardía normoxia       | 7,99868                    | 3,106572                   | -0,44959 | 16,44696 | 0,0143* |
| 1 a 10  | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía hipoxia        | 7,69599                    | 3,106572                   | -0,75228 | 16,14426 | 0,0181* |
| 1 a 1   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 7,61810                    | 3,106572                   | -0,83018 | 16,06637 | 0,0192* |
| 1 a 1   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía hipoxia        | 6,90349                    | 3,106572                   | -1,54479 | 15,35176 | 0,0326* |
| 1 a 5   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 6,89148                    | 3,106572                   | -1,55679 | 15,33976 | 0,0329* |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 3      | apoptosis tardía normoxia       | 6,58558                    | 3,106572                   | -1,86270 | 15,03385 | 0,0410* |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 3      | apoptosis tardía hipoxia        | 6,51229                    | 3,106572                   | -1,93598 | 14,96057 | 0,0431* |
| 1 a 1/2 | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 6,39336                    | 3,106572                   | -2,05491 | 14,84163 | 0,0469* |
| 1 a 5   | apoptosis tardía normoxia | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 6,35718                    | 3,106572                   | -2,09109 | 14,80545 | 0,0481* |
| 1 a 10  | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 1/2    | apoptosis tardía normoxia       | 6,27643                    | 3,106572                   | -2,17185 | 14,72470 | 0,0508  |
| 1 a 5   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía hipoxia        | 6,17688                    | 3,106572                   | -2,27140 | 14,62515 | 0,0544  |
| 1 a 1/2 | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía hipoxia        | 5,67875                    | 3,106572                   | -2,76952 | 14,12702 | 0,0758  |
| 1 a 5   | apoptosis tardía normoxia | 1 a 0      | apoptosis tardía hipoxia        | 5,64257                    | 3,106572                   | -2,80570 | 14,09084 | 0,0777  |
| 1 a 1   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 1/2    | apoptosis tardía normoxia       | 5,48392                    | 3,106572                   | -2,96435 | 13,93220 | 0,0860  |
| 1 a 10  | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 1      | apoptosis tardía normoxia       | 5,16523                    | 3,106572                   | -3,28304 | 13,61351 | 0,1051  |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 5      | apoptosis tardía normoxia       | 4,88687                    | 3,106572                   | -3,56140 | 13,33515 | 0,1244  |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 1/2    | apoptosis tardía hipoxia        | 4,85069                    | 3,106572                   | -3,59758 | 13,29897 | 0,1272  |
| 1 a 5   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 1/2    | apoptosis tardía normoxia       | 4,75731                    | 3,106572                   | -3,69096 | 13,20558 | 0,1344  |
| 1 a 3   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 4,73176                    | 3,106572                   | -3,71651 | 13,18003 | 0,1365  |
| 1 a 3   | apoptosis tardía normoxia | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 4,65847                    | 3,106572                   | -3,78980 | 13,10675 | 0,1424  |
| 1 a 1   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 1      | apoptosis tardía normoxia       | 4,37273                    | 3,106572                   | -4,07554 | 12,82100 | 0,1678  |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 5      | apoptosis tardía hipoxia        | 4,35257                    | 3,106572                   | -4,09571 | 12,80084 | 0,1698  |
| 1 a 1/2 | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 1/2    | apoptosis tardía normoxia       | 4,25919                    | 3,106572                   | -4,18909 | 12,70746 | 0,1789  |
| 1 a 5   | apoptosis tardía normoxia | 1 a 1/2    | apoptosis tardía normoxia       | 4,22301                    | 3,106572                   | -4,22527 | 12,67128 | 0,1825  |
| 1 a 3   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 0      | apoptosis tardía hipoxia        | 4,01715                    | 3,106572                   | -4,43112 | 12,46542 | 0,2042  |
| 1 a 3   | apoptosis tardía normoxia | 1 a 0      | apoptosis tardía hipoxia        | 3,94386                    | 3,106572                   | -4,50441 | 12,39214 | 0,2124  |
| 1 a 10  | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 3      | apoptosis tardía normoxia       | 3,75213                    | 3,106572                   | -4,69615 | 12,20040 | 0,2350  |
| 1 a 10  | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 3      | apoptosis tardía hipoxia        | 3,67884                    | 3,106572                   | -4,76943 | 12,12711 | 0,2441  |
| 1 a 5   | apoptosis tardía hipoxia  | 1 a 1      | apoptosis tardía normoxia       | 3,64612                    | 3,106572                   | -4,80216 | 12,09439 | 0,2482  |
| 1 a 10  | apoptosis tardía normoxia | 1 a 1      | apoptosis tardía hipoxia        | 3,62595                    | 3,106572                   | -4,82232 | 12,07423 | 0,2508  |
| 1 a 1   | apoptosis tardía normoxia | 1 a 0      | apoptosis tardía normoxia       | 3,24537                    | 3,106572                   | -5,20291 | 11,69364 | 0,3031  |

**Tabla 5. Análisis estadístico para los diferentes tratamientos del porcentaje de células en apoptosis tardía vistas por citometría de flujo, figura 6. Prueba t de student, n=4.**

**Informe de las diferencias ordenadas**

| Nivel  | - Nivel           | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p  |          |        |
|--------|-------------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|----------|--------|
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 1/2    | Necrosis normoxia               | 8,113784                   | 4,128674                   | -0,25955 | 16,48712 | 0,0571 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 0      | Necrosis normoxia               | 7,179129                   | 4,128674                   | -1,19421 | 15,55247 | 0,0906 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 1/2    | Necrosis hipoxia                | 7,060760                   | 4,128674                   | -1,31258 | 15,43410 | 0,0958 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 1      | Necrosis hipoxia                | 6,607423                   | 4,128674                   | -1,76592 | 14,98076 | 0,1183 |
| 1 a 10 | Necrosis normoxia | 1 a 0      | Necrosis hipoxia                | 5,766223                   | 4,128674                   | -2,60712 | 14,13956 | 0,1711 |
| 1 a 10 | Necrosis normoxia | 1 a 1/2    | Necrosis normoxia               | 5,706218                   | 4,128674                   | -2,66712 | 14,07956 | 0,1755 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 1      | Necrosis normoxia               | 5,639607                   | 4,128674                   | -2,73373 | 14,01295 | 0,1804 |
| 1 a 5  | Necrosis hipoxia  | 1 a 0      | Necrosis hipoxia                | 5,613900                   | 4,128674                   | -2,75944 | 13,98724 | 0,1824 |
| 1 a 5  | Necrosis hipoxia  | 1 a 1/2    | Necrosis normoxia               | 5,553895                   | 4,128674                   | -2,81944 | 13,92723 | 0,1870 |
| 1 a 5  | Necrosis normoxia | 1 a 0      | Necrosis hipoxia                | 5,467167                   | 4,128674                   | -2,90617 | 13,84051 | 0,1938 |
| 1 a 3  | Necrosis normoxia | 1 a 0      | Necrosis hipoxia                | 5,415499                   | 4,128674                   | -2,95784 | 13,78884 | 0,1979 |
| 1 a 5  | Necrosis normoxia | 1 a 1/2    | Necrosis normoxia               | 5,407162                   | 4,128674                   | -2,96618 | 13,78050 | 0,1986 |
| 1 a 3  | Necrosis normoxia | 1 a 1/2    | Necrosis normoxia               | 5,355494                   | 4,128674                   | -3,01784 | 13,72883 | 0,2028 |
| 1 a 10 | Necrosis normoxia | 1 a 0      | Necrosis normoxia               | 4,771562                   | 4,128674                   | -3,60178 | 13,14490 | 0,2554 |
| 1 a 10 | Necrosis normoxia | 1 a 1/2    | Necrosis hipoxia                | 4,653194                   | 4,128674                   | -3,72015 | 13,02653 | 0,2672 |
| 1 a 5  | Necrosis hipoxia  | 1 a 0      | Necrosis normoxia               | 4,619240                   | 4,128674                   | -3,75410 | 12,99258 | 0,2706 |
| 1 a 5  | Necrosis hipoxia  | 1 a 1/2    | Necrosis hipoxia                | 4,500871                   | 4,128674                   | -3,87247 | 12,87421 | 0,2829 |
| 1 a 5  | Necrosis normoxia | 1 a 0      | Necrosis normoxia               | 4,472507                   | 4,128674                   | -3,90083 | 12,84585 | 0,2859 |
| 1 a 3  | Necrosis normoxia | 1 a 0      | Necrosis normoxia               | 4,420839                   | 4,128674                   | -3,95250 | 12,79418 | 0,2914 |
| 1 a 5  | Necrosis normoxia | 1 a 1/2    | Necrosis hipoxia                | 4,354138                   | 4,128674                   | -4,01920 | 12,72748 | 0,2986 |
| 1 a 3  | Necrosis normoxia | 1 a 1/2    | Necrosis hipoxia                | 4,302470                   | 4,128674                   | -4,07087 | 12,67581 | 0,3043 |
| 1 a 10 | Necrosis normoxia | 1 a 1      | Necrosis hipoxia                | 4,199856                   | 4,128674                   | -4,17348 | 12,57320 | 0,3158 |
| 1 a 10 | Necrosis hipoxia  | 1 a 0      | Necrosis hipoxia                | 4,096986                   | 4,128674                   | -4,27635 | 12,47032 | 0,3277 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 10     | Necrosis hipoxia                | 4,076803                   | 4,128674                   | -4,29654 | 12,45014 | 0,3300 |
| 1 a 5  | Necrosis hipoxia  | 1 a 1      | Necrosis hipoxia                | 4,047534                   | 4,128674                   | -4,32581 | 12,42087 | 0,3335 |
| 1 a 10 | Necrosis hipoxia  | 1 a 1/2    | Necrosis normoxia               | 4,036981                   | 4,128674                   | -4,33636 | 12,41032 | 0,3347 |
| 1 a 5  | Necrosis normoxia | 1 a 1      | Necrosis hipoxia                | 3,900801                   | 4,128674                   | -4,47254 | 12,27414 | 0,3511 |
| 1 a 3  | Necrosis normoxia | 1 a 1      | Necrosis hipoxia                | 3,849133                   | 4,128674                   | -4,52421 | 12,22247 | 0,3574 |
| 1 a 10 | Necrosis normoxia | 1 a 1      | Necrosis normoxia               | 3,232040                   | 4,128674                   | -5,14130 | 11,60538 | 0,4388 |
| 1 a 10 | Necrosis hipoxia  | 1 a 0      | Necrosis normoxia               | 3,102325                   | 4,128674                   | -5,27101 | 11,47566 | 0,4573 |
| 1 a 5  | Necrosis hipoxia  | 1 a 1      | Necrosis normoxia               | 3,079718                   | 4,128674                   | -5,29362 | 11,45306 | 0,4606 |
| 1 a 10 | Necrosis hipoxia  | 1 a 1/2    | Necrosis hipoxia                | 2,983957                   | 4,128674                   | -5,38938 | 11,35730 | 0,4745 |
| 1 a 5  | Necrosis normoxia | 1 a 1      | Necrosis normoxia               | 2,932985                   | 4,128674                   | -5,44035 | 11,30632 | 0,4820 |
| 1 a 3  | Necrosis normoxia | 1 a 1      | Necrosis normoxia               | 2,881317                   | 4,128674                   | -5,49202 | 11,25466 | 0,4897 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 3      | Necrosis normoxia               | 2,758290                   | 4,128674                   | -5,61505 | 11,13163 | 0,5083 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 5      | Necrosis normoxia               | 2,706622                   | 4,128674                   | -5,66672 | 11,07996 | 0,5163 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 5      | Necrosis hipoxia                | 2,559889                   | 4,128674                   | -5,81345 | 10,93323 | 0,5391 |
| 1 a 1  | Necrosis normoxia | 1 a 0      | Necrosis hipoxia                | 2,534182                   | 4,128674                   | -5,83916 | 10,90752 | 0,5432 |
| 1 a 10 | Necrosis hipoxia  | 1 a 1      | Necrosis hipoxia                | 2,530619                   | 4,128674                   | -5,84272 | 10,90396 | 0,5438 |
| 1 a 1  | Necrosis normoxia | 1 a 1/2    | Necrosis normoxia               | 2,474177                   | 4,128674                   | -5,89916 | 10,84752 | 0,5527 |
| 1 a 3  | Necrosis hipoxia  | 1 a 10     | Necrosis normoxia               | 2,407566                   | 4,128674                   | -5,96577 | 10,78091 | 0,5634 |
| 1 a 10 | Necrosis normoxia | 1 a 10     | Necrosis hipoxia                | 1,669237                   | 4,128674                   | -6,70410 | 10,04258 | 0,6884 |
| 1 a 10 | Necrosis normoxia | 1 a 0      | Necrosis hipoxia                | 1,666266                   | 4,128674                   | -6,69677 | 9,99071  | 0,7066 |

**Tabla 6. Análisis estadístico para los diferentes tratamientos del porcentaje de células en necrosis vistas por citometría de flujo, figura 6. Prueba t de student, n=4.**

| Nivel                               | - Nivel                             | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p |  |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|--|
| 1 a 0 vivas normoxia                | 1 a 0 apoptosis tardía normoxia     | 82,28750   | 2,162850                        | 77,5751                    | 86,99994                   | <.0001* |  |
| 1 a 0 vivas normoxia                | 1 a 0 Necrosis normoxia             | 78,01357   | 2,162850                        | 73,3011                    | 82,72601                   | <.0001* |  |
| 1 a 0 vivas normoxia                | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 76,79888   | 2,162850                        | 72,0864                    | 81,51133                   | <.0001* |  |
| 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 0 apoptosis tardía normoxia     | 5,48861    | 2,162850                        | 0,7762                     | 10,20106                   | 0,0260* |  |
| 1 a 0 Necrosis normoxia             | 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 4,27393    | 2,162850                        | -0,4385                    | 8,98638                    | 0,0716  |  |
| 1 a 0 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 0 Necrosis normoxia             | 1,21468    | 2,162850                        | -3,4978                    | 5,92713                    | 0,5847  |  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia              | 1 a 1/2 apoptosis tardía normoxia   | 65,12059   | 4,582909                        | 55,1353                    | 75,10589                   | <.0001* |  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia              | 1 a 1/2 Necrosis normoxia           | 63,91549   | 4,582909                        | 53,9302                    | 73,90079                   | <.0001* |  |
| 1 a 1/2 vivas normoxia              | 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 47,93293   | 4,582909                        | 37,9476                    | 57,91823                   | <.0001* |  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 1 a 1/2 apoptosis tardía normoxia   | 17,18766   | 4,582909                        | 7,2024                     | 27,17296                   | 0,0028* |  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana normoxia | 1 a 1/2 Necrosis normoxia           | 15,98256   | 4,582909                        | 5,9973                     | 25,96786                   | 0,0045* |  |
| 1 a 1/2 Necrosis normoxia           | 1 a 1/2 apoptosis tardía normoxia   | 1,20510    | 4,582909                        | -8,7802                    | 11,19040                   | 0,7970  |  |
| 1 a 1 vivas normoxia                | 1 a 1 apoptosis tardía normoxia     | 64,84287   | 3,949877                        | 56,2368                    | 73,44892                   | <.0001* |  |
| 1 a 1 vivas normoxia                | 1 a 1 Necrosis normoxia             | 62,27479   | 3,949877                        | 53,6687                    | 70,88083                   | <.0001* |  |
| 1 a 1 vivas normoxia                | 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 53,18526   | 3,949877                        | 44,5792                    | 61,79130                   | <.0001* |  |
| 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 1 apoptosis tardía normoxia     | 11,65762   | 3,949877                        | 3,0516                     | 20,26366                   | 0,0121* |  |
| 1 a 1 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 1 Necrosis normoxia             | 9,08953    | 3,949877                        | 0,4835                     | 17,69557                   | 0,0401* |  |
| 1 a 1 Necrosis normoxia             | 1 a 1 apoptosis tardía normoxia     | 2,56809    | 3,949877                        | -6,0380                    | 11,17413                   | 0,5278  |  |
| 1 a 3 vivas normoxia                | 1 a 3 apoptosis tardía normoxia     | 59,96028   | 7,923008                        | 42,6975                    | 77,22303                   | <.0001* |  |
| 1 a 3 vivas normoxia                | 1 a 3 Necrosis normoxia             | 55,92398   | 7,923008                        | 38,6612                    | 73,18674                   | <.0001* |  |
| 1 a 3 vivas normoxia                | 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 50,54071   | 7,923008                        | 33,2780                    | 67,80346                   | <.0001* |  |
| 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 3 apoptosis tardía normoxia     | 9,41957    | 7,923008                        | -7,8432                    | 26,68232                   | 0,2575  |  |
| 1 a 3 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 3 Necrosis normoxia             | 5,38328    | 7,923008                        | -11,8795                   | 22,64603                   | 0,5097  |  |
| 1 a 3 Necrosis normoxia             | 1 a 3 apoptosis tardía normoxia     | 4,03630    | 7,923008                        | -13,2265                   | 21,29905                   | 0,6197  |  |
| 1 a 5 vivas normoxia                | 1 a 5 apoptosis tardía normoxia     | 54,89942   | 6,004366                        | 41,8170                    | 67,98181                   | <.0001* |  |
| 1 a 5 vivas normoxia                | 1 a 5 Necrosis normoxia             | 52,51017   | 6,004366                        | 39,4278                    | 65,59256                   | <.0001* |  |
| 1 a 5 vivas normoxia                | 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 45,56678   | 6,004366                        | 32,4844                    | 58,64917                   | <.0001* |  |
| 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 5 apoptosis tardía normoxia     | 9,33264    | 6,004366                        | -3,7497                    | 22,41503                   | 0,1461  |  |
| 1 a 5 apoptosis temprana normoxia   | 1 a 5 Necrosis normoxia             | 6,94338    | 6,004366                        | -6,1390                    | 20,02577                   | 0,2700  |  |
| 1 a 5 Necrosis normoxia             | 1 a 5 apoptosis tardía normoxia     | 2,38926    | 6,004366                        | -10,6931                   | 15,47165                   | 0,6977  |  |
| 1 a 10 vivas normoxia               | 1 a 10 Necrosis normoxia            | 45,41445   | 6,044622                        | 32,2444                    | 58,58455                   | <.0001* |  |
| 1 a 10 vivas normoxia               | 1 a 10 apoptosis tardía normoxia    | 43,21589   | 6,044622                        | 30,0458                    | 56,38599                   | <.0001* |  |
| 1 a 10 vivas normoxia               | 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 37,15939   | 6,044622                        | 23,9893                    | 50,32949                   | <.0001* |  |
| 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 1 a 10 Necrosis normoxia            | 8,25506    | 6,044622                        | -4,9150                    | 21,42516                   | 0,1971  |  |
| 1 a 10 apoptosis temprana normoxia  | 1 a 10 apoptosis tardía normoxia    | 6,05650    | 6,044622                        | -7,1136                    | 19,22660                   | 0,3361  |  |
| 1 a 10 apoptosis tardía normoxia    | 1 a 10 Necrosis normoxia            | 2,19856    | 6,044622                        | -10,9715                   | 15,36866                   | 0,7224  |  |
| 1 a 0 vivas hipoxia                 | 1 a 0 apoptosis tardía hipoxia      | 73,85941   | 6,070216                        | 60,6335                    | 87,08527                   | <.0001* |  |
| 1 a 0 vivas hipoxia                 | 1 a 0 Necrosis hipoxia              | 71,29475   | 6,070216                        | 58,0689                    | 84,52061                   | <.0001* |  |
| 1 a 0 vivas hipoxia                 | 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 61,09187   | 6,070216                        | 47,8660                    | 74,31773                   | <.0001* |  |
| 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 0 apoptosis tardía hipoxia      | 12,76754   | 6,070216                        | -0,4583                    | 25,99340                   | 0,0572  |  |
| 1 a 0 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 0 Necrosis hipoxia              | 10,20288   | 6,070216                        | -3,0230                    | 23,42874                   | 0,1186  |  |
| 1 a 0 Necrosis hipoxia              | 1 a 0 apoptosis tardía hipoxia      | 2,56466    | 6,070216                        | -10,6612                   | 15,79052                   | 0,6801  |  |
| 1 a 1/2 vivas hipoxia               | 1 a 1/2 Necrosis hipoxia            | 47,90350   | 4,026643                        | 39,1302                    | 56,67680                   | <.0001* |  |
| 1 a 1/2 vivas hipoxia               | 1 a 1/2 apoptosis tardía hipoxia    | 45,90244   | 4,026643                        | 37,1291                    | 54,67574                   | <.0001* |  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 1/2 Necrosis hipoxia            | 24,57628   | 4,026643                        | 15,8030                    | 33,34958                   | <.0001* |  |
| 1 a 1/2 vivas hipoxia               | 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 23,32722   | 4,026643                        | 14,5539                    | 32,10052                   | <.0001* |  |
| 1 a 1/2 apoptosis temprana hipoxia  | 1 a 1/2 apoptosis tardía hipoxia    | 22,57522   | 4,026643                        | 13,8019                    | 31,34852                   | 0,0001* |  |
| 1 a 1/2 apoptosis tardía hipoxia    | 1 a 1/2 Necrosis hipoxia            | 2,00106    | 4,026643                        | -6,7722                    | 10,77436                   | 0,6282  |  |
| 1 a 1 vivas hipoxia                 | 1 a 1 Necrosis hipoxia              | 48,69728   | 5,207263                        | 37,3516                    | 60,04293                   | <.0001* |  |
| 1 a 1 vivas hipoxia                 | 1 a 1 apoptosis tardía hipoxia      | 45,92481   | 5,207263                        | 34,5792                    | 57,27047                   | <.0001* |  |
| 1 a 1 vivas hipoxia                 | 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 27,49951   | 5,207263                        | 16,1539                    | 38,84516                   | 0,0002* |  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 1 Necrosis hipoxia              | 21,19776   | 5,207263                        | 9,8521                     | 32,54341                   | 0,0016* |  |
| 1 a 1 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 1 apoptosis tardía hipoxia      | 18,42530   | 5,207263                        | 7,0797                     | 29,77095                   | 0,0041* |  |
| 1 a 1 apoptosis tardía hipoxia      | 1 a 1 Necrosis hipoxia              | 2,77246    | 5,207263                        | -8,5732                    | 14,11811                   | 0,6042  |  |
| 1 a 3 vivas hipoxia                 | 1 a 3 apoptosis tardía hipoxia      | 62,97435   | 6,353454                        | 49,1314                    | 76,81734                   | <.0001* |  |
| 1 a 3 vivas hipoxia                 | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 59,54700   | 6,353454                        | 45,7040                    | 73,38998                   | <.0001* |  |
| 1 a 3 vivas hipoxia                 | 1 a 3 Necrosis hipoxia              | 56,25305   | 6,353454                        | 42,4101                    | 70,09604                   | <.0001* |  |
| 1 a 3 Necrosis hipoxia              | 1 a 3 apoptosis tardía hipoxia      | 6,72130    | 6,353454                        | -7,1217                    | 20,56429                   | 0,3109  |  |
| 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 3 apoptosis tardía hipoxia      | 3,42735    | 6,353454                        | -10,4156                   | 17,27034                   | 0,5994  |  |
| 1 a 3 Necrosis hipoxia              | 1 a 3 apoptosis temprana hipoxia    | 3,29394    | 6,353454                        | -10,5490                   | 17,13693                   | 0,6136  |  |
| 1 a 5 vivas hipoxia                 | 1 a 5 apoptosis tardía hipoxia      | 49,31424   | 7,028807                        | 33,9998                    | 64,62870                   | <.0001* |  |
| 1 a 5 vivas hipoxia                 | 1 a 5 Necrosis hipoxia              | 47,31256   | 7,028807                        | 31,9981                    | 62,62701                   | <.0001* |  |
| 1 a 5 vivas hipoxia                 | 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 36,14607   | 7,028807                        | 20,8316                    | 51,46053                   | 0,0002* |  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 5 apoptosis tardía hipoxia      | 13,16817   | 7,028807                        | -2,1463                    | 28,48263                   | 0,0856  |  |
| 1 a 5 apoptosis temprana hipoxia    | 1 a 5 Necrosis hipoxia              | 11,16649   | 7,028807                        | -4,1480                    | 26,48094                   | 0,1381  |  |
| 1 a 5 Necrosis hipoxia              | 1 a 5 apoptosis tardía hipoxia      | 2,00168    | 7,028807                        | -13,3128                   | 17,31614                   | 0,7807  |  |
| 1 a 10 vivas hipoxia                | 1 a 10 Necrosis hipoxia             | 52,17839   | 7,612204                        | 35,5928                    | 68,76396                   | <.0001* |  |
| 1 a 10 vivas hipoxia                | 1 a 10 apoptosis tardía hipoxia     | 51,14405   | 7,612204                        | 34,5585                    | 67,72961                   | <.0001* |  |
| 1 a 10 vivas hipoxia                | 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 42,84610   | 7,612204                        | 26,2605                    | 59,43167                   | 0,0001* |  |
| 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 1 a 10 Necrosis hipoxia             | 9,33229    | 7,612204                        | -7,2533                    | 25,91785                   | 0,2437  |  |
| 1 a 10 apoptosis temprana hipoxia   | 1 a 10 apoptosis tardía hipoxia     | 8,29794    | 7,612204                        | -8,2876                    | 24,88351                   | 0,2971  |  |
| 1 a 10 apoptosis tardía hipoxia     | 1 a 10 Necrosis hipoxia             | 1,03434    | 7,612204                        | -15,5512                   | 17,61991                   | 0,8942  |  |

Tabla 7. Análisis estadístico comparando los diferentes estadios de viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis para cada relación de forma individual, figura 6. Prueba t de student, n=4.

#### Informe de las diferencias ordenadas

| Nivel            | - Nivel         | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p |
|------------------|-----------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 0 Normoxia  | 0,0849271  | 0,0245709                       | 0,018107                   | 0,1517473                  | 0,0014* |
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0762500  | 0,0245709                       | 0,009430                   | 0,1430702                  | 0,0037* |
| 1 a 1/2 Normoxia | 1 a 0 Normoxia  | 0,0749271  | 0,0245709                       | 0,008107                   | 0,1417473                  | 0,0043* |
| 1 a 1 Hipoxia    | 1 a 0 Normoxia  | 0,0741771  | 0,0245709                       | 0,007357                   | 0,1409973                  | 0,0046* |
| 1 a 1/2 Normoxia | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0662500  | 0,0245709                       | -0,000570                  | 0,1330702                  | 0,0106* |
| 1 a 1 Hipoxia    | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0655000  | 0,0245709                       | -0,001320                  | 0,1323202                  | 0,0114* |
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 10 Normoxia | 0,0632500  | 0,0245709                       | -0,003570                  | 0,1300702                  | 0,0143* |
| 1 a 3 Normoxia   | 1 a 0 Normoxia  | 0,0596771  | 0,0245709                       | -0,007143                  | 0,1264973                  | 0,0203* |
| 1 a 3 Hipoxia    | 1 a 0 Normoxia  | 0,0591771  | 0,0245709                       | -0,007643                  | 0,1259973                  | 0,0213* |
| 1 a 5 Normoxia   | 1 a 0 Normoxia  | 0,0586771  | 0,0245709                       | -0,008143                  | 0,1254973                  | 0,0223* |
| 1 a 1/2 Normoxia | 1 a 10 Normoxia | 0,0532500  | 0,0245709                       | -0,013570                  | 0,1200702                  | 0,0369* |
| 1 a 1/2 Hipoxia  | 1 a 0 Normoxia  | 0,0529271  | 0,0245709                       | -0,013893                  | 0,1197473                  | 0,0380* |
| 1 a 1 Hipoxia    | 1 a 10 Normoxia | 0,0525000  | 0,0245709                       | -0,014320                  | 0,1193202                  | 0,0395* |
| 1 a 5 Hipoxia    | 1 a 0 Normoxia  | 0,0521771  | 0,0245709                       | -0,014643                  | 0,1189973                  | 0,0407* |
| 1 a 10 Hipoxia   | 1 a 0 Normoxia  | 0,0519271  | 0,0245709                       | -0,014893                  | 0,1187473                  | 0,0416* |
| 1 a 3 Normoxia   | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0510000  | 0,0245709                       | -0,015820                  | 0,1178202                  | 0,0451* |
| 1 a 3 Hipoxia    | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0505000  | 0,0245709                       | -0,016320                  | 0,1173202                  | 0,0472* |
| 1 a 5 Normoxia   | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0500000  | 0,0245709                       | -0,016820                  | 0,1168202                  | 0,0493* |
| 1 a 1/2 Hipoxia  | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0442500  | 0,0245709                       | -0,022570                  | 0,1110702                  | 0,0801  |
| 1 a 5 Hipoxia    | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0435000  | 0,0245709                       | -0,023320                  | 0,1103202                  | 0,0851  |
| 1 a 10 Hipoxia   | 1 a 0 Hipoxia   | 0,0432500  | 0,0245709                       | -0,023570                  | 0,1100702                  | 0,0869  |
| 1 a 3 Normoxia   | 1 a 10 Normoxia | 0,0380000  | 0,0245709                       | -0,028820                  | 0,1048202                  | 0,1307  |
| 1 a 3 Hipoxia    | 1 a 10 Normoxia | 0,0375000  | 0,0245709                       | -0,029320                  | 0,1043202                  | 0,1357  |
| 1 a 5 Normoxia   | 1 a 10 Normoxia | 0,0370000  | 0,0245709                       | -0,029820                  | 0,1038202                  | 0,1408  |
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 10 Hipoxia  | 0,0330000  | 0,0245709                       | -0,033820                  | 0,0998202                  | 0,1877  |
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 5 Hipoxia   | 0,0327500  | 0,0245709                       | -0,034070                  | 0,0995702                  | 0,1909  |
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 1/2 Hipoxia | 0,0320000  | 0,0245709                       | -0,034820                  | 0,0988202                  | 0,2011  |
| 1 a 1/2 Hipoxia  | 1 a 10 Normoxia | 0,0312500  | 0,0245709                       | -0,035570                  | 0,0980702                  | 0,2116  |
| 1 a 5 Hipoxia    | 1 a 10 Normoxia | 0,0305000  | 0,0245709                       | -0,036320                  | 0,0973202                  | 0,2225  |
| 1 a 10 Hipoxia   | 1 a 10 Normoxia | 0,0302500  | 0,0245709                       | -0,036570                  | 0,0970702                  | 0,2263  |
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 5 Normoxia  | 0,0262500  | 0,0245709                       | -0,040570                  | 0,0930702                  | 0,2925  |
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 3 Hipoxia   | 0,0257500  | 0,0245709                       | -0,041070                  | 0,0925702                  | 0,3016  |
| 1 a 1 Normoxia   | 1 a 3 Normoxia  | 0,0252500  | 0,0245709                       | -0,041570                  | 0,0920702                  | 0,3110  |
| 1 a 1/2 Normoxia | 1 a 10 Hipoxia  | 0,0230000  | 0,0245709                       | -0,043820                  | 0,0898202                  | 0,3555  |
| 1 a 1/2 Normoxia | 1 a 5 Hipoxia   | 0,0227500  | 0,0245709                       | -0,044070                  | 0,0895702                  | 0,3607  |
| 1 a 1 Hipoxia    | 1 a 10 Hipoxia  | 0,0222500  | 0,0245709                       | -0,044570                  | 0,0890702                  | 0,3712  |
| 1 a 1 Hipoxia    | 1 a 5 Hipoxia   | 0,0220000  | 0,0245709                       | -0,044820                  | 0,0888202                  | 0,3765  |
| 1 a 1/2 Normoxia | 1 a 1/2 Hipoxia | 0,0220000  | 0,0245709                       | -0,044820                  | 0,0888202                  | 0,3765  |
| 1 a 10 Normoxia  | 1 a 0 Normoxia  | 0,0216771  | 0,0245709                       | -0,045143                  | 0,0884973                  | 0,3835  |
| 1 a 1 Hipoxia    | 1 a 1/2 Hipoxia | 0,0212500  | 0,0245709                       | -0,045570                  | 0,0880702                  | 0,3929  |
| 1 a 1/2 Normoxia | 1 a 5 Normoxia  | 0,0162500  | 0,0245709                       | -0,050570                  | 0,0830702                  | 0,5126  |
| 1 a 1/2 Normoxia | 1 a 3 Hipoxia   | 0,0157500  | 0,0245709                       | -0,051070                  | 0,0825702                  | 0,5256  |
| 1 a 1 Hipoxia    | 1 a 5 Normoxia  | 0,0155000  | 0,0245709                       | -0,051320                  | 0,0823202                  | 0,5321  |

**Tabla 8. Análisis estadístico para la concentración de lactato en el medio extracelular** para las diferentes relaciones del co-cultivo, figura 8. Prueba t de student, n=2.

| Nivel             | - Nivel         | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p |
|-------------------|-----------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 10 Hipoxia  | 1,062667   | 0,1387998                       | 0,685203                   | 1,440131                   | <,0001* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 10 Hipoxia  | 0,960667   | 0,1387998                       | 0,583203                   | 1,338131                   | <,0001* |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 10 Hipoxia  | 0,924667   | 0,1387998                       | 0,547203                   | 1,302131                   | <,0001* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 10 Hipoxia  | 0,910000   | 0,1551829                       | 0,487983                   | 1,332017                   | <,0001* |
| 1 a 1/2. Hipoxia  | 1 a 10 Hipoxia  | 0,896667   | 0,1551829                       | 0,474649                   | 1,318684                   | <,0001* |
| 1 a 1 Hipoxia     | 1 a 10 Hipoxia  | 0,806667   | 0,1551829                       | 0,384649                   | 1,228684                   | <,0001* |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 10 Hipoxia  | 0,752667   | 0,1387998                       | 0,375203                   | 1,130131                   | <,0001* |
| 1 a 3 Hipoxia     | 1 a 10 Hipoxia  | 0,676667   | 0,1551829                       | 0,254649                   | 1,098684                   | 0,0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 5 Hipoxia   | 0,586000   | 0,1387998                       | 0,208536                   | 0,963464                   | 0,0002* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 10 Normoxia | 0,572000   | 0,1202041                       | 0,245107                   | 0,898893                   | <,0001* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 5 Normoxia  | 0,542000   | 0,1202041                       | 0,215107                   | 0,868893                   | <,0001* |
| 1 a 5 Normoxia    | 1 a 10 Hipoxia  | 0,520667   | 0,1387998                       | 0,143203                   | 0,898131                   | 0,0006* |
| 1 a 10 Normoxia   | 1 a 10 Hipoxia  | 0,490667   | 0,1387998                       | 0,113203                   | 0,868131                   | 0,0011* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 5 Hipoxia   | 0,484000   | 0,1387998                       | 0,106536                   | 0,861464                   | 0,0013* |
| 1 a 5 Hipoxia     | 1 a 10 Hipoxia  | 0,476667   | 0,1551829                       | 0,054649                   | 0,898684                   | 0,0040* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 10 Normoxia | 0,470000   | 0,1202041                       | 0,143107                   | 0,796893                   | 0,0004* |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 5 Hipoxia   | 0,448000   | 0,1387998                       | 0,070536                   | 0,825464                   | 0,0027* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 5 Normoxia  | 0,440000   | 0,1202041                       | 0,113107                   | 0,766893                   | 0,0008* |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 10 Normoxia | 0,434000   | 0,1202041                       | 0,107107                   | 0,760893                   | 0,0009* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 5 Hipoxia   | 0,433333   | 0,1551829                       | 0,011316                   | 0,855351                   | 0,0083* |
| 1 a 1/2. Hipoxia  | 1 a 5 Hipoxia   | 0,420000   | 0,1551829                       | -0,002017                  | 0,842017                   | 0,0103* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 10 Normoxia | 0,419333   | 0,1387998                       | 0,041869                   | 0,796797                   | 0,0046* |
| 1 a 1/2. Hipoxia  | 1 a 10 Normoxia | 0,406000   | 0,1387998                       | 0,028536                   | 0,783464                   | 0,0059* |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 5 Normoxia  | 0,404000   | 0,1202041                       | 0,077107                   | 0,730893                   | 0,0019* |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 5 Normoxia  | 0,389333   | 0,1387998                       | 0,011869                   | 0,766797                   | 0,0081* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 3 Hipoxia   | 0,386000   | 0,1387998                       | 0,008536                   | 0,763464                   | 0,0086* |
| 1 a 1/2. Hipoxia  | 1 a 5 Normoxia  | 0,376000   | 0,1387998                       | -0,001464                  | 0,753464                   | 0,0103* |
| 1 a 1 Hipoxia     | 1 a 5 Hipoxia   | 0,330000   | 0,1551829                       | -0,092017                  | 0,752017                   | 0,0404* |
| 1 a 1 Hipoxia     | 1 a 10 Normoxia | 0,316000   | 0,1387998                       | -0,061464                  | 0,693464                   | 0,0289* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 3 Normoxia  | 0,310000   | 0,1202041                       | -0,016893                  | 0,636893                   | 0,0141* |
| 1 a 1 Hipoxia     | 1 a 5 Normoxia  | 0,286000   | 0,1387998                       | -0,091464                  | 0,663464                   | 0,0466* |
| 1 a 1/2. Normoxia | 1 a 3 Hipoxia   | 0,284000   | 0,1387998                       | -0,093464                  | 0,661464                   | 0,0481* |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 5 Hipoxia   | 0,276000   | 0,1387998                       | -0,101464                  | 0,653464                   | 0,0544  |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 10 Normoxia | 0,262000   | 0,1202041                       | -0,064893                  | 0,588893                   | 0,0359* |
| 1 a 0 Normoxia    | 1 a 1 Hipoxia   | 0,256000   | 0,1387998                       | -0,121464                  | 0,633464                   | 0,0734  |
| 1 a 1 Normoxia    | 1 a 3 Hipoxia   | 0,248000   | 0,1387998                       | -0,129464                  | 0,625464                   | 0,0824  |
| 1 a 0 Hipoxia     | 1 a 3 Hipoxia   | 0,233333   | 0,1551829                       | -0,188684                  | 0,655351                   | 0,1414  |
| 1 a 3 Normoxia    | 1 a 5 Normoxia  | 0,232000   | 0,1202041                       | -0,094893                  | 0,558893                   | 0,0615  |
| 1 a 1/2. Hipoxia  | 1 a 3 Hipoxia   | 0,220000   | 0,1551829                       | -0,202017                  | 0,642017                   | 0,1649  |

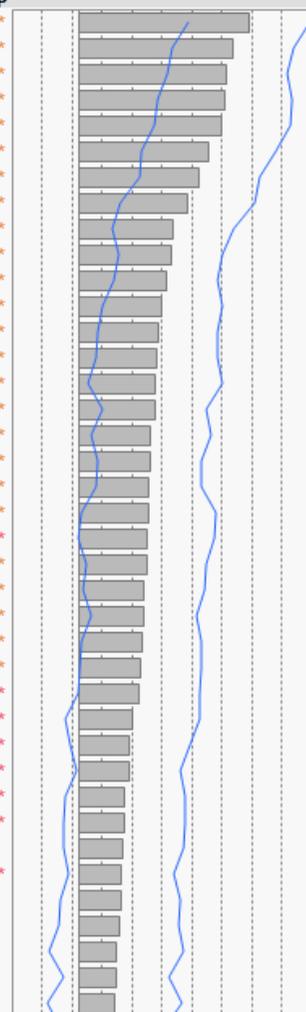
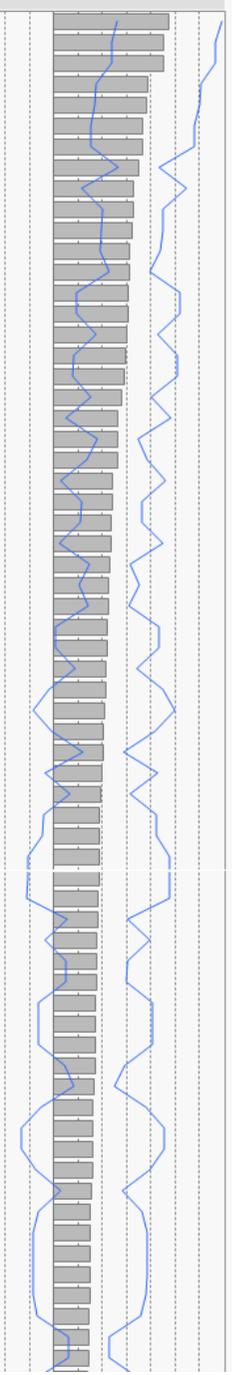


Tabla 9. Análisis estadístico para el pH del medio de cultivo para las diferentes relaciones del co-cultivo, figura 9. Prueba t de student, n=3.

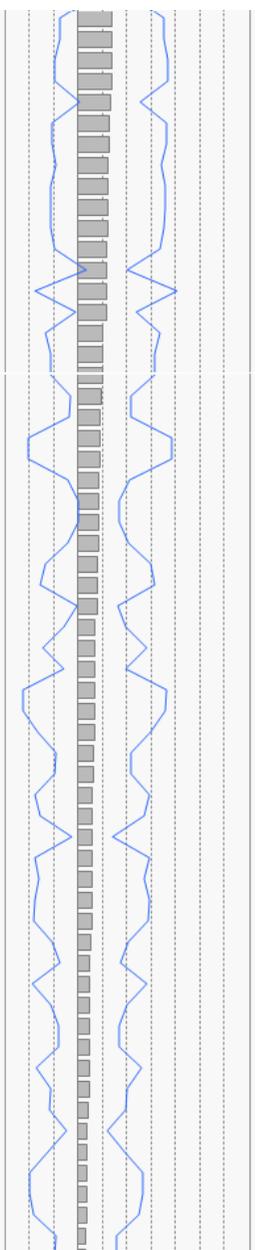
|                 | cocultivo1_0N | cocultivo1_0H | cocultivo1_0.5N | cocultivo1_0.5H | cocultivo1_1N | cocultivo1_1H | cocultivo1_3N | cocultivo1_3H | cocultivo1_5N | cocultivo1_5H | cocultivo1_10N | cocultivo1_10H |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| cocultivo1_0N   | 1             | 1.352199e-12  | 1.574954e-45    | 2.429182e-165   | 6.058148e-24  | 4.547814e-05  | 2.427401e-05  | 4.600748e-03  | 2.663402e-37  | 6.765517e-03  | 6.364266e-61   | 3.764656e-218  |
| cocultivo1_0H   | NA            | 1.000000e+00  | 7.471975e-06    | 3.558742e-57    | 1.000000e+00  | 1.000000e+00  | 3.018325e-02  | 5.882580e-02  | 1.327930e-54  | 1.000000e+00  | 3.398299e-78   | 5.205166e-184  |
| cocultivo1_0.5N | NA            | NA            | 1.000000e+00    | 2.125495e-26    | 7.496525e-05  | 3.199107e-07  | 2.506783e-22  | 6.604028e-19  | 2.671187e-86  | 5.671356e-03  | 7.246107e-136  | 8.646140e-165  |
| cocultivo1_0.5H | NA            | NA            | NA              | 1.000000e+00    | 1.554752e-61  | 1.152228e-52  | 6.643635e-110 | 7.501441e-92  | 1.430416e-192 | 9.758300e-30  | 9.567094e-297  | 1.332081e-220  |
| cocultivo1_1N   | NA            | NA            | NA              | NA              | 1.000000e+00  | 1.000000e+00  | 1.550424e-06  | 2.386685e-05  | 9.163900e-65  | 1.000000e+00  | 4.646494e-115  | 8.388626e-152  |
| cocultivo1_1H   | NA            | NA            | NA              | NA              | NA            | 1.000000e+00  | 1.000000e+00  | 2.686530e-33  | 1.000000e+00  | 1.000000e+00  | 5.185216e-46   | 1.167938e-132  |
| cocultivo1_3N   | NA            | NA            | NA              | NA              | NA            | NA            | 1.000000e+00  | 1.000000e+00  | 4.811976e-49  | 1.000000e+00  | 3.460818e-83   | 1.025732e-188  |
| cocultivo1_3H   | NA            | NA            | NA              | NA              | NA            | NA            | NA            | 1.000000e+00  | 4.486268e-40  | 1.000000e+00  | 5.316903e-59   | 7.294087e-180  |
| cocultivo1_5N   | NA            | NA            | NA              | NA              | NA            | NA            | NA            | NA            | 1.000000e+00  | 7.184217e-19  | 1.000000e+00   | 1.313061e-102  |
| cocultivo1_5H   | NA            | NA            | NA              | NA              | NA            | NA            | NA            | NA            | NA            | 1.000000e+00  | 3.520089e-25   | 3.764418e-77   |
| cocultivo1_10N  | NA            | NA            | NA              | NA              | NA            | NA            | NA            | NA            | NA            | NA            | 1.000000e+00   | 1.202403e-167  |
| cocultivo1_10H  | NA            | NA            | NA              | NA              | NA            | NA            | NA            | NA            | NA            | NA            | NA             | 1.000000e+00   |

Tabla 10. Análisis estadístico para el consumo de glucosa medido a través de la detección de la sonda fluorescente 2-NBDG incorporada a las células, figura 10. Prueba Wilcoxon, n=3.

| Nivel                            | - Nivel                           | Diferencia | Error estándar de la diferencia | Límite de control inferior | Límite de control superior | Valor p |
|----------------------------------|-----------------------------------|------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 2,605733   | 0,4545463                       | 1,43101                    | 3,780458                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 2,481604   | 0,4545463                       | 1,30688                    | 3,656330                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 2,480684   | 0,4545463                       | 1,30596                    | 3,655410                   | <0,001* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 2,132537   | 0,4545463                       | 0,95781                    | 3,307263                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 2,100403   | 0,4545463                       | 0,92568                    | 3,275128                   | <0,001* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 2,008409   | 0,4545463                       | 0,83368                    | 3,183135                   | <0,001* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 2,007489   | 0,4545463                       | 0,83276                    | 3,182214                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 0 Normoxia                    | 1,915820   | 0,1782877                       | 1,45506                    | 2,376586                   | <0,001* |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,806844   | 0,4545463                       | 0,63212                    | 2,981569                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 5 Hipoxia                     | 1,792096   | 0,2653006                       | 1,10646                    | 2,477737                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 1 Hipoxia                     | 1,777910   | 0,2653006                       | 1,09227                    | 2,463550                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 10 Hipoxia                    | 1,728776   | 0,2653006                       | 1,04314                    | 2,414417                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 1/2 Normoxia                  | 1,712740   | 0,1782877                       | 1,25197                    | 2,173506                   | <0,001* |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 1,682715   | 0,4545463                       | 0,50799                    | 2,857441                   | 0,0002* |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,681795   | 0,4545463                       | 0,50707                    | 2,856521                   | 0,0002* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 3 Hipoxia                     | 1,656417   | 0,2653006                       | 0,97078                    | 2,342058                   | <0,001* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,627207   | 0,4545463                       | 0,45248                    | 2,801933                   | 0,0004* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,598537   | 0,4545463                       | 0,42381                    | 2,773262                   | 0,0005* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 1/2 Hipoxia                   | 1,526656   | 0,2653006                       | 0,84102                    | 2,212297                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1,460794   | 0,4545463                       | 0,28607                    | 2,635520                   | 0,0014* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 0 Normoxia                    | 1,442625   | 0,1782877                       | 0,98186                    | 1,903390                   | <0,001* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 0 Hipoxia                     | 1,435443   | 0,2653006                       | 0,74980                    | 2,121084                   | <0,001* |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,336320   | 0,4545463                       | 0,16159                    | 2,511046                   | 0,0034* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 5 Hipoxia                     | 1,318901   | 0,2653006                       | 0,63326                    | 2,004542                   | <0,001* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 1 Hipoxia                     | 1,304714   | 0,2653006                       | 0,61907                    | 1,990355                   | <0,001* |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,301513   | 0,4545463                       | 0,12679                    | 2,476239                   | 0,0043* |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 1 Normoxia                    | 1,269412   | 0,1782877                       | 0,80865                    | 1,730178                   | <0,001* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 10 Hipoxia                    | 1,255581   | 0,2653006                       | 0,56994                    | 1,941222                   | <0,001* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 1/2 Normoxia                  | 1,239545   | 0,1782877                       | 0,77878                    | 1,700310                   | <0,001* |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 1,212192   | 0,4545463                       | 0,03747                    | 2,386918                   | 0,0079* |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,211272   | 0,4545463                       | 0,03655                    | 2,385997                   | 0,0079* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 3 Hipoxia                     | 1,183222   | 0,2653006                       | 0,49758                    | 1,868862                   | <0,001* |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,170290   | 0,4951871                       | -0,10947                   | 2,450047                   | 0,0184* |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,144938   | 0,6176068                       | -0,45120                   | 2,741076                   | 0,0643  |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,125341   | 0,4545463                       | -0,04938                   | 2,300067                   | 0,0136* |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 0 Normoxia                    | 1,116931   | 0,1782877                       | 0,65617                    | 1,577696                   | <0,001* |
| 1 a 1/2 Hipoxia                  | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,079077   | 0,4951871                       | -0,20068                   | 2,358834                   | 0,0297* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 1/2 Hipoxia                   | 1,053461   | 0,2653006                       | 0,36782                    | 1,739101                   | <0,001* |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 1,046161   | 0,4951871                       | -0,23360                   | 2,325918                   | 0,0351* |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,045241   | 0,4951871                       | -0,23452                   | 2,324998                   | 0,0352* |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 1,020810   | 0,6176068                       | -0,57533                   | 2,616948                   | 0,0989  |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,019890   | 0,6176068                       | -0,57625                   | 2,616028                   | 0,0992  |
| 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 1,007196   | 0,6176068                       | -0,58894                   | 2,603334                   | 0,1035  |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 5 Hipoxia                     | 0,993207   | 0,2653006                       | 0,30757                    | 1,678848                   | 0,0002* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína  | 0,987599   | 0,4545463                       | -0,18713                   | 2,162325                   | 0,0302* |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 1 Hipoxia                     | 0,979020   | 0,2653006                       | 0,29338                    | 1,664661                   | 0,0002* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 0 Hipoxia                     | 0,962248   | 0,2653006                       | 0,27661                    | 1,647889                   | 0,0003* |
| 1 a 1/2 Hipoxia                  | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,954948   | 0,4951871                       | -0,32481                   | 2,234706                   | 0,0543  |
| 1 a 1/2 Hipoxia                  | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,954028   | 0,4951871                       | -0,32573                   | 2,233786                   | 0,0545  |
| 1 a 3 Hipoxia                    | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,949316   | 0,4951871                       | -0,33044                   | 2,229073                   | 0,0557  |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 10 Hipoxia                    | 0,929887   | 0,2653006                       | 0,24425                    | 1,615528                   | 0,0005* |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 1/2 Normoxia                  | 0,913851   | 0,1782877                       | 0,45309                    | 1,374616                   | <0,001* |
| 1 a 1/2 Normoxia                 | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,892993   | 0,4545463                       | -0,28173                   | 2,067718                   | 0,0499* |
| 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,883068   | 0,6176068                       | -0,71307                   | 2,479206                   | 0,1533  |
| 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,882148   | 0,6176068                       | -0,71399                   | 2,478285                   | 0,1537  |
| 1 a 10 Hipoxia                   | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,876957   | 0,4951871                       | -0,40280                   | 2,156714                   | 0,0771  |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 3 Hipoxia                     | 0,857528   | 0,2653006                       | 0,17189                    | 1,543168                   | 0,0013* |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,830990   | 0,4545463                       | -0,34374                   | 2,005716                   | 0,0680  |
| 1 a 1 Hipoxia                    | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,827823   | 0,4951871                       | -0,45193                   | 2,107581                   | 0,0951  |
| 1 a 3 Hipoxia                    | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,825187   | 0,4951871                       | -0,45457                   | 2,104945                   | 0,0962  |
| 1 a 3 Hipoxia                    | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,824267   | 0,4951871                       | -0,45549                   | 2,104025                   | 0,0965  |
| 1 a 5 Hipoxia                    | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,813636   | 0,4951871                       | -0,46612                   | 2,093394                   | 0,1009  |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,799647   | 0,4545463                       | -0,37508                   | 1,974373                   | 0,0791  |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 3 Normoxia                    | 0,798889   | 0,1782877                       | 0,33812                    | 1,259655                   | <0,001* |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 1 Normoxia                    | 0,796217   | 0,1782877                       | 0,33545                    | 1,256982                   | <0,001* |



|                                  |                                   |          |           |          |          |         |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| 1 a 1/2 Normoxia                 | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,768864 | 0,4545463 | -0,40586 | 1,943590 | 0,0913  |
| 1 a 1/2 Normoxia                 | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,767944 | 0,4545463 | -0,40678 | 1,942670 | 0,0917  |
| 1 a 10 Hipoxia                   | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,752828 | 0,4951871 | -0,52693 | 2,032585 | 0,1290  |
| 1 a 10 Hipoxia                   | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,751908 | 0,4951871 | -0,52785 | 2,031665 | 0,1295  |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 1/2 Hipoxia                   | 0,727767 | 0,2653006 | 0,04213  | 1,413407 | 0,0063* |
| 1 a 1 Hipoxia                    | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,703695 | 0,4951871 | -0,57606 | 1,983452 | 0,1558  |
| 1 a 1 Hipoxia                    | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,702775 | 0,4951871 | -0,57698 | 1,982532 | 0,1564  |
| 1 a 0 Normoxia                   | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,689912 | 0,4545463 | -0,48481 | 1,864638 | 0,1296  |
| 1 a 5 Hipoxia                    | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,689508 | 0,4951871 | -0,59025 | 1,969265 | 0,1643  |
| 1 a 5 Hipoxia                    | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,688588 | 0,4951871 | -0,59117 | 1,968345 | 0,1649  |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,664959 | 0,4951871 | -0,61480 | 1,944717 | 0,1799  |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína  | 0,661905 | 0,4545463 | -0,51282 | 1,836631 | 0,1459  |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 0 Normoxia                    | 0,646408 | 0,1782877 | 0,18564  | 1,107173 | 0,0003* |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,639608 | 0,6176068 | -0,95653 | 2,235746 | 0,3008  |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 0 Hipoxia                     | 0,636554 | 0,2653006 | -0,04909 | 1,322195 | 0,0167* |
| 1 a 1/2 Hipoxia                  | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,573747 | 0,4951871 | -0,70601 | 1,853504 | 0,2471  |
| 1 a 0 Normoxia                   | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,565784 | 0,4545463 | -0,60894 | 1,740510 | 0,2137  |
| 1 a 0 Normoxia                   | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,564864 | 0,4545463 | -0,60986 | 1,739389 | 0,2145  |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 5 Hipoxia                     | 0,522684 | 0,2653006 | -0,16296 | 1,208325 | 0,0493* |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 1 Hipoxia                     | 0,508497 | 0,2653006 | -0,17714 | 1,194138 | 0,0558  |
| 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 0 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,505330 | 0,6176068 | -1,09081 | 2,101468 | 0,4136  |
| 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,501866 | 0,6176068 | -1,09427 | 2,098004 | 0,4168  |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 0 Normoxia                    | 0,480377 | 0,2653006 | -0,20526 | 1,166018 | 0,0707  |
| 1 a 5 Normoxia                   | 1 a 10 Normoxia                   | 0,473195 | 0,1782877 | 0,01243  | 0,933961 | 0,0082* |
| 1 a 3 Normoxia                   | 1 a 1 Normoxia                    | 0,470523 | 0,1782877 | 0,00976  | 0,931289 | 0,0085* |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 10 Hipoxia                    | 0,459364 | 0,2653006 | -0,22628 | 1,145004 | 0,0839  |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 0 Normoxia                    | 0,455026 | 0,4545463 | -0,71970 | 1,629752 | 0,3172  |
| 1 a 3 Hipoxia                    | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,443986 | 0,4951871 | -0,83577 | 1,723743 | 0,3703  |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 1/2 Normoxia                  | 0,443328 | 0,1782877 | -0,01744 | 0,904093 | 0,0132* |
| 1 a 1/2 Hipoxia                  | 1 a 0 Normoxia                    | 0,389164 | 0,2653006 | -0,29648 | 1,074805 | 0,1430  |
| 1 a 1/2 Normoxia                 | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,387662 | 0,4545463 | -0,78706 | 1,562388 | 0,3941  |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 3 Hipoxia                     | 0,387005 | 0,2653006 | -0,29864 | 1,072645 | 0,1452  |
| 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 1/2 Normoxia+N-acetilcisteína | 0,381202 | 0,6176068 | -1,21494 | 1,977340 | 0,5373  |
| 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 1 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,380282 | 0,6176068 | -1,21586 | 1,976420 | 0,5383  |
| 1 a 10 Hipoxia                   | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,371626 | 0,4951871 | -0,90813 | 1,651384 | 0,4533  |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 5 Hipoxia                     | 0,356653 | 0,3301247 | -0,49652 | 1,209825 | 0,2804  |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 1 Hipoxia                     | 0,342466 | 0,3301247 | -0,51071 | 1,195638 | 0,3000  |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 5 Hipoxia                     | 0,331302 | 0,4951871 | -0,94846 | 1,611060 | 0,5037  |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,329124 | 0,4545463 | -0,84560 | 1,503850 | 0,4693  |
| 1 a 10 Normoxia                  | 1 a 3 Normoxia                    | 0,325694 | 0,1782877 | -0,13507 | 0,786459 | 0,0682  |
| 1 a 1 Hipoxia                    | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,322493 | 0,4951871 | -0,95726 | 1,602250 | 0,5151  |
| 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 0 Normoxia                    | 0,317284 | 0,4545463 | -0,85744 | 1,492009 | 0,4854  |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 1 Hipoxia                     | 0,317115 | 0,4951871 | -0,96264 | 1,596873 | 0,5222  |
| 1 a 5 Hipoxia                    | 1 a 3 Normoxia+N-acetilcisteína   | 0,308306 | 0,4951871 | -0,97145 | 1,588063 | 0,5338  |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 10 Hipoxia                    | 0,293333 | 0,3301247 | -0,55984 | 1,146505 | 0,3746  |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 1/2 Normoxia                  | 0,277297 | 0,2653006 | -0,40834 | 0,962938 | 0,2964  |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 10 Hipoxia                    | 0,267982 | 0,4951871 | -1,01178 | 1,547739 | 0,5886  |
| 1 a 1/2 Hipoxia                  | 1 a 5 Hipoxia                     | 0,265440 | 0,3301247 | -0,58773 | 1,118612 | 0,4217  |
| 1 a 3 Hipoxia                    | 1 a 0 Normoxia                    | 0,259403 | 0,2653006 | -0,42624 | 0,945044 | 0,3286  |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 1/2 Hipoxia                   | 0,257244 | 0,2653006 | -0,42840 | 0,942884 | 0,3326  |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 1/2 Normoxia                  | 0,251946 | 0,4545463 | -0,92278 | 1,426672 | 0,5796  |
| 1 a 1/2 Hipoxia                  | 1 a 1 Hipoxia                     | 0,251254 | 0,3301247 | -0,60192 | 1,104425 | 0,4469  |
| 1 a 0 Hipoxia                    | 1 a 3 Hipoxia                     | 0,220974 | 0,3301247 | -0,63220 | 1,074145 | 0,5035  |
| 1 a 1/2 Normoxia                 | 1 a 0 Normoxia                    | 0,203080 | 0,1782877 | -0,25769 | 0,663845 | 0,2552  |
| 1 a 1/2 Hipoxia                  | 1 a 10 Hipoxia                    | 0,202120 | 0,3301247 | -0,65105 | 1,055292 | 0,5406  |
| 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína | 1 a 3 Hipoxia                     | 0,195623 | 0,4951871 | -1,08413 | 1,475380 | 0,6930  |
| 1 a 5 Normoxia+N-acetilcisteína  | 1 a 5 Hipoxia                     | 0,193560 | 0,4951871 | -1,08620 | 1,473317 | 0,6960  |
| 1 a 1 Normoxia                   | 1 a 10 Normoxia+N-acetilcisteína  | 0,191382 | 0,4545463 | -0,98334 | 1,366108 | 0,6739  |
| 1 a 10 Hipoxia                   | 1 a 0 Normoxia                    | 0,187044 | 0,2653006 | -0,49860 | 0,872685 | 0,4811  |



**Tabla 11. Análisis estadístico para las veces de cambio de los niveles de ROS de las células HT-29 remanentes, para las diferentes relaciones de co-cultivo., figura 12. Prueba t de student, n=3.**

## 8.5. Publicaciones derivadas.

### 8.5.1 Ponencia.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en un poster en el congreso “Tumour Microenvironment and Signalling” en el *EMBL* en Heidelberg, Alemania.



## Diego Aponte-Santamaría

attended the

### EMBO | EMBL Symposium: Tumour Microenvironment and Signalling

03 - 06 April 2016,

EMBL  
European Molecular Biology Laboratory  
Course and Conference Office  
Meyerhofstr. 1  
D-69117 Heidelberg, Germany

Heidelberg, 06 April, 2016

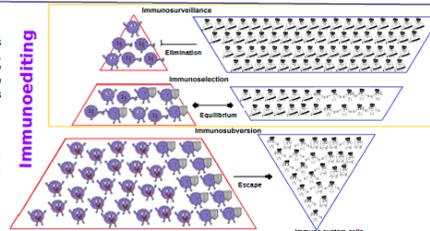
[www.embl.org](http://www.embl.org)

**Background**

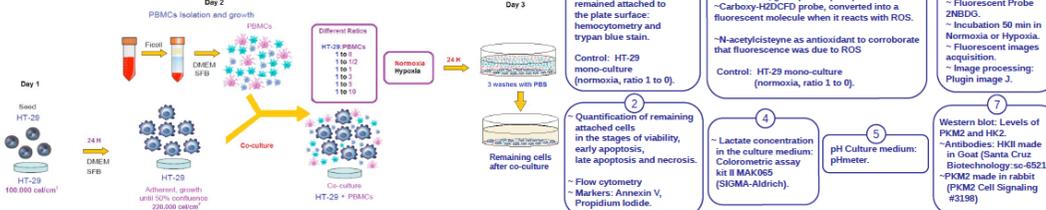
In the tumoral microenvironment, conditions such as normoxia, hypoxia, and immunoeating exerted by the immune cells induce a natural selection process. This process favors the adaptation of cancer cells to the changing environment, enhancing their survival and proliferation. Although the changes of immune cells during immunoeating have been widely studied, it remains unknown how such cells influence the metabolic adaptation of cancer cells. Specifically, it is not clear how immune cells regulate the glycolytic metabolism and oxidative stress of colon cancer cells and how this regulation influences the survival of such cancer cells.

**Aims**

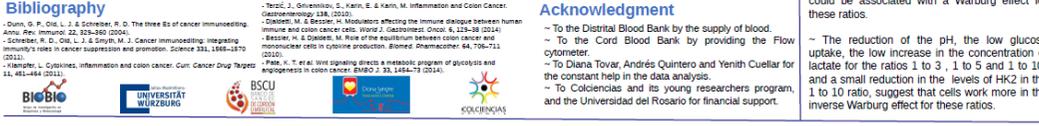
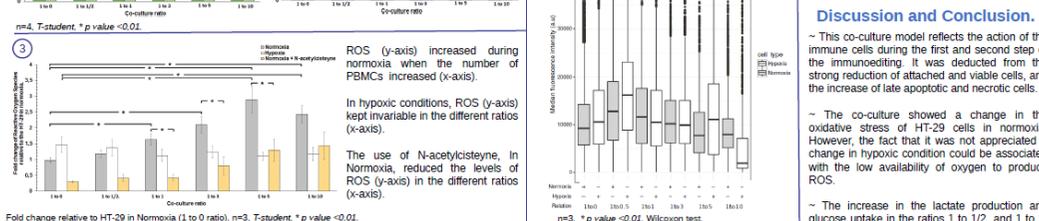
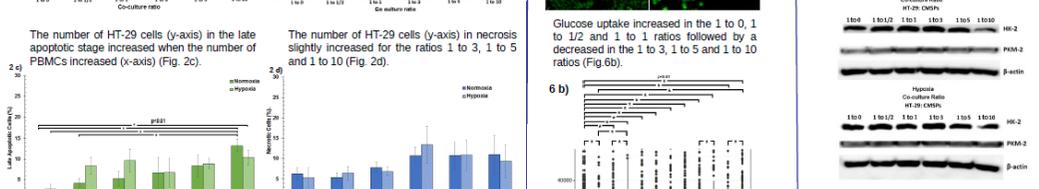
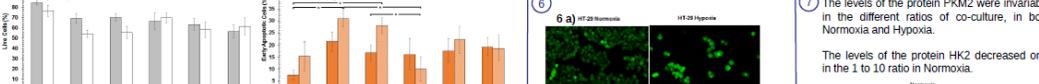
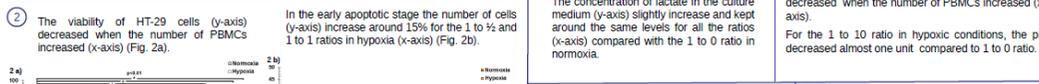
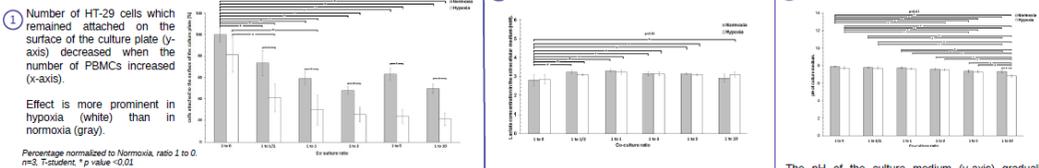
Study the changes in the glycolytic metabolism and oxidative stress of HT-29 colon cancer cells due to the presence of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), by developing an *in vitro* model containing these cancer cells in co-culture with PBMCs, imitating the first and the second steps of immunoeating (immunoeveillance and immunoelection).



**Methodology.**



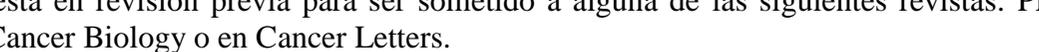
**Results.**



**Discussion and Conclusion.**  
 ~ This co-culture model reflects the action of the immune cells during the first and second step of the immunoeating. It was deduced from the strong reduction of attached and viable cells, and the increase of late apoptotic and necrotic cells.  
 ~ The co-culture showed a change in the oxidative stress of HT-29 cells in normoxia. However, the fact that it was not appreciated a change in hypoxic condition could be associated with the low availability of oxygen to produce ROS.  
 ~ The increase in the lactate production and glucose uptake in the ratios 1 to 1/2 and 1 to 1, could be associated with a Warburg effect for these ratios.  
 ~ The reduction of the pH, the low glucose uptake, the low increase in the concentration of lactate for the ratios 1 to 3, 1 to 5 and 1 to 10 and a small reduction in the levels of HK2 in the 1 to 10 ratio, suggest that cells work more in the inverse Warburg effect for these ratios.

**Bibliography**  
 - Terzić, J., Giovannelli, S., Karin, E. & Karin, M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, (2010).  
 - Daniels, M. & Brösler, M. Modulators affecting the immune dialogue between human immune and colon cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 18, 113-18 (2014).  
 - Brösler, M. & Daniels, M. Role of the equilibrium between colon cancer and mononuclear cells in cytokine production. *Biomed. Pharmacother.* 84, 706-711 (2015).  
 - Klamper, L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 11, 461-464 (2011).  
 - Park, K. T. et al. *Wnt* signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *EMBO J.* 30, 1458-70 (2011).

**Acknowledgment**  
 ~ To the Dental Blood Bank by the supply of blood.  
 ~ To the Cord Blood Bank by providing the Flow cytometer.  
 ~ To Diana Tovar, Andrés Quintero and Yenith Cueellar for the constant help in the data analysis.  
 ~ To Colciencias and its young researchers program, and the Universidad del Rosario for financial support.



8.5.2. Artículo en revisión.

Este trabajo está en revisión previa para ser sometido a alguna de las siguientes revistas: PLOS ONE, Seminars in Cancer Biology o en Cancer Letters.

## CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
2. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science (80-. )*. **123**, 309–14 (1956).
3. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science (80-. )*. **124**, 269–70 (1956).
4. Warburg, O. The metabolism of tumours. Investigations from the Kaiser-Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem. Edited by Otto Warburg, Kaiser-Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem. *Br. J. Surg.* **19**, 168–168 (1931).
5. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**, 537–48 (2009).
6. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism* **7**, 11–20 (2008).
7. Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**, 703–7 (2008).
8. Potter, V. R. The biochemical approach to the cancer problem. *Fed. Proc.* **17**, 691–7 (1958).
9. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (80-. )*. **324**, 1029–33 (2009).
10. Semenza, G. L. Tumor metabolism: Cancer cells give and take lactate. *Journal of Clinical Investigation* **118**, 3835–3837 (2008).
11. Semenza, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics and Development* **20**, 51–56 (2010).
12. Feron, O. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology* **92**, 329–333 (2009).
13. Pavlides, S. *et al.* The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* **8**, 3984–4001 (2009).
14. Klampfer, L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **11**, 451–464 (2011).

15. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. & Karin, M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* **138**, (2010).
16. Semenza, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625–634 (2010).
17. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* **13**, 472–482 (2008).
18. Lakatos, P.-L. & Lakatos, L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**, 3937–3947 (2008).
19. Waldner, M. J. & Neurath, M. F. Cytokines in colitis associated cancer: potential drug targets? *Inflamm. Allergy Drug Targets* **7**, 187–194 (2008).
20. Sakamoto, K. *et al.* Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2248–2258 (2009).
21. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 798–809 (2009).
22. Bienz, M. & Clevers, H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**, 311–320 (2000).
23. Greten, F. R. *et al.* IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**, 285–296 (2004).
24. Wang, S., Liu, Z., Wang, L. & Zhang, X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell. Mol. Immunol.* **6**, 327–334 (2009).
25. Popivanova, B. K. *et al.* Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J. Clin. Invest.* **118**, 560–570 (2008).
26. Becker, C. *et al.* TGF- $\beta$  suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* **21**, 491–501 (2004).
27. Tang, Y. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  suppresses nonmetastatic colon cancer through Smad4 and adaptor protein ELF at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res.* **65**, 4228–4237 (2005).
28. Berg, D. J. *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* **98**, 1010–20 (1996).
29. Grivennikov, S. *et al.* IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* **15**, 103–113 (2009).

30. Fenton, J. I., Hursting, S. D., Perkins, S. N. & Hord, N. G. Interleukin-6 production induced by leptin treatment promotes cell proliferation in an Apc (Min/+) colon epithelial cell line. *Carcinogenesis* **27**, 1507–15 (2006).
31. Becker, C. *et al.* IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle* **4**, 217–20 (2005).
32. Atreya, R. *et al.* Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* **6**, 583–8 (2000).
33. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
34. Leppkes, M. *et al.* ROR $\gamma$ -Expressing Th17 Cells Induce Murine Chronic Intestinal Inflammation via Redundant Effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* **136**, 257–267 (2009).
35. Dominitzki, S. *et al.* Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J. Immunol.* **179**, 2041–2045 (2007).
36. Ito, H. *et al.* A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn’s Disease. *Gastroenterology* **126**, 989–996 (2004).
37. Kruglov, A. A. *et al.* Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: Mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 231–244 (2008).
38. Grivennikov, S. I., Kuprash, D. V., Liu, Z. G. & Nedospasov, S. A. Intracellular Signals and Events Activated by Cytokines of the Tumor Necrosis Factor Superfamily: From Simple Paradigms to Complex Mechanisms. *International Review of Cytology* **252**, 129–161 (2006).
39. Li, B. *et al.* Low levels of tumor necrosis factor increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. *Cancer Res.* **69**, 338–348 (2009).
40. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* **9**, 361–371 (2009).
41. Peterson, C. G. B. *et al.* Fecal levels of leukocyte markers reflect disease activity in patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **67**, 810–820 (2007).
42. Tu, S. *et al.* Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* **14**, 408–419 (2008).
43. Garlanda, C. *et al.* Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8,

- an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. *Cancer Res.* **67**, 6017–6021 (2007).
44. Xiao, H. *et al.* The Toll-Interleukin-1 Receptor Member SIGIRR Regulates Colonic Epithelial Homeostasis, Inflammation, and Tumorigenesis. *Immunity* **26**, 461–475 (2007).
  45. Yang, L. & Moses, H. L. Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer Res* **68**, 9107–9111 (2008).
  46. Zhu, Y., Richardson, J. A., Parada, L. F. & Graff, J. M. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* **94**, 703–714 (1998).
  47. Maggio-Price, L. *et al.* Helicobacter infection is required for inflammation and colon cancer in Smad3-deficient mice. *Cancer Res.* **66**, 828–838 (2006).
  48. Kim, B.-G. *et al.* Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature* **441**, 1015–1019 (2006).
  49. Bierie, B. & Moses, H. L. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 49–59 (2010).
  50. Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Schumacker, P. T. & Thompson, C. B. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell* **3**, 159–67 (1999).
  51. Karin, M. & Greten, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 749–759 (2005).
  52. Pickert, G. *et al.* STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* **206**, 1465–1472 (2009).
  53. Straus, D. S. TNF $\alpha$  and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer* **12**, 78 (2013).
  54. Djaldetti, M. & Bessler, H. Modulators affecting the immune dialogue between human immune and colon cancer cells. *World J. Gastrointest. Oncol.* **6**, 129–38 (2014).
  55. Meng, F., Liu, L., Chin, P. C. & D’Mello, S. R. Akt Is a Downstream Target of NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **277**, 29674–29680 (2002).
  56. Hussain, A. R. *et al.* Cross-talk between NF $\kappa$ B and the PI3-kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis. *PLoS One* **7**, e39945 (2012).
  57. Kaler, P., Godasi, B. N., Augenlicht, L. & Klampfer, L. The NF- $\kappa$ B/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1 $\beta$ . *Cancer Microenviron.* **2**,

69–80 (2009).

58. Kaler, P., Augenlicht, L. & Klampfer, L. Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene* **28**, 3892–3902 (2009).
59. Pate, K. T. *et al.* Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *EMBO J.* **33**, 1454–73 (2014).
60. Burkholder, B. *et al.* Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* **1845**, 182–201 (2014).
61. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
62. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
63. Kim, Ryungsa, Manabu Emi, and Kazuaki Tanabe. Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. *Cancer Immunotherapy* 9–27 (2007). doi:10.1016/B978-012372551-6/50066-3
64. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715–727 (2006).
65. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011).
66. Muñoz-Pinedo, C., El Mjiyad, N. & Ricci, J.-E. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis.* **3**, e248 (2012).
67. Soga, T. Cancer metabolism: Key players in metabolic reprogramming. *Cancer Science* **104**, 275–281 (2013).
68. Lamonte, G. *et al.* Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. *Cancer Metab.* **1**, 23 (2013).
69. Patra, K. *et al.* Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* **24**, 213–228 (2013).
70. Robey, R. B. & Hay, N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* **25**, 4683–4696 (2006).
71. Wilson, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* **206**, 2049–2057 (2003).

72. Mathupala, S. P., Rempel, A. & Pedersen, P. L. Glucose catabolism in cancer cells: Identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* **276**, 43407–43412 (2001).
73. Shinohara, Y., Yamamoto, K., Kogure, K., Ichihara, J. & Terada, H. Steady state transcript levels of the type II hexokinase and type 1 glucose transporter in human tumor cell lines. *Cancer Lett.* **82**, 27–32 (1994).
74. Hamabe, A. *et al.* Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 $\alpha$  in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci.* **105**, 1100–1108 (2014).
75. Mathupala, S. P., Ko, Y. H. & Pedersen, P. L. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **25**, 4777–4786 (2006).
76. Vyssokikh, M. Y. & Brdiczka, D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim. Pol.* **50**, 389–404 (2003).
77. Pastorino, J. G., Shulga, N. & Hoek, J. B. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 7610–8 (2002).
78. Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1535–51 (2003).
79. Vyssokikh, M. & Brdiczka, D. VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease. *Mol. Cell. Biochem.* **256-257**, 117–126 (2004).
80. Zaid, H., Abu-Hamad, S., Israelson, A., Nathan, I. & Shoshan-Barmatz, V. The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **12**, 751–60 (2005).
81. Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S. & Shoshan-Barmatz, V. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.* **377**, 347–55 (2004).
82. Vander Heiden, M. G. *et al.* Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **276**, 19414–9 (2001).
83. Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–7 (1999).
84. Shimizu, S., Shinohara, Y. & Tsujimoto, Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator.

*Oncogene* **19**, 4309–18 (2000).

85. Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R. B. & Hay, N. Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 730–40 (2004).
86. Majewski, N. *et al.* Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol. Cell* **16**, 819–30 (2004).
87. Vaupel, P. & Harrison, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* **9 Suppl 5**, 4–9 (2004).
88. Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H. & Friis, R. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Crit. Rev. Oncog.* **3**, 91–115 (1992).
89. Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F. & Eigenbrodt, E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology* **15**, 300–308 (2005).
90. Noguchi, T., Inoue, H. & Tanaka, T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **261**, 13807–12 (1986).
91. Dombrauckas, J. D., Santarsiero, B. D. & Mesecar, A. D. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry* **44**, 9417–9429 (2005).
92. Eigenbrodt, E. Glycolysis—one of the keys to cancer? *Trends Pharmacol. Sci.* **1**, 240–245 (1980).
93. Mazurek, S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours. *Ernst Schering Found. Symp. Proc.* 99–124 (2007).
94. Sena, L. A. & Chandel, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell* **48**, 158–166 (2012).
95. Dreher, D. & Junod, a F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer* **32A**, 30–8 (1996).
96. Wiseman, H. & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313** ( Pt 1, 17–29 (1996).
97. Brand, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* **45**, 466–472 (2010).
98. Brown, G. C. & Borutaite, V. There is no evidence that mitochondria are the main source of

- reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* **12**, 1–4 (2012).
99. Liou, G.-Y. & Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **44**, 479–96 (2010).
  100. Circu, M. L. & Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 749–62 (2010).
  101. Yang, D. *et al.* Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Exp. Eye Res.* **85**, 462–472 (2007).
  102. Li, X. *et al.* Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J. Hematol. Oncol.* **6**, 19 (2013).
  103. Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Vandevoorde, V., Haegeman, G. & Fiers, W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J.* **12**, 3095–104 (1993).
  104. Corda, S., Laplace, C., Vicaut, E. & Duranteau, J. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by ceramide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 762–768 (2001).
  105. Pearl-Yafe, M. *et al.* An oxidative mechanism of interferon induced priming of the Fas pathway in Fanconi anemia cells. *Biochem Pharmacol* **65**, 833–842 (2003).
  106. Watanabe, Y., Suzuki, O., Haruyama, T. & Akaike, T. Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J. Cell. Biochem.* **89**, 244–253 (2003).
  107. Pearl-Yafe, M. *et al.* An oxidative mechanism of interferon induced priming of the Fas pathway in Fanconi anemia cells. *Biochem Pharmacol* **65**, 833–842 (2003).
  108. Liemburg-Apers, D. C., Willems, P. H. G. M., Koopman, W. J. H. & Grefte, S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Arch. Toxicol.* **89**, 1209–1226 (2015).
  109. Bessler, H. & Djaldetti, M. Role of the equilibrium between colon cancer and mononuclear cells in cytokine production. *Biomed. Pharmacother.* **64**, 706–711 (2010).
  110. Biotec, M. & Bio-one, G. Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation. *MACS Miltenyi Biotec* 1–2
  111. Boujtita, N. Separation of PBMCs from Blood Samples Using the New Thermo Scientific Benchtop 1-Liter Centrifuge. *Thermo Fish. Sci.* 6–8 (2008).

112. Htb-, A. Thawing, propagating, and cryopreserving Protocol NCI-PBCF-HTB38 (HT-29) Colon Adenocarcinoma. *Am. Type Cult. Collect.* **38**, (2012).
113. Bastidas, O. Cell Counting with Neubauer Chamber (Basic Hemocytometer Usage). 1–6 (2014). at <<http://www.celeromics.com/cell-counting>>
114. Ding, Z. *et al.* Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **136**, 1697–1707 (2010).
115. Perlmann, Peter; Holm, G. Cytotoxic Effects of Lymphoid Cells in Vitro. *Adv. Immunol.* **11**, 117–193 (1969).
116. Holm, G. & Perlmann, P. Cytotoxic potential of stimulated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **125**, 721–736 (1967).
117. Freshney, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition* (2011). doi:10.1002/9780470649367
118. Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **Appendix 3**, Appendix 3B (2001).
119. Abcam. L- Lactate Assay kit (Colorimetric). (*ab65331*). (2015). at <[http://www.abcam.com/ps/products/65/ab65331/documents/ab65331 L-Lactate assay kit colorimetric protocol\\_ver4 %28website%29.pdf](http://www.abcam.com/ps/products/65/ab65331/documents/ab65331%20L-Lactate%20assay%20kit%20colorimetric%20protocol_ver4%20website.pdf)>
120. Zou, C., Wang, Y. & Shen, Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* **64**, 207–215 (2005).
121. DB., W. The reaction of immunologically activated lymphoid cells against homologous lymphoid cells against homologous target tissue cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* 273–286 (1963).
122. Feng Xu, Ying-Jiang Ye, and S. W. In vitro antitumor immune response induced by fusion of dendritic cells and colon cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 1162–1166.
123. Jagarlamoodu, S., Aust, J., Tew, R. & McKhann, C. In vitro detection of cytotoxic cellular immunity against tumor-specific antigens by a radioisotopic technique. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 1346–50 (1971).
124. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–71 (2011).
125. Cretney, E. *et al.* Increased Susceptibility to Tumor Initiation and Metastasis in TNF-Related

- Apoptosis-Inducing Ligand-Deficient Mice. *J. Immunol.* **168**, 1356–1361 (2002).
126. Takeda, K. *et al.* Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* **195**, 161–9 (2002).
  127. Lauricella, M., Ciruolo, A., Carlisi, D., Vento, R. & Tesoriere, G. SAHA/TRAIL combination induces detachment and anoikis of MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells. *Biochimie* **94**, 287–299 (2012).
  128. Laguigne, L. M. *et al.* DR5 receptor mediates anoikis in human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **68**, 909–917 (2008).
  129. Goetzl, E. J., Banda, M. J. & Leppert, D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J. Immunol.* **156**, 1–4 (1996).
  130. Löffek, S., Schilling, O. & Franzke, C.-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur. Respir. J.* **38**, 191–208 (2011).
  131. Oviedo-Orta, E., Bermudez-Fajardo, A., Karanam, S., Benbow, U. & Newby, A. C. Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages. *Immunology* **124**, 42–50 (2008).
  132. Gilmore, A. P. Anoikis. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1473–1477 (2005).
  133. Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 3481–98 (2013).
  134. Hiroe Go, Hye-Jung Hwang, In-Hye Kim, T.-J. N. Anoikis induction by glycoprotein from *Laminaria japonica* in HT-29 cells. *Open J. Prev. Med.* **1**, 49–61 (2011).
  135. Hasan, N. M., Adams, G. E., Joiner, M. C., Marshall, J. F. & Hart, I. R. Hypoxia facilitates tumour cell detachment by reducing expression of surface adhesion molecules and adhesion to extracellular matrices without loss of cell viability. *Br. J. Cancer* **77**, 1799–1805 (1998).
  136. Jong Ho Choi, Yun Bin Lee, Jieun Jung, Seong Gyu Hwang, IL-Hoan Oh, and G. J. K. Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Regulates the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Integrin  $\alpha$ 4. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
  137. Ren, Y., Hao, P., Law, S. K. & Sze, S. K. Hypoxia-induced changes to integrin alpha 3 glycosylation facilitate invasion in epidermoid carcinoma cell line A431. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 3126–3137 (2014).
  138. Waring, P. & Müllbacher, A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol. cell Biol.* 312–317 (1999).

139. Shao, R. G. *et al.* Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells. *Oncogene* **20**, 1852–9 (2001).
140. Naujokat, C., Sezer, O. & Possinger, K. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma induce expression of functional Fas ligand on HT29 and MCF7 adenocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 813–819 (1999).
141. Wilson, C. a & Browning, J. L. Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.* **9**, 1321–1333 (2002).
142. Rath, P. C. & Aggarwal, B. B. TNF-induced signaling in apoptosis. *J. Clin. Immunol.* **19**, 350–364 (1999).
143. Griffith, T. S. *et al.* Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* **189**, 1343–1354 (1999).
144. Nizet, V. & Johnson, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 609–17 (2009).
145. Liu, Y. & Zeng, G. Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *J. Immunother.* **35**, 299–308 (2012).
146. Cullen, S. P., Brunet, M. & Martin, S. J. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ.* **17**, 616–623 (2010).
147. Hafeman, D. G. & Lucas, Z. J. Polymorphonuclear leukocyte-mediated, antibody-dependent, cellular cytotoxicity against tumor cells: dependence on oxygen and the respiratory burst. *J. Immunol.* **123**, 55–62 (1979).
148. Cao, D., Boxer, L. A. & Petty, H. R. Deposition of reactive oxygen metabolites onto and within living tumor cells during neutrophil-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Cell. Physiol.* **156**, 428–436 (1993).
149. Lan, A., Lagadic-Gossman, D., Lemaire, C., Brenner, C. & Jan, G. Acidic extracellular pH shifts colorectal cancer cell death from apoptosis to necrosis upon exposure to propionate and acetate, major end-products of the human probiotic propionibacteria. *Apoptosis* **12**, 573–591 (2007).
150. Sharma, V., Kaur, R., Bhatnagar, A. & Kaur, J. Low-pH-induced apoptosis: role of endoplasmic reticulum stress-induced calcium permeability and mitochondria-dependent signaling. *Cell Stress Chaperones* **20**, 431–440 (2015).
151. Fridman, J. S. & Lowe, S. W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030–9040 (2003).

152. Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G. & Chiarugi, P. Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out. *Cancer Letters* **341**, 80–96 (2013).
153. Nasi, A. *et al.* Dendritic cell reprogramming by endogenously produced lactic acid. *J. Immunol.* **191**, 3090–9 (2013).
154. Gottfried, E. *et al.* Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* **107**, 2013–2021 (2006).
155. Mazzi, E. A., Boukli, N., Rivera, N. & Soliman, K. F. A. Pericellular pH homeostasis is a primary function of the Warburg effect: Inversion of metabolic systems to control lactate steady state in tumor cells. *Cancer Sci.* **103**, 422–432 (2012).
156. Dietl, K. *et al.* Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J. Immunol.* **184**, 1200–9 (2010).
157. Dong, H. & Bullock, T. N. J. Metabolic influences that regulate dendritic cell function in tumors. *Front. Immunol.* **5**, 1–7 (2014).
158. Kelly, B. & O’Neill, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* **25**, 771–84 (2015).
159. Parks, S. K., Chiche, J. & Pouyssegur, J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 611–23 (2013).
160. Huber, V. *et al.* Proton dynamics in cancer. *J. Transl. Med.* **8**, 57 (2010).
161. Romero-Garcia, S., Moreno-Altamirano, M. M. B., Prado-Garcia, H. & Sánchez-García, F. J. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front. Immunol.* **7**, 52 (2016).
162. Sonveaux, P. *et al.* Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3930–3942 (2008).
163. Moley, K. H. & Mueckler, M. M. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* **5**, 99–105 (2000).
164. Zhao, Y., Wieman, H. L., Jacobs, S. R. & Rathmell, J. C. Mechanisms and Methods in Glucose Metabolism and Cell Death. *Methods Enzym.* **6879**, 1–16 (2009).
165. King, A. & Gottlieb, E. Glucose metabolism and programmed cell death: an evolutionary and mechanistic perspective. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 885–893 (2009).
166. James, A. D., Chan, A., Erice, O., Siriwardena, A. K. & Bruce, J. I. E. Glycolytic ATP fuels the plasma membrane calcium pump critical for pancreatic cancer cell survival. *J. Biol. Chem.*

288, 36007–19 (2013).

167. Mendes, A. F., Caramona, M. M., Carvalho, A. P. & Lopes, M. C. Hydrogen peroxide mediates interleukin-1 $\beta$ -induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol. Toxicol.* **19**, 203–14 (2003).
168. Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Schumacker, P. T. & Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5737–45 (2007).
169. Clanton, T. L. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **102**, 2379–88 (2007).
170. Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G. & Sgarbi, G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1171–7 (2010).
171. Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**, 177–185 (2006).
172. Zhao, T. *et al.* HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Sci Rep* **4**, 3793 (2014).
173. Espinosa-Diez, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology* **6**, 183–197 (2015).
174. Victor, V. M., Rocha, M. & De La Fuente, M. Immune cells: Free radicals and antioxidants in sepsis. *International Immunopharmacology* **4**, 327–347 (2004).
175. Ye, J. *et al.* Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia. *Cancer Discov.* **4**, 1406–1417 (2014).
176. Martínez-Reyes, I. & Chandel, N. S. Mitochondrial one-carbon metabolism maintains redox balance during hypoxia. *Cancer Discov.* **4**, 1371–1373 (2014).
177. Santoro, E. P. and M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Nat. Cell Death Dis.* **7**, (2016).
178. Maneet Bhatia, Therese C. Karlenius, G. D. T. & Tonissen, and K. F. in *Carcinogenesis* 125–152 (2013).
179. Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Aldieri, E. & Ghigo, D. The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 421–436 (2012).