



**Estudio de la hipoxia, la acidificación y el estrés oxidativo
en un modelo de microambiente tumoral *in vitro* en
queratinocitos transducidos con los oncogenes virales
del HPV-18**

Lic. Natali D’Aiuto Villalba

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Directores: Dr. Miguel Arocena y Dra. Jimena Hochmann

Montevideo, Uruguay

2023

A mi primo Mauri

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco muy especialmente a mis tutores, Miguel y Jimena, por la gran dedicación, paciencia y enseñanza durante todo este proceso. Gracias también a Magui, parte del equipo, por este tiempo compartido. Y a los tres, gracias por los logros que hemos alcanzado juntos, y sobre todo por los momentos que hemos disfrutado fuera del laboratorio, que son tan o más valiosos.

Agradezco también a las diferentes financiadoras que hicieron posible este trabajo de tesis: al programa de maestría del PEDECIBA-Biología, a la CSIC y a la ANII.

Gracias infinitas a los Dptos. de Genómica y de Proteínas y Ácidos Nucleicos del IIBCE, y a la Facultad de Odontología, por prestarme sus instalaciones para llevar a cabo gran parte de este trabajo. Particularmente, a los integrantes del Dpto. de Genómica por las sugerencias y aportes a nuestro grupo de trabajo, así como por incluirnos y hacernos sentir parte desde un principio. Gracias también al CEINBIO de la Facultad de Medicina y al Dpto. de Fisiopatología del Hospital de Clínicas, por prestarnos sus equipos.

A las integrantes del tribunal, gracias por formar parte del mismo, por la dedicación y por las valiosas sugerencias que me dieron.

Muchas gracias a toda mi familia: madre, padre, hermana, abuela, tíos, tías, prima, primos, novio, suegros y cuñados, gracias por acompañarme y apoyarme siempre. Especialmente a mis padres, que desde un principio me han alentado a seguir estudiando y siempre he contado con su apoyo y compañía, y a Gabriel, mi novio, por su amor, apoyo y paciencia todos los días; los amo.

Gracias a mis amigas de siempre, y a las que me dejó la querida Facultad de Ciencias, por apoyarme, alentarme, siempre estar, y sobre todo por alegrarse por mis triunfos; las quiero mucho a todas.

A mis compañeros/as de la cátedra de Bioquímica y Biofísica de la Facultad de Odontología, y del Laboratorio Biológico de Policía Científica, gracias por el apoyo y la compañía.

Un agradecimiento muy especial a Inés Marmisolle (CEINBIO) que, pese a estar luchando una batalla, dedicó tiempo y esfuerzo a ayudarnos a analizar parte de los resultados.

RESUMEN

Durante el desarrollo tumoral inicial, las células deben adaptarse a un microambiente hipóxico, afrontando adaptaciones al estrés causado por la hipoxia, que además de la falta de oxígeno conlleva asimismo el aumento de la acidificación y del estrés oxidativo, con profundas consecuencias para la fisiología celular y la evolución futura del tumor. Por lo tanto, la interacción entre la hipoxia y el estrés oxidativo es un aspecto importante para comprender los efectos del microambiente hipóxico en las células. En trabajos previos, a partir de queratinocitos humanos de la línea celular no tumoral HaCaT, se han generado células que expresan establemente los oncogenes E5, E6 y E7 del virus HPV-18 (HaCaT E5/E6/E7-18), muy asociado a cánceres de alta prevalencia, como el cáncer de cuello de útero y el carcinoma oral. Las células HaCaT E5/E6/E7-18 así obtenidas representan un modelo celular muy útil para estudiar etapas tempranas del desarrollo tumoral. Por otra parte, se ha utilizado una variante del método de hipoxia inducida por cubreobjetos, desarrollada previamente, que permite recapitular los gradientes de hipoxia *in vitro* del microambiente tumoral temprano. De esta forma, se pudo estudiar el proceso de acidificación de las células HaCaT E5/E6/E7-18 en un microambiente hipóxico y visualizar, simultáneamente, los niveles intracelulares de hipoxia y estrés oxidativo de las mismas. Se observó una alta acumulación de CO₂ en condiciones hipóxicas, que es el principal contribuyente a la acidificación en el modelo utilizado. Además, se observaron mayores niveles de especies reactivas del oxígeno en células moderadamente hipóxicas cercanas a la fuente de oxígeno, donde se conservó el potencial de la membrana mitocondrial. Por el contrario, las células a grandes distancias de la fuente de oxígeno mostraron niveles más altos de hipoxia, menor nivel de especies reactivas del oxígeno y un potencial de membrana mitocondrial reducido. Estos resultados contribuyen a caracterizar la interacción entre los niveles reducidos de oxígeno, la acidificación y el estrés oxidativo en un entorno *in*

vitro simple, que se puede utilizar para modelar las respuestas celulares a un ambiente alterado, como el microambiente tumoral temprano.

Palabras claves:

Hipoxia, HPV-18, microambiente tumoral, carcinogénesis, cáncer.

ABREVIATURAS

°C – grados Celsius

μM – micromolar

mL – mililitro

mM - milimolar

mmHg – milímetro de Mercurio

nm – nanómetro

BSA - Bovine Serum Albumin

CO₂ – Dióxido de carbono

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

ECAR – Tasa de acidificación extracelular

HIF-1 – Factor inducido por hipoxia-1

HPV-18 – Virus del papiloma humano-18

O₂ – Oxígeno

OCR – Tasa de consumo de oxígeno

PBS – Buffer salino de fosfato

PAF – Paraformaldehído

pCO₂ – Presión de dióxido de carbono

pO₂ – Presión de oxígeno

SFA – Suero Fetal Bovino

INDICE

Resumen.....	4
Abreviaturas.....	6
1. Introducción.....	9
1.1. Cáncer y carcinogénesis.....	9
1.2. Microambiente tumoral.....	12
1.3. Hipoxia, estrés oxidativo y algunos aspectos del metabolismo en el cáncer.....	14
1.4. Método de inducción de hipoxia.....	18
1.5. HPV y cáncer.....	19
1.6. Modelo celular utilizado y oncogenes del HPV.....	20
2. Hipótesis de trabajo.....	23
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivo general.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. Materiales y métodos.....	25
4.1. Líneas y cultivos celulares.....	25
4.2. Hipoxia inducida por cubreobjetos.....	26
4.3. Cambios morfológicos en un microambiente hipóxico.....	27
4.4. Detección de hipoxia.....	28
4.5. Detección simultánea de hipoxia y ROS.....	29
4.6. Detección de potencial mitocondrial y superóxido.....	29
4.7. Medición de parámetros metabólicos relacionados al metabolismo glucolítico.....	31
4.8. Medidas de velocidad del consumo de oxígeno y acidificación extracelular.....	31
4.9. Análisis estadístico.....	33
5. Resultados.....	34
5.1. Cambios morfológicos en un microambiente hipóxico.....	34
5.2. Hipoxia intracelular inducida por cubreobjetos.....	35

5.3. Detección simultánea de hipoxia y estrés oxidativo.....	38
5.4. Detección simultánea de hipoxia y potencial de membrana mitocondrial...	42
5.5. Estudio de parámetros metabólicos.....	46
6. Discusión.....	53
7. Conclusiones.....	59
Perspectivas a futuro.....	61
Contribuciones.....	62
Referencias bibliográficas.....	63
Anexo.....	66

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer y carcinogénesis

El cáncer es una neoplasia maligna que surge de la división anormal e incontrolada de células que invaden y destruyen el tejido circundante (Nurmik, M. et al; 2020). Los diferentes tipos de cánceres, incluyendo los carcinomas, se caracterizan por ser sistemas complejos, abiertos, y adaptativos. Son complejos, porque el microambiente en el que se encuentran incluye muchos componentes con los que típicamente interactúan a través de dinámicas no lineales. Además, son abiertos debido a que interactúan libremente con las células normales del huésped, y son adaptativos porque dichos componentes con los que interactúan, pueden variar con el tiempo y el espacio (Gillies, R.; Gatenby, R.; 2015).

Los cánceres pueden llegar a propagarse a otros tejidos u órganos, a través de un proceso denominado metástasis. Ésta, es una importante causa de defunción por cáncer, que representa la principal causa de muerte en todo el mundo. En el año 2020 fueron registradas casi 10 millones de defunciones a causa de esta patología (Globocan, 2020). La tumorigénesis, o carcinogénesis en el caso de células epiteliales, es el proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerígenas. La diversidad de dicho proceso, que abarca múltiples tipos de tumores y una abundancia creciente de subtipos, incluye varias aberraciones como resultado de barreras específicas esquivadas por los tejidos pre-tumorales durante la progresión de la carcinogénesis (Hanahan, D.; 2022). Este proceso, implica una serie de múltiples pasos, lo que podría deberse a la necesidad de las células pre-tumorales de adquirir ciertas características que les permitan sortear esas barreras, y así volverse cancerígenas (Hanahan, D., Weinberg, R.; 2011). Es así que, a medida que las células normales

evolucionan a un estado anormal o neoplásico, van adquiriendo, de forma progresiva, una serie de capacidades distintivas y funcionales, que son cruciales para la formación de tumores malignos (Hanahan, D.; 2022).

Hanahan y Weinberg, en los últimos veinte años, han propuesto una serie de capacidades y características del cáncer que constituyen puntos en común a todos los tipos de células cancerígenas y, por lo tanto, a todos los tipos de cáncer. De esta forma, estas capacidades y características tomadas en conjunto, subyacen a la gran diversidad de tipos de tumores, y han ido aumentando en cantidad a lo largo de los años (Hanahan, D., Weinberg, R.; 2000 y 2011; Hanahan, D., 2022). Al día de hoy, son ocho las capacidades distintivas del cáncer propuestas por estos autores, que constituyen marcadores. Dentro de estos, se encuentran: mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir/acceder a la vasculatura (anteriormente planteado como angiogénesis), activar la invasión y la metástasis, evitar la destrucción inmune y reprogramar el metabolismo celular (Fig.1A) (Hanahan, D., 2022). En cuanto a los últimos dos marcadores mencionados, particularmente, en publicaciones anteriores fueron considerados como marcadores emergentes (Hanahan, D., Weinberg, R.; 2011), pero hoy en día ya hay evidencia suficiente de que pueden ser considerados como marcadores principales del cáncer (Hanahan, D., 2022). De todas formas, estas características distintivas por sí solas no abordan las complejidades de la carcinogénesis, por lo que se plantean también dos características favorables para el desarrollo de los tumores: la inflamación promotora de tumores, así como la inestabilidad y mutación del genoma (Fig.1A) (Hanahan, D., Weinberg, R.; 2011; Hanahan, D., 2022). Estas características favorables para el proceso de carcinogénesis, se reflejan en los mecanismos moleculares y

celulares mediante los cuales se adquieren las ocho características distintivas mencionadas anteriormente (Hanahan, D., 2022). En cuanto a la inestabilidad y mutación del genoma, particularmente, es sabido que la activación de oncogenes y pérdida de función de supresores tumorales constituye uno de los eventos iniciales de la carcinogénesis. Mutaciones en oncogenes y supresores tumorales fundamentales, como *KRAS* y *p53*, respectivamente, son eventos iniciales en el desarrollo de múltiples tipos de cáncer (Gerstung, M et al., 2020), que permiten sortear barreras a la proliferación, tales como la inhibición por contacto y concentraciones limitantes de factores tróficos (Gatenby, RA et al, 2008). De esta manera, por ejemplo, es que esta característica facilitadora impulsa las características distintivas para el desarrollo progresivo de los tejidos tumorales.

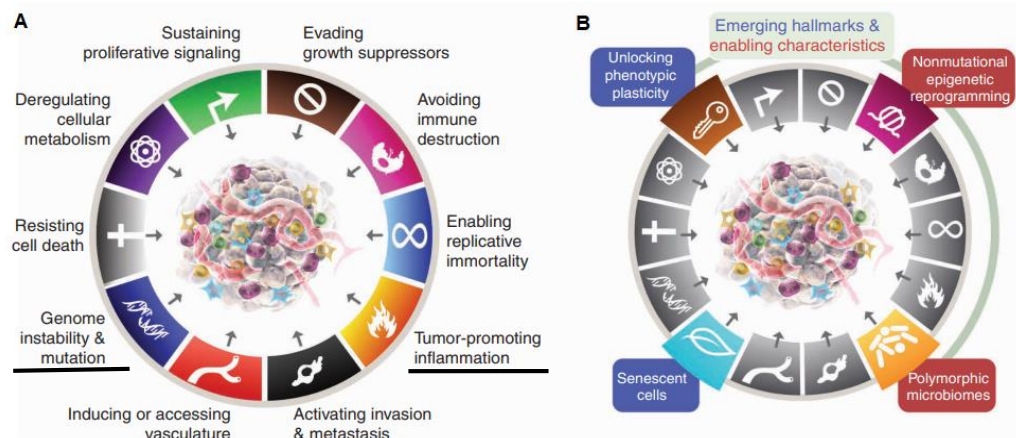


Fig. 1. Marcadores del cáncer y características favorables para la carcinogénesis. **A.** Marcadores del cáncer y características favorables (subrayadas) para el mismo. **B.** Marcadores y características favorables emergentes. (Tomado y modificado de Hanahan, D.; 2022).

Además, se han propuesto nuevos marcadores emergentes del cáncer y nuevas características favorables para la formación del mismo. Éstas incluyen el “desbloqueo de la plasticidad fenotípica” y “células senescentes” como marcadores emergentes, así como

“reprogramación epigenética no mutacional” y “microbiomas polimórficos” como características favorables (Fig.1B) (Hanahan, D.; 2022).

1.2. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral ha sido identificado como uno de los factores fundamentales e impulsores de la carcinogénesis, la progresión e invasión tumoral (Nurmik, M. et al; 2020).

La composición del microambiente tumoral varía entre los diferentes tipos de tejidos neoplásicos. Sin embargo, hoy en día es sabido que está compuesto no sólo por células cancerígenas homogéneas, si no por poblaciones heterogéneas e interactivas de células cancerígenas y células madre cancerígenas, junto con una multiplicidad de tipos de células reclutadas (Hanahan, D., Weinberg, R.; 2011) y diferentes factores que comprenden parte de las características distintivas del microambiente tumoral general. Estas células y factores van desde células inmunitarias, como los linfocitos T, B y asesinos naturales (NK), células del estroma y vasos sanguíneos, hasta factores ambientales más amplios, como la rigidez de la matriz extracelular, hipoxia y presión intersticial (Fig.2) (Nurmik, M. et al., 2020; Boedtkjer, E. y Pedersen, S., 2020).

Al comienzo de la carcinogénesis, las células cancerígenas comienzan a interactuar con el resto de los componentes del microambiente tumoral, por ejemplo, reclutando células del estroma de los tejidos vecinos, a los efectos de apoyar la supervivencia de las células cancerígenas, la invasión local y la diseminación metastásica. Las células del estroma varían entre los diferentes tipos de tumores, pero generalmente incluyen células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y células estrelladas. En relación con dichas células, el

microambiente tumoral organiza la secreción de factores de crecimiento, como el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), citoquinas, entre otros factores, promoviendo la angiogénesis, la proliferación y la invasión del tejido tumoral, y, eventualmente, la metástasis hacia otros tejidos u órganos (Anderson, N. y Simon, M.; 2020).

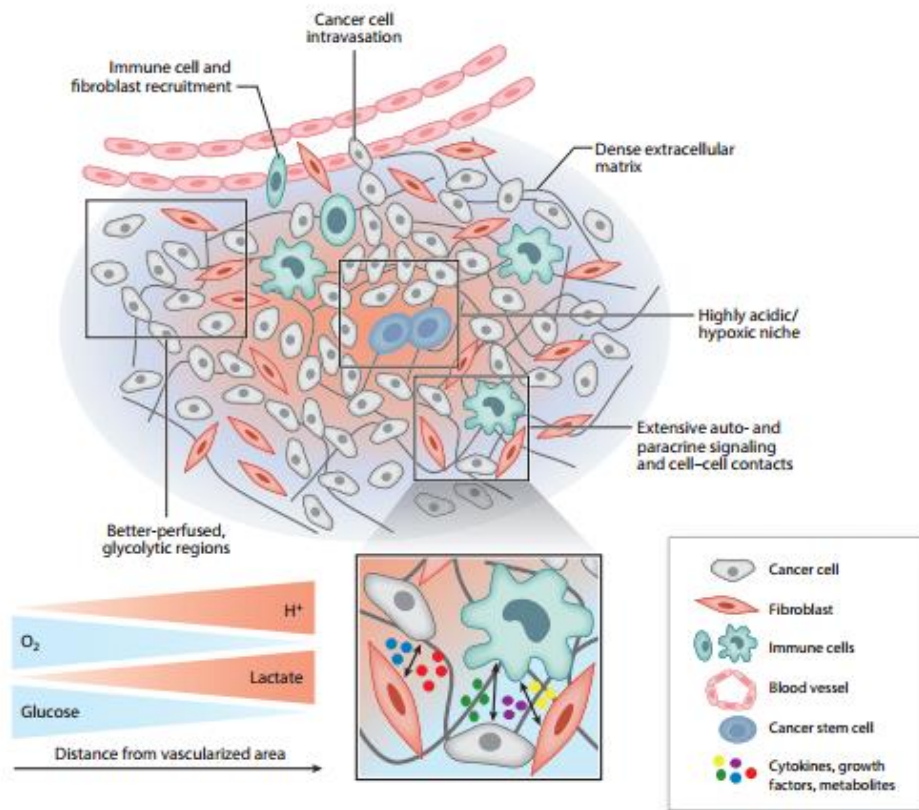


Figura 2. Esquema de las características principales del microambiente tumoral. Se ilustran las características claves del microambiente tumoral: las concentraciones reducidas de O_2 y glucosa y, en consecuencia, las concentraciones aumentadas de H^+ y lactato, que ocurren a medida que aumenta la distancia a la vasculatura. (Tomada de Boedtkjer, E; Pedersen, S.; 2020).

Las características del microambiente tumoral incluyen una proliferación descontrolada, un metabolismo energético desregulado

y una perfusión insuficiente, generando un ambiente hostil para las células (Boedtkjer, E. y Pedersen, S.; 2020). Estas características generan que el microambiente tumoral sea hipóxico, es decir, con una baja disponibilidad de oxígeno; ácido, debido a la alta concentración de componentes ácidos, como el lactato, como producto del aumento del metabolismo glucolítico; así como también es un microambiente con un alto nivel de estrés oxidativo (Martínez-Reyes, I. y Chandel, N.; 2021; Boedtkjer, E. y Pedersen S.; 2020) (Fig. 2). Como consecuencia, el microambiente tumoral promueve la angiogénesis, o el acceso a la vasculatura, para restaurar el suministro de oxígeno y nutrientes, así como para eliminar los desechos metabólicos (Anderson, N., Simon, M.; 2020).

Por lo tanto, una combinación de hipoxia, acidificación y otras fuentes de estrés vinculadas, como la falta de nutrientes y el estrés oxidativo, cooperan para imponer presiones selectivas muy fuertes en las etapas tempranas del crecimiento tumoral, lo que genera la aparición de subpoblaciones tumorales con mayor capacidad de adaptarse, sobrevivir y eventualmente invadir otros tejidos u órganos (metástasis), por lo cual dichas subpoblaciones pueden constituir la base del comportamiento agresivo de un tumor (Gillies et al., 2002; Gillies & Gatenby, 2007; Ibrahim Hashim et al., 2017).

1.3. Hipoxia, estrés oxidativo y algunos aspectos del metabolismo en el cáncer

La hipoxia es un estado de deficiencia del oxígeno necesario para llevar a cabo los procesos metabólicos requeridos por las células. La disponibilidad de oxígeno es un parámetro clave en el funcionamiento de los tejidos, así como en la génesis y evolución de diversas patologías, especialmente el cáncer, por lo que la hipoxia es

considerada uno de los principales componentes fisiológicos del microambiente tumoral (Gillies R. y Gatenby, R., 2007) (Fig. 3).

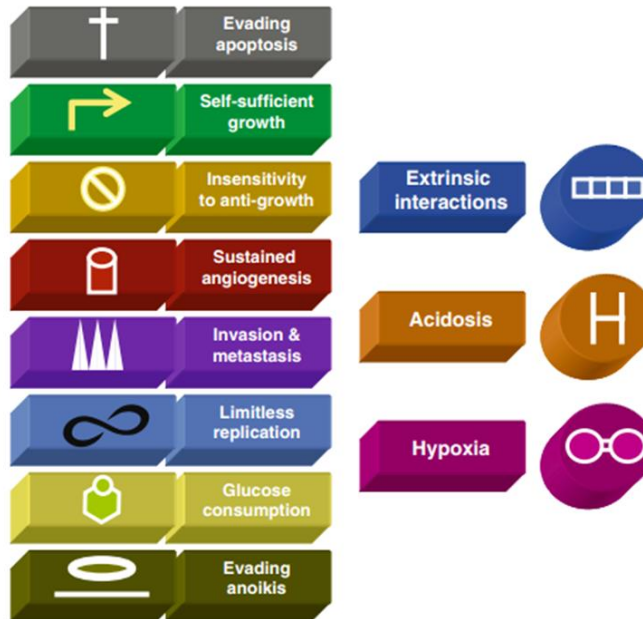


Figura 3. Marcadores del cáncer adaptados de Hanahan y Weinberg, 2000. A la izquierda se indican algunos de los marcadores del cáncer, y a la derecha se muestran tres componentes importantes del microambiente fisiológico que pueden conllevar a la progresión del cáncer, siendo el más importante la hipoxia (tomada de Gillies R. y Gatenby, R., 2007).

La presencia de áreas extensas de tejido hipóxico en tumores humanos ha sido ampliamente demostrada *in vivo*, midiéndose en ellas presiones parciales de oxígeno inferiores a los 10 mmHg, e incluso a los 2,5 mmHg, mientras que en tejido normóxico varían entre 20 y 40 mmHg (Vaupel, P. et al., 2007; Mcnamee, E.N. et al., 2013). La hipoxia tumoral se ha detectado, entre otros, en cáncer de cuello uterino, cánceres de mucosa oral, cáncer de mama, cáncer de próstata y de pulmón, y bajos niveles de oxígeno tisular se han correlacionado con peores pronósticos, por ejemplo, en pacientes de cáncer de cuello uterino y cáncer oral (Vaupel, P et al., 2007). En los

tumores, la hipoxia ocurre de manera heterogénea, por irregularidades en la vascularización del tejido tumoral o por ausencia de vascularización en la etapa pre-angiogénica inicial, en la cual las regiones internas de la masa tumoral se vuelven más hipóxicas que las regiones superficiales, más cercanas de los capilares del tejido peri-tumoral (Fig. 2) (Gillies, R.J. et al, 2007; Boedtkjer, E y Pedersen, S., 2020).

En respuesta a la disminución de oxígeno, se activa el factor de transcripción HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). HIF-1 está compuesto por dos subunidades, una constitutiva (HIF-1 β) y otra cuya expresión depende del nivel de oxígeno (HIF-1 α) (Peng, Q. et al., 2017). En normoxia, HIF-1 α es hidroxilada en residuos de prolina mediante la actividad de prolin hidroxilasas, enzimas que requieren de oxígeno molecular para su actividad. La hidroxilación de prolinas en HIF-1 α determina su unión a la proteína supresora tumoral Von Hippel-Lindau (VHL), desencadenando la ubiquitinación y degradación de HIF-1 α por el proteasoma (Toth, RK et al, 2017). En hipoxia, HIF-1 α no sufre hidroxilación, no es degradada y sus niveles aumentan, estimulando así la transcripción de múltiples genes, entre ellos el factor angiogénico VEGF, el transportador de glucosa GLUT1 y varias enzimas de la vía glucolítica (Dengler, VL et al., 2014).

De esta manera, las células tumorales se adaptan reprogramando su metabolismo, aumentando su capacidad glucolítica para compensar la disminución de la respiración celular y, por ende, acidificando considerablemente el medio extracelular, debido, en gran medida, al incremento de lactato (Gatenby, RA et al., 2008). La baja perfusión normalmente limita tanto el suministro de O₂ como la eliminación de productos de desechos ácidos. A su vez, el metabolismo oxidativo elevado consume O₂ y produce CO₂, que conduce a la liberación de H⁺ y, además, el CO₂ reacciona con el agua para formar ácido carbónico (Boedtkjer, E. y Pedersen, S., 2020). Debido a la baja

disponibilidad de oxígeno, la desregulación de las mitocondrias de las células tumorales, y la alta demanda de energía, como parte de la reprogramación metabólica que sufren las células normales al tener que adaptarse al microambiente tumoral, y de acuerdo a la hipótesis de Warburg, las células cancerígenas realizan glucólisis y fermentación láctica, que no requiere O_2 y libera lactato y H^+ , aún en presencia de oxígeno (Gillies, RJ et al, 2007). Es así que, desde el metabolismo oxidativo al fermentativo, se producen componentes ácidos que acidifican el medio extracelular.

Por otro lado, las zonas hipóxicas de los tumores sufren de un aumento del estrés oxidativo, con niveles aumentados de especies reactivas del oxígeno (ROS), alteración del funcionamiento de las mitocondrias, así como de mayores niveles de daño al ADN (Tafani, M et al., 2016; Bristow, RG et al., 2008). Las principales especies de ROS generadas en las células cancerígenas son el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Además, las células cancerígenas tienen una alta tasa de producción de $O_2^{\cdot-}$ a partir de las oxidasas mitocondriales ETC y NADPH, que se convierte rápidamente en H_2O_2 por las superóxido dismutasas 1 o 2 (Martínez-Reyes, I. y Chandel, N., 2021).

Este estrés celular producido por las características del microambiente tumoral temprano, impone presiones selectivas muy fuertes, que determinan la evolución futura del tumor, impulsando el proceso de invasión y diseminación que culmina en la metástasis tumoral (Gatenby, RA et al.; 2008).

1.4. Método de inducción de hipoxia

El estudio de las respuestas celulares a la hipoxia requiere de modelos *in vitro* que recapitulen propiedades del microambiente tumoral temprano, en el cual la hipoxia y la acidificación extracelular aumentan en las regiones tumorales más alejadas de su fuente de oxígeno, los capilares del tejido peri-tumoral (Gillies, RJ et al, 2007). Recientemente, ha sido desarrollada por el Dr. Miguel Arocena y colaboradores, una variante del método denominado "hipoxia inducida por cubreobjetos", logrando mantener células en cultivo a distancias crecientes de una fuente de oxígeno, lo que permite recapitular los gradientes de hipoxia y de acidificación extracelular del microambiente tumoral temprano (Arocena et al., 2019).

Este método es muy sencillo de implementar y permite recapitular parámetros fundamentales del microambiente hipóxico de los tumores tempranos. Por lo tanto, constituye un modelo muy útil para estudiar procesos clave de la carcinogénesis temprana, en particular, cómo la hipoxia y el aumento del estrés celular conducen a respuestas adaptativas, entre ellas la reprogramación metabólica y también respuestas antioxidantes, de supervivencia celular, de angiogénesis, e invasión celular. Cabe destacar que este método, además, se adecúa muy bien al análisis microscópico, en particular por microscopía confocal. De esta forma, utilizando esta metodología en trabajos previos, se han observado evidencias que sugieren una reprogramación metabólica, con aumento de gotitas lipídicas y marcados cambios en la morfología mitocondrial (Arocena M. et al, 2019). Es así que este modelo *in vitro* del microambiente tumoral temprano hipóxico, constituye una herramienta muy útil para caracterizar las respuestas de las células en proceso de transformación maligna frente al estrés celular producido durante la hipoxia tumoral.

1.5. HPV y cáncer

Existen virus oncogénicos con oncogenes en su genoma que inducen el proceso de transformación maligna. Uno de estos tipos de virus oncogénicos son los Papiloma Virus Humanos (HPV), que están asociados a diversos tipos de cáncer. En particular, los tipos 16 y 18 (HPV-16 y HPV-18) son responsables de aproximadamente el 70% de los casos de cáncer de cuello uterino (Serrano, B et al, 2018), y están muy vinculados también a la génesis del carcinoma oral, en particular el carcinoma orofaríngeo (Marur, S et al 2010). La organización de su genoma es típico de los α -papilomavirus de alto riesgo (incluidos HPV-16 y HPV-18) y comprende una región de control larga (LCR) y ocho genes que son necesarios para las diferentes etapas del ciclo de vida del virus (Doorbar et al., 2012) (Fig.4).

Los oncogenes virales E5, E6 y E7 de los HPV de alto riesgo, tales como HPV-16 y HPV-18, son los principales responsables de la transformación maligna inducida por estos virus (Oyervides-Muñoz, MA et al, 2018). Un mecanismo fundamental de acción de estos oncogenes es la degradación de los supresores tumorales p53 y pRB, mediada respectivamente por E6 y E7 (Defilippis, RA et al, 2003). Además, E6 y E7 son oncogénicas debido a sus efectos en diversas vías de señalización celular, ya que impactan en procesos implicados en la carcinogénesis, por ejemplo, contribuyendo a la inhibición de la apoptosis, a la transición epitelio-mesénquima y a la invasión celular (Mclaughlin-Drubin, ME et al, 2009; Hochmann J. et al., 2020). Por otra parte, E5 interactúa con el receptor del factor de crecimiento EGF (EGFR), activando la vía de señalización de las MAP kinasas, fundamental en la proliferación y supervivencia celular, entre otros procesos (DiMaio, D et al, 2013).

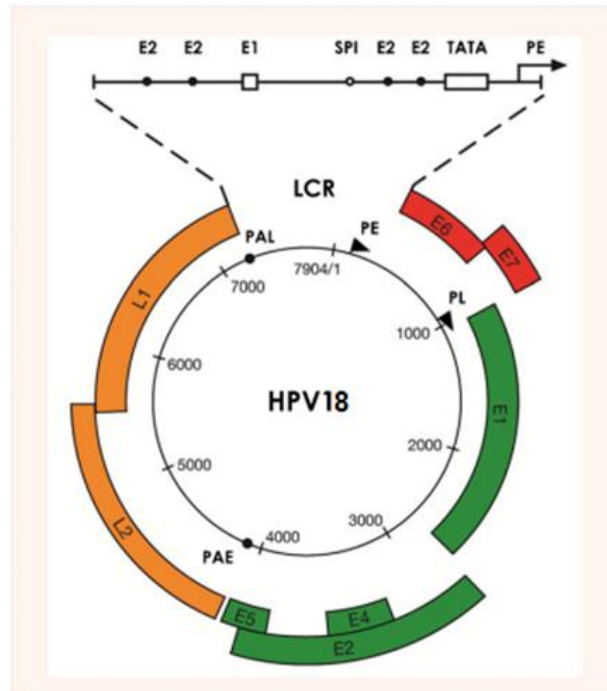


Fig. 4. Genoma del HPV-18. Esquema de la organización del genoma viral del HPV-18 (Tomada y modificada de Doorbar et al., 2012).

1.6. Modelo celular utilizado y oncogenes del HPV

En este trabajo se estudiaron los mecanismos subyacentes de la transformación maligna que pueden conducir a la formación de un carcinoma de células escamosas. Por lo tanto, como modelo de estudio, se emplearon queratinocitos humanos de piel en una etapa intermedia de la transformación maligna. Por lo cual, éste, constituye un buen modelo celular para dilucidar los mecanismos involucrados que conllevan al desarrollo del cáncer.

Los carcinomas son tipos de tumores malignos que se desarrollan a partir de células epiteliales, y constituyen el tipo más común de cáncer. Particularmente, los carcinomas de células escamosas son tipos de tumores malignos que derivan de los queratinocitos de la piel y las membranas mucosas (Victoria Bárzaga, H. C., 2010). Según el

Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos de América (NIH), la mayoría de los cánceres de cabeza y cuello, cuello uterino y vagina son carcinomas de células escamosas (NIH). Por lo tanto, estudiar el proceso de carcinogénesis, que conlleva al desarrollo de los carcinomas, podría contribuir a futuras estrategias terapéuticas.

Previo a este trabajo, se ha estudiado la cooperación *in vitro* de tres oncogenes virales: E5, E6 y E7 del HPV-18, durante la transformación celular maligna. Para esto, la Dra. Jimena Hochmann y colaboradores han generado, a partir de la línea celular HaCaT -queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente pero no tumorales-, una línea celular expresando los oncogenes E5, E6 y E7 del HPV-18 (HaCaT E5/E6/E7-18) (Hochmann, J. et al., 2020). En dicho estudio se detectó que las células que contienen los tres oncogenes juntos presentan una mayor tasa proliferativa, una mayor migración y mayor invasión celular a través de una matriz de colágeno. Además, se observó una modulación del estado redox en las células co-transducidas con los tres oncogenes virales en relación a las células HaCaT parentales, y, en particular, un aumento de la capacidad antioxidante celular. Por lo tanto, estas células son más invasivas y proliferativas que las HaCaT parentales, presentan mayores niveles de estrés oxidativo, así como mayores niveles de proteínas antioxidantes, y tienen aumentada la expresión de enzimas de la vía glucolítica. Esto indica que las HaCaT E5/E6/E7-18 están ingresando en el proceso de transformación maligna y representan, por lo tanto, un modelo de progresión tumoral. Dicho modelo permite estudiar cómo la introducción de los oncogenes virales E5, E6 y E7 modifica múltiples parámetros de la fisiología celular en relación a las células HaCaT parentales, así como también permite estudiar eventos tempranos en el desarrollo tumoral.

Este trabajo, por lo tanto, contribuye a caracterizar la interacción entre los niveles reducidos de oxígeno, la acidificación, y el estrés oxidativo, en un entorno *in vitro* simple, a través de un método que se puede utilizar para modelar las respuestas celulares a un ambiente alterado, como es el microambiente del tumor temprano, en un modelo celular que se encuentra en un estadio intermedio de carcinogénesis.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Recientemente, hemos demostrado que la expresión en células HaCaT de los oncogenes virales E5, E6 y E7 de HPV-18 potencia algunas características del proceso carcinogénico, tales como la proliferación, migración e invasión celular, y, por otra parte, fortalece la respuesta adaptativa al estrés celular, particularmente el estrés oxidativo. Por otra parte, el modelo de microambiente hipóxico *in vitro* desarrollado es capaz de, por un lado, inducir altos niveles de estrés celular, en particular estrés oxidativo, y, por otro, de desencadenar respuestas celulares adaptativas, empezando por evidencias indirectas que sugieren la reprogramación metabólica a un fenotipo más glucolítico. Por lo tanto, en este trabajo, planteamos la hipótesis de que las células pre-tumorales HaCaT E5/E6/E7-18, sometidas a un microambiente hipóxico, serán capaces de desarrollar respuestas adaptativas frente a los distintos tipos de estrés oxidativo inducidos por dicho microambiente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo de este trabajo es caracterizar las respuestas adaptativas de células pretumorales frente a un microambiente alterado *in vitro*, que recapitula propiedades fundamentales del microambiente tumoral temprano *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

- Estudiar la respuesta hipóxica de las líneas celulares HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18.
- Estudiar de forma simultánea los niveles de hipoxia y estrés oxidativo de las líneas celulares HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18.
- Estudiar los niveles del radical libre superóxido mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial de las células HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18.
- Estudiar los niveles de O₂, CO₂, lactato y pH, en el sobrenadante de cultivo de las líneas celulares HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18, tanto en normoxia como en hipoxia.
- Estudiar las velocidades del consumo de oxígeno y de la acidificación extracelular en ambas líneas celulares.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Líneas y cultivos celulares

Las células de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente (HaCaT) fueron adquiridas del Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil (número de lote 001071, certificado de análisis proporcionado por el proveedor), y mantenidas en medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa (Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (Gibco, MA, EE. UU.). Además, las células HaCaT fueron analizadas internamente para micoplasma por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las células HaCaT E5/E6/E7 HPV-18 se obtuvieron mediante una co-transducción con los oncogenes virales del HPV-18, utilizando dos vectores retrovirales, simultáneamente (Fig. 5). Uno de ellos contiene el plásmido MSCV-N-puro-18E5 (Addgene # 37882, MA, EE. UU.), presentando el oncogén E5 del HPV-18 y el gen de resistencia al antibiótico puromicina, y el otro, pLXSN-E6/E7-18, que presenta los genes E6/E7 clonados de HPV-18, y un gen de resistencia al antibiótico geneticina (Fig. 5). Este último, fue gentilmente cedido por la Dra. Laura Sichero, jefa del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Do Cancer do Estado de São Paulo. Luego de la co-infección con ambos vectores, las células HaCaT conteniendo los oncogenes E5, E6 y E7 del HPV-18 (HaCaT E5/E6/E7-18), fueron seleccionadas con los respectivos antibióticos (Hochmann et al, 2020).

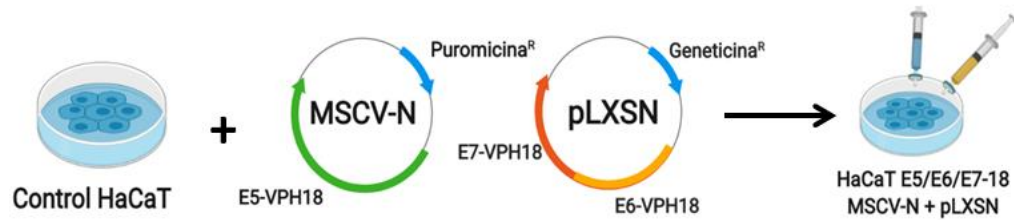


Fig. 5. Construcción de la línea celular estable HaCaT que expresa las oncoproteínas virales E5/E6/E7 del HPV-18, utilizando vectores retrovirales como sistema de expresión (tomada y modificada de la difusión de la tesina de grado del Lic. Felipe Parietti).

4.2. Hipoxia inducida por cubreobjetos

Para inducir un microambiente hipóxico se utilizó la variante de hipoxia inducida por cubreobjetos (ver introducción, sección 1.4). Las células, tanto HaCaT E5/E6/E7-18 como HaCaT parentales, fueron cultivadas en los pocillos (20 mm de diámetro, 1 mm de profundidad) de placas con fondo de vidrio de 35 mm (Cellvis, CA, EE. UU.), y luego de que las células quedaron adheridas, los pocillos fueron cubiertos con cubreobjetos cuadrados de acrílico, de 24 mm de ancho y 2 mm de espesor, que presentan una perforación en el medio de 1 mm de ancho (Fig. 6). De esta forma, es posible obtener placas de cultivo celular donde las células se encuentren a diferentes distancias del orificio del cubreobjetos, que sirve como la única fuente de oxígeno.

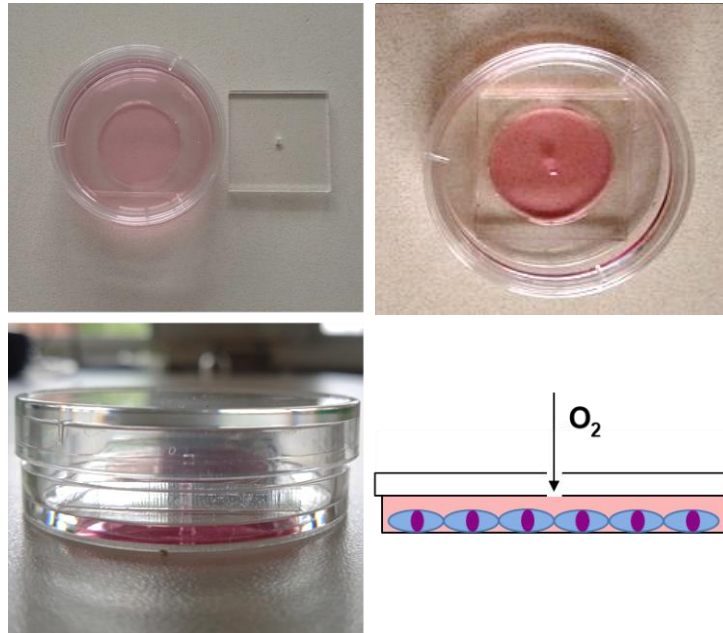


Fig.6. Esquema de la variante del método de hipoxia inducida por cubreobjetos. Se ilustra la cámara de cultivo celular utilizada para inducir hipoxia mediante la variante por cubreobjetos. Se coloca un cubreobjetos cuadrado de acrílico, con un orificio central, encima del pocillo de una placa con fondo de vidrio de 35 mm. El orificio central representa la única fuente de oxígeno, por lo cual las células dentro del pocillo se encuentran a diferentes distancias de él.

4.3. Cambios morfológicos en un microambiente hipóxico

Luego de 24 horas de incubación con y sin cubreobjetos, se observó a las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales progresivamente por microscopía de contraste de fases. Para esto, se utilizó un microscopio invertido Nikon Diaphot, y objetivos de contraste de fase de 10X y 20X, ubicado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

4.4. Detección de hipoxia

Para la detección de hipoxia en células fijadas, tanto HaCaT parentales como HaCaT E5/E6/E7-18, se utilizó un kit de detección de hipoxia (Hypoxyprobe, MA, USA) que consiste en pimonidazol, que forma aductos proteicos, mayoritariamente con proteínas que contienen grupos tioles, cuando los niveles de oxígeno son muy bajos ($pO_2 < 10$ mmHg), y un anticuerpo que reconoce dichos aductos formados entre pimonidazol y proteínas, conjugado directamente a un fluoróforo (Raleigh J. et al., 2000). Las células previamente incubadas con cubreobjetos durante 22 horas, se incubaron por 2 horas más con el marcador de hipoxia pimonidazol, a una concentración final de 200 μ M en el medio. El pimonidazol fue añadido a través del orificio central del cubreobjetos, para no alterar las condiciones de hipoxia. Luego, las células se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído (PAF) al 4 %, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), se permeabilizaron con el detergente suave Tritón X100 al 0,1%, se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3 % y se tiñeron con un anticuerpo que reconoce los aductos de pimonidazol, y que está conjugado al fluoróforo Dylight™ 549 (dilución de 1:200). Además, los núcleos fueron teñidos con 4', 6 diamidino 2 fenilindol (DAPI; Invitrogen, MA, EE. UU.). Luego, las células fueron visualizadas a través del microscopio confocal Zeiss LSM 800, del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Para la detección de hipoxia en células vivas, tanto HaCaT parentales como HaCaT E5/E6/E7-18, se utilizó la sonda de detección de hipoxia BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye (Millipore, CA, EE. UU., concentración final de 5 μ M). Para esto, a las 21 horas de incubación con cubreobjetos, se añadió, a través del orificio central del mismo, la sonda BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye. También se agregó la sonda a las células incubadas sin cubreobjetos, a modo de control.

Luego de 3 horas de incubación, completando las 24 horas de tratamiento, las células fueron visualizadas mediante microscopía confocal durante un tiempo máximo aproximado de 30 minutos, mientras son mantenidas a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se cuantificó la señal de fluorescencia de la sonda BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye mediante el software ImageJ, versión 1.46r.

4.5. Detección simultánea de hipoxia y ROS

Para evaluar simultáneamente los niveles de hipoxia y ROS en las células HaCaT vivas, tanto parentales como las que expresan los oncogenes E5/E6/E7-18, a las 21 horas del tratamiento con cubreobjetos, se añadió, a través del orificio central del mismo, la sonda de detección de hipoxia BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye (Millipore, CA, EE. UU., concentración final de 5 Mm; 498/520nm excitación/emisión) junto con el reactivo de detección de ROS, Fluorometric Intracellular ROS Kit Deep Red Fluorescence (Sigma, MO, EE. UU., dilución 1:1000 de la solución madre 500X; 640/675nm excitación/emisión). Lo mismo se realizó a las células incubadas sin cubreobjetos, a modo de control; y luego de 3 horas (completando las 24 horas de tratamiento) las células fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Posteriormente, se cuantificó la señal de fluorescencia de la sonda ROS Deep Red mediante el software ImageJ, versión 1.46r.

4.6. Detección de potencial mitocondrial y superóxido

Para detectar el potencial mitocondrial en las células vivas, tanto HaCaT parentales como HaCaT E5/E6/E7-18, se utilizó la sonda

fluorescente en rojo lejano MitoTracker Deep Red FM (Thermo Scientific, EE. UU.), que tiñe las mitocondrias en células vivas y muestra una acumulación que depende del potencial de la membrana mitocondrial (Greene, A. W. et al., 2012; Townley, A. R. y Wheatley, S. P.).

Luego de 21 horas de tratamiento con cubreobjetos, se añadió la sonda MitoTracker Deep Red a través del orificio central del cubreobjetos (concentración final de 500 nM), junto con la sonda de detección de hipoxia, BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye (concentración final de 5 µM), y las células fueron incubadas durante 3 horas más a 37 °C. Lo mismo se realizó a las células cultivadas sin cubreobjetos, a modo de control. Finalmente, las células fueron visualizadas mediante microscopía confocal y se cuantificó la señal de fluorescencia de la sonda MitoTracker Deep Red mediante el software ImageJ, versión 1.46r.

Para detectar el radical libre superóxido en las células HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18, se añadió a las células incubadas con cubreobjetos durante 24 horas, el indicador de superóxido mitocondrial rojo MitoSOX™ para células vivas (Thermo Scientific, EE. UU.) a través del orificio del cubreobjetos (concentración final de 5 µM). También se agregó la misma sonda a las células que fueron incubadas sin cubreobjetos, a modo de control. Luego, las células fueron incubadas durante 10 minutos a 37 °C, y fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Finalmente, la señal de fluorescencia de la sonda MitoSOX™ fue cuantificada mediante el software ImageJ, versión 1.46r.

4.7. Medición de parámetros metabólicos relacionados al metabolismo glucolítico

Las células HaCaT parentales y E5/E6/E7-18, fueron incubadas con y sin cubreobjetos durante 24 horas. Luego, se recolectaron los sobrenadantes de las mismas y se analizaron inmediatamente en un radiómetro ABL800Flex (Dpto. de Fisiopatología, Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela”, Facultad de Medicina, UdelaR) para obtener valores de pH, niveles de O₂, lactato y CO₂, así como valores de concentración de los principales iones extracelulares presentes en el medio de cultivo.

4.8. Medidas de velocidad de consumo de oxígeno y acidificación extracelular

Las velocidades del consumo de O₂ (OCR) y de la acidificación extracelular (ECAR), parámetros del metabolismo oxidativo, fueron determinadas para las células HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18, mediante el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent, EE.UU.), presente en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) de la Facultad de Medicina, UdelaR. Este analizador permite determinar simultáneamente OCR y ECAR en ambas líneas celulares, en normoxia. Los valores obtenidos fueron normalizados tomando en cuenta la cantidad de núcleos celulares teñidos con DAPI (Invitrogen, MA, EE.UU.), y posterior conteo automático de los mismos usando el programa ImageJ (versión 1.46r). Se realizaron las medidas en células en cultivo, en placas V7 de poliestireno (Agilent, EE.UU.). El día del ensayo, se reemplazó el medio de cultivo por el medio del ensayo (DMEM con NaCl 32 mM, glucosa 5 mM, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, pH 7.4) y se

incubó durante 1 hora a 37 °C en incubadora sin CO₂. El consumo de O₂ se midió antes y después del agregado secuencial de inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa, para lo cual se utilizó: un inhibidor de la ATP sintasa (oligomicina, 1 μM), que permite evaluar el consumo de oxígeno de la célula vinculado a la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa; un desacoplante (carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona, FCCP 1 μM), que indica cuál es el máximo consumo de oxígeno que puede tener la célula en situaciones de demanda energética; e inhibidores de los complejos I y III de la cadena respiratoria (rotenona, 0,1 μM y antimicina A, 1 μM, respectivamente), para distinguir el consumo de oxígeno mitocondrial del no mitocondrial. La respiración resistente al agregado de antimicina A y rotenona se sustrajo a todas las medidas para determinar el consumo de oxígeno debido exclusivamente al transporte de electrones en la cadena respiratoria (Fig. 7).

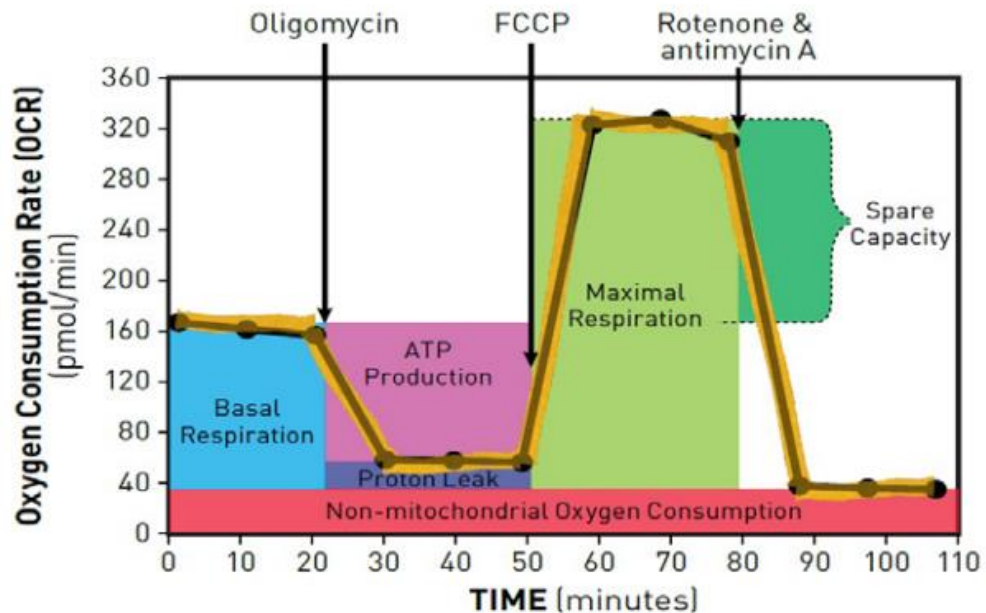


Fig. 7. Parámetros y perfil cinético del consumo de oxígeno con el analizador de flujo extracelular Seahorse XF. (Tomado de la guía del usuario del Agilent Seahorse XF).

Para la cuantificación de OCR y ECAR, se incluyeron los tres primeros valores, antes del agregado de Oligomicina.

4.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico y las representaciones gráficas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se presentaron como media \pm desviación estándar (DE). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía, no apareado, seguido de la prueba post-hoc HSD de Tukey, con excepción de los datos recuperados de Seahorse Analyzer, que se analizaron mediante la prueba t de Student para comparar sólo dos medias. En todos los casos, la significancia estadística fue determinada considerando un valor de $p < 0,05$, y se tomó como referencia para considerar significancias estadísticas los siguientes p-valor: (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, (****) $P < 0.0001$.

5. RESULTADOS

5.1. Cambios morfológicos en un microambiente hipóxico

Para visualizar la respuesta morfológica al cambio del microambiente de las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales, se las observó mediante microscopía de contraste de fases luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos. Se observó también a las células de ambas líneas celulares sin cubreobjetos (Fig.8 A y C), comparando su morfología con respecto a las que se encuentran en estado de hipoxia inducida por cubreobjetos (Fig. 8 B y D).

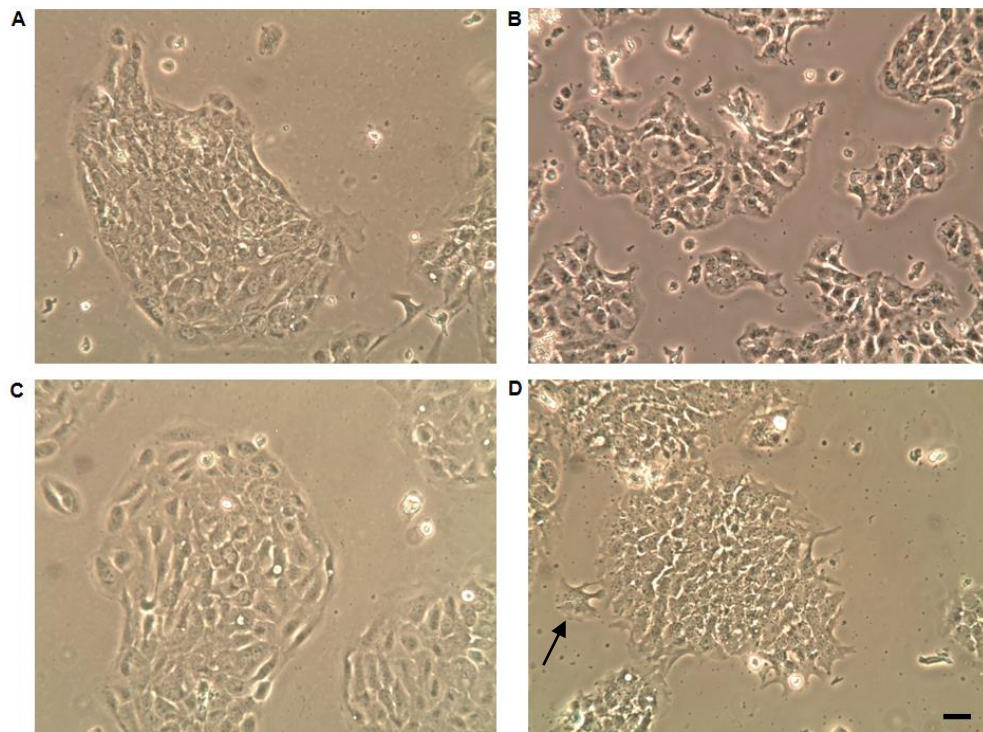


Fig.8. Cambios morfológicos observados en células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales en condiciones de normoxia e hipoxia, por microscopía de contraste de fases. **A.** HaCaT parentales sin cubreobjetos. **B.** HaCaT parentales luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos. **C.** HaCaT E5/E6/E7-18 sin cubreobjetos. **D.** HaCaT E5/E6/E7-18 luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos (con la flecha se señala una célula a modo de ejemplo). Barra de calibración (A-D): 20 μ m.

Se visualizó, en ambos casos, diferencias notorias en la morfología de las células luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos (Fig. 8 B y D), es decir, células que se encuentran en un estado de hipoxia, con respecto a las mismas células sin tratamiento con cubreobjetos (Fig. 8 A y C). Las células a las que se les indujo un microambiente hipóxico (Fig. 8 B y D) presentan una forma más irregular que las células sin tratamiento con cubreobjetos, las cuales presentan una apariencia normal de células de tejido epitelial (Fig. 8 A y C).

5.2. Hipoxia intracelular inducida por cubreobjetos

Las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales fueron cultivadas durante 24 horas mediante la variante del método hipoxia inducida por cubreobjetos, descrita anteriormente (Fig.6), con el orificio central como única fuente de oxígeno.

Para la detección de hipoxia, luego de 24 horas de tratamiento con el cubreobjetos, a través del kit Hypoxyprobe para células fijadas, se pudo visualizar, mediante microscopía confocal, niveles altos de hipoxia intracelular, a través de la detección de los aductos de pimonidazol, en las zonas periféricas de las placas de cultivo, mientras que en el centro de las mismas no se detectó niveles de hipoxia (Fig.9). Sin embargo, al utilizar la sonda de detección de hipoxia BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye, para células vivas, se observó un nivel moderado de hipoxia intracelular cerca del centro de las placas de cultivo, a pesar de que la señal fue mucho más fuerte en las zonas periféricas (Fig.11A). Esto indica que los niveles de hipoxia intracelular son más altos en las zonas periféricas de la placa de cultivo, pero que también pueden encontrarse niveles moderados en el centro de la misma.

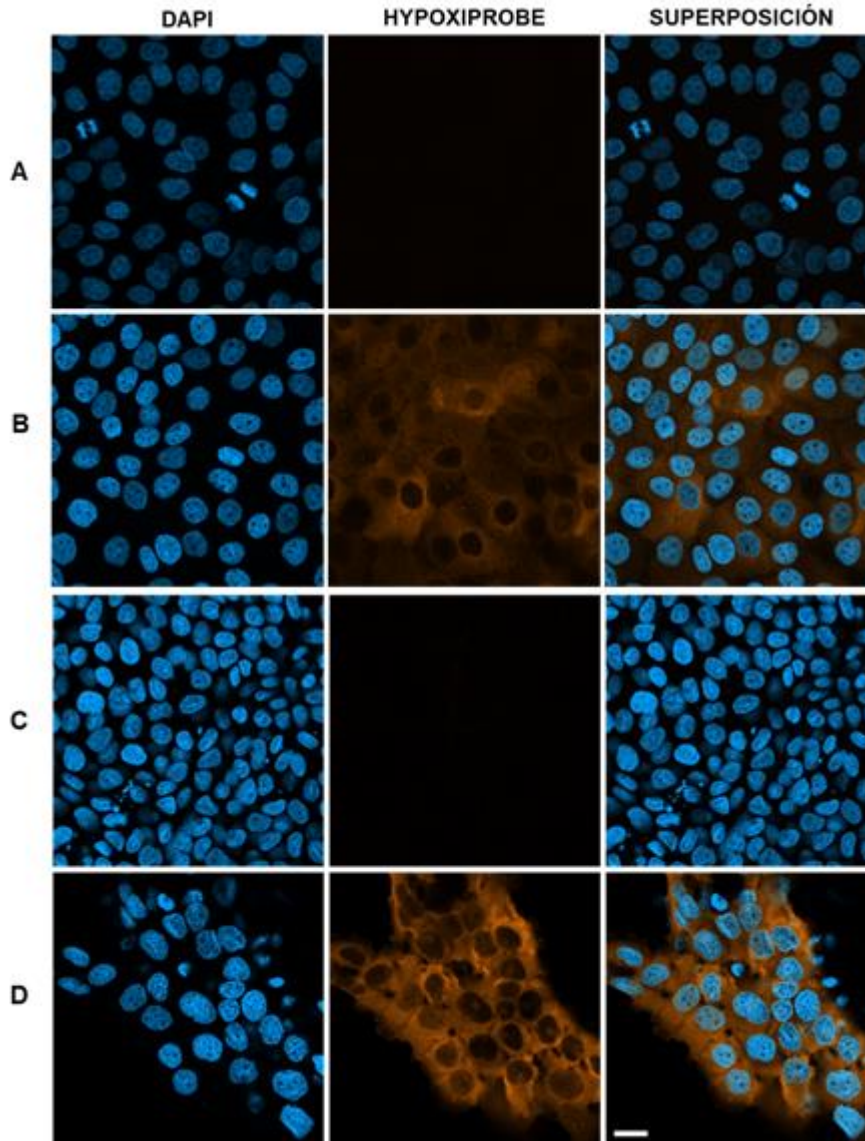


Fig.9. Inmunocitoquímica de células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales utilizando la sonda Hypoxiprobe, luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos, observadas por microscopía confocal. A. HaCaT parentales en el centro de la placa. B. HaCaT parentales en una zona periférica de la placa. C. HaCaT E5/E6/E7-18 en el centro de la placa. D. HaCaT E5/E6/E7-18 en una zona periférica de la placa. Barra de calibración A-D: 20 μ m.

Además, luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos, se midió, mediante el radiómetro ABL800Flex, la presión parcial de O_2 a partir de los sobrenadantes de las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT

parentales. A su vez, se tomaron las mismas medidas para ambas líneas celulares en condiciones de normoxia (sin cubreobjetos). Los resultados obtenidos indican una disminución del O₂ luego del tratamiento con cubreobjetos, en comparación con las condiciones de normoxia, para ambas líneas celulares (Fig.10).

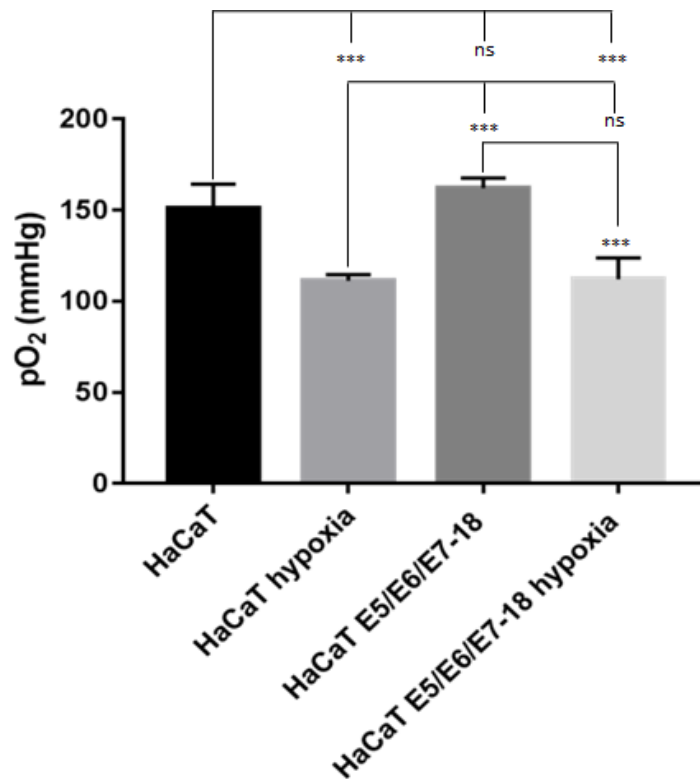


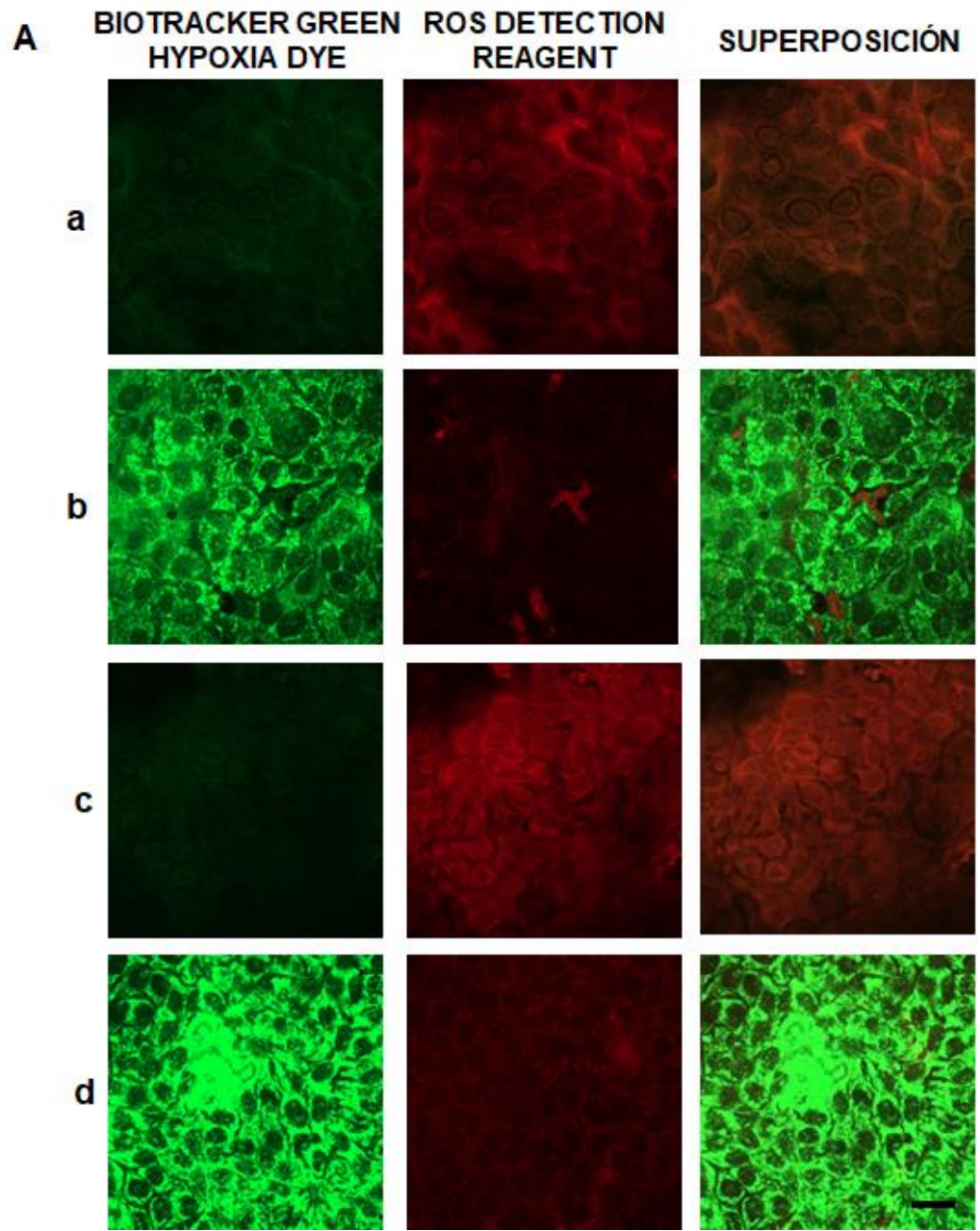
Fig.10. Cuantificación de los niveles de O₂ en células HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18, en condiciones de normoxia e hipoxia inducida por cubreobjetos (p-valor < 0.0001). (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, (****) $P < 0.0001$.

De acuerdo al análisis estadístico realizado para estas medidas, se obtuvo diferencias significativas entre las células HaCaT parentales en hipoxia con respecto a la misma línea en normoxia, con un p-valor de 0,0002 (***), así como entre las células HaCaT E5/E6/E7-18 en hipoxia con respecto a normoxia, con un p-valor de 0,0003 (***). Comparando ambas líneas celulares entre sí, no se obtuvo diferencias

significativas ni en normoxia ni en hipoxia. Complementariamente, se obtuvo una diferencia significativa entre las células HaCaT E5/E6/E7-18 en hipoxia con respecto a las HaCaT parentales en normoxia, con un p-valor de 0,0005 (***) , y entre las células HaCaT E5/E6/E7-18 en normoxia con respecto a las HaCaT parentales en hipoxia, con un p-valor de 0,0001 (***) (Fig.10).

5.3. Detección simultánea de hipoxia y estrés oxidativo

Las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales, bajo tratamiento con cubreobjetos, fueron incubadas simultáneamente con las sondas BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye y ROS Detection Reagent Deep Red, para la detección simultánea de hipoxia y especies reactivas del oxígeno (ROS), respectivamente. La señal de la sonda para detección de las ROS fue significativamente más alta cerca del centro de la placa de cultivo, donde los niveles de hipoxia intracelular son más leves que en las zonas periféricas de la placa, alejadas de la única fuente de oxígeno, donde los niveles de hipoxia intracelular son más elevados (Fig.11A).



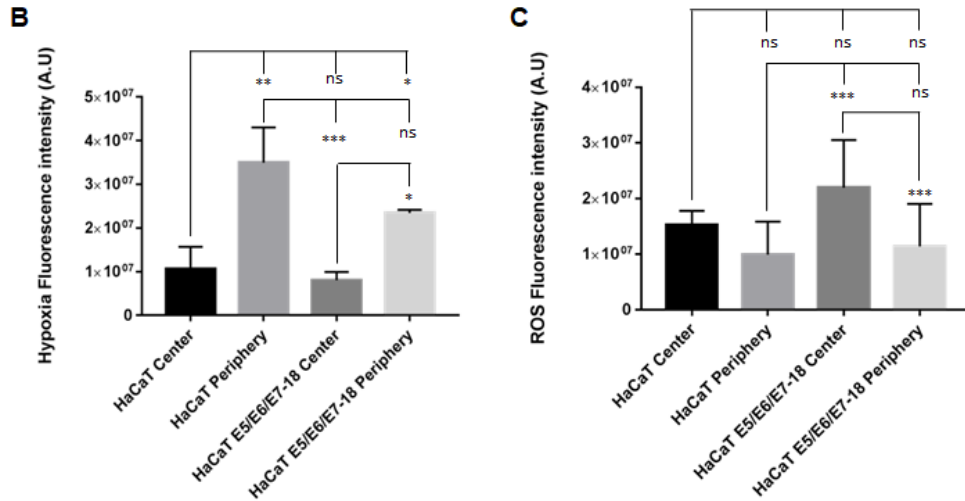


Fig.11. Detección simultánea de los niveles de hipoxia intracelular y ROS. A. Observación por microscopía confocal de las señales de BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye y ROS Detection Reagent Deep Red en células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos, tanto en la zona central como en zonas periféricas de la placa de cultivo: **a.** HaCaT parentales en la región central. **b.** HaCaT parentales en una región periférica. **c.** HaCaT E5/E6/E7-18 en la región central. **d.** HaCaT E5/E6/E7-18 en una región periférica. **B.** Cuantificación de las señales de hipoxia a través de la sonda BioTracker Green Hypoxia Dye en las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales (p-valor = 0,0007). **C.** Cuantificación de las señales de ROS a través de la sonda ROS Detection Reagent Deep Red en las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales (p-valor = 0,0010). (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, (****) $P < 0.0001$. Barra de calibración (a-d): 20 μm .

Al cuantificar los niveles de hipoxia obtenidos a partir de la sonda BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye, se evidenciaron diferencias significativas entre las células HaCaT parentales en la periferia de la placa con respecto a la misma línea en el centro, con un p-valor de 0,0018 (**), así como entre las células HaCaT E5/E6/E7-18 en la periferia con respecto al centro, con un p-valor de 0,0122 (*). Comparando ambas líneas celulares, no se obtuvo diferencia significativa de hipoxia entre ellas ni en el centro de la placa, ni en las

zonas periféricas de la misma. Complementariamente, se obtuvo diferencias significativas entre la línea HaCaT parental en las zonas periféricas de la placa con respecto a las HaCaT E5/E6/E7-18 en el centro de la misma, con un p-valor de 0,0010 (***) , así como entre las HaCaT parentales en la región central y HaCaT E5/E6/E7-18 en la periferia de la placa, con un p-valor de 0,0299 (*) (Fig.11B).

En cuanto a la cuantificación de los niveles de ROS intracelular, se observó una diferencia significativa entre las células HaCaT E5/E6/E7-18 en la periferia con respecto a la zona central, con un p-valor de 0,0086 (***) . Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las células HaCaT parentales en la zona central, con respecto a las mismas células en la periferia. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas al comparar ambas líneas celulares en las condiciones de normoxia e hipoxia. Sí se obtuvo una diferencia significativa entre las células HaCaT E5/E6/E7-18 en la región central con respecto a las HaCaT parentales en la zona periférica, con un p-valor de 0,0007 (***) (Fig.11C).

Luego, para detectar el radical libre superóxido en las mitocondrias, se utilizó el indicador de superóxido mitocondrial, MitoSox. De dicho estudio se obtuvo mayor señal de superóxido mitocondrial en las células cercanas a la única fuente de oxígeno, ubicada en la región central de la placa de cultivo, que en las células alejadas de la misma, tanto para las células HaCaT E5/E6/E7-18 como HaCaT parentales (Fig.12A). De acuerdo al análisis estadístico realizado tras la cuantificación de los niveles de superóxido mitocondrial, se obtuvo una diferencia significativa únicamente para la línea HaCaT parentales en las zonas periféricas de la placa, con respecto a las HaCaT parentales ubicadas en el centro de la misma, con un p-valor = 0,0489 (*). No se observaron diferencias significativas en las células HaCaT E5/E6/E7-18 tanto en el centro como en la periferia de la placa (Fig.12B).

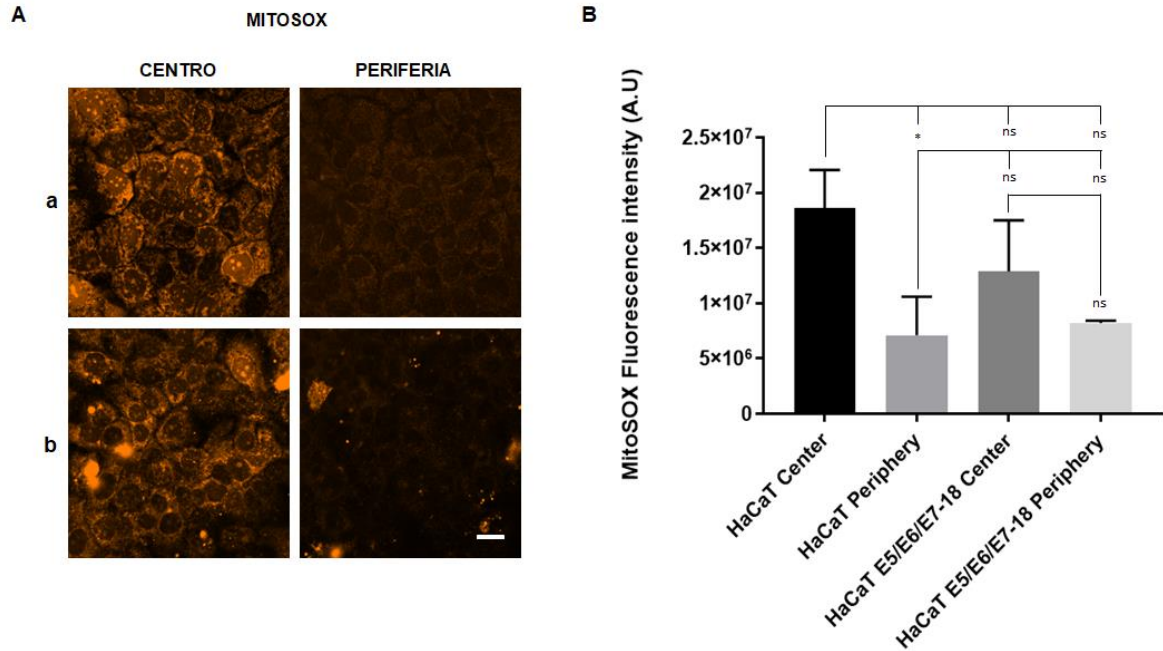


Fig.12. Inmunocitoquímica en células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales utilizando la sonda MitoSox, luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos. **A.** Observación por microscopía confocal de ambas líneas celulares: **a.** HaCaT parentales en la zona central y en una zona periférica de la placa; **b.** HaCaT E5/E6/E7-18 en la zona central y en una zona periférica de la placa. **B.** Cuantificación de los niveles de MitoSox en ambas líneas celulares, tanto en la zona central como en zonas periféricas de las placas de cultivo (p-valor = 0,0505). (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, (****) $P < 0.0001$. Barra de escala: 20 μ m.

5.4. Detección simultánea de hipoxia y potencial de membrana mitocondrial

Luego, se estudió el estado de las mitocondrias a través del potencial de sus membranas mitocondriales, con la sonda fluorescente Mitotracker Deep Red, que muestra la acumulación de la misma en las mitocondrias, dependiente del potencial de membrana mitocondrial (Greene, A. W. et al., 2012; Townley, A. R. y Wheatley, S. P, 2020), lo que se ha visto previamente por la disminución de la intensidad de la señal luego de los tratamientos que reducen el potencial de la

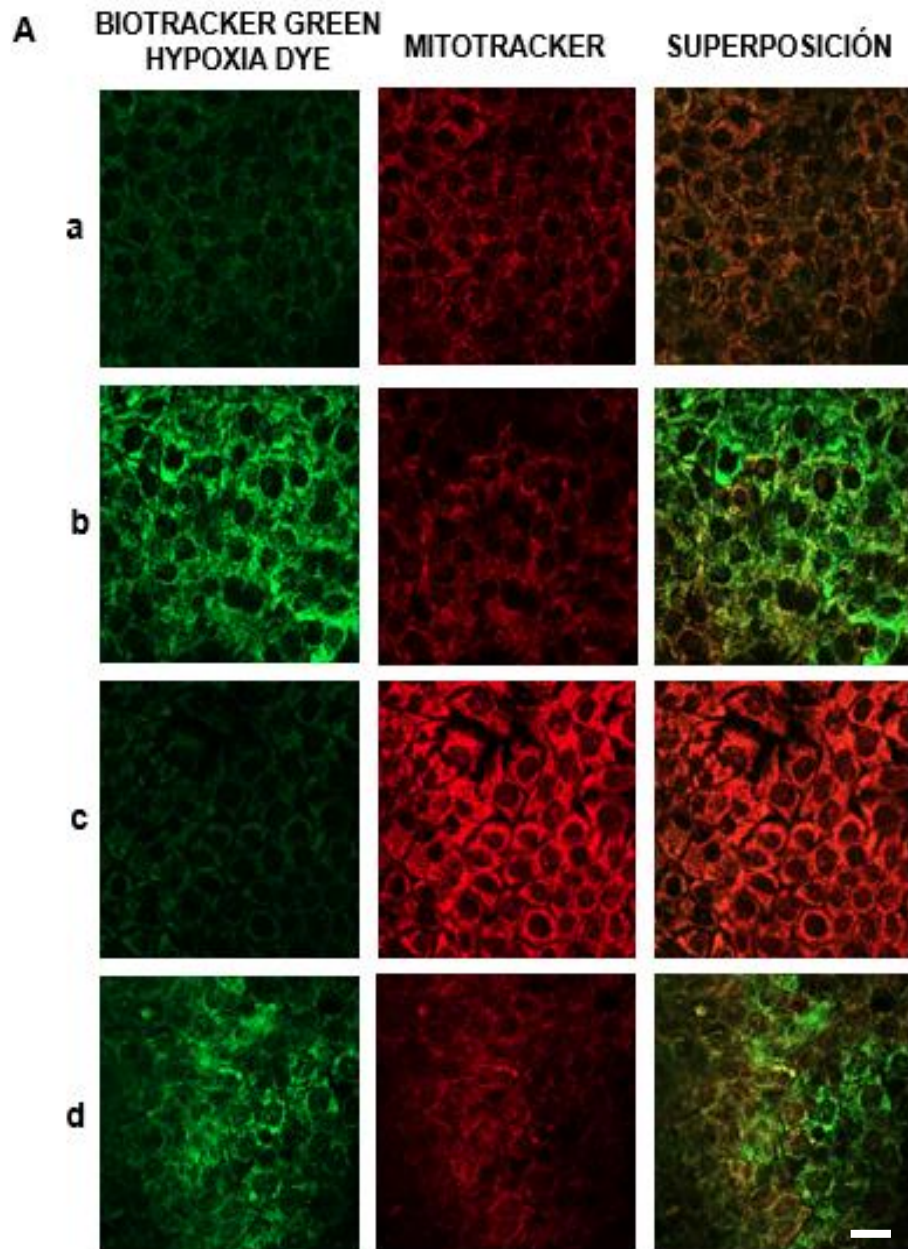
membrana mitocondrial (Greene, A. W. et al., 2012). Dado que Mitotracker Deep Red tiene una excitación/emisión máxima de 644/665nm, fue utilizada simultáneamente con el kit de detección de hipoxia para células vivas, Biotracker Green Hypoxia Dye. Luego de 24 horas de tratamiento con el cubreobjetos, se observó que las células presentaban una significativa disminución en la intensidad de fluorescencia de Mitotracker Deep Red en las zonas periféricas de la placa, donde la señal de hipoxia es mayor comparada con la región central de la misma, donde la señal de hipoxia es menor (Fig.13A).

De acuerdo al análisis estadístico realizado al cuantificar la intensidad de la señal de la sonda Mitotracker Deep Red, se obtuvo diferencias significativas entre las células HaCaT parentales en la periferia de la placa con respecto a la misma línea en la zona central, con un p-valor de 0,0153 (*), así como entre las células HaCaT E5/E6/E7-18 en la periferia de la placa con respecto a la misma línea en la zona central, con un p-valor de 0.0341 (*). Comparando ambas líneas celulares entre sí, no se obtuvo diferencias significativas ni en normoxia ni en hipoxia. Por otro lado, para las HaCaT E5/E6/E7-18 en la región central se obtuvo una diferencia significativa con un p-valor de 0,0092 (**), con respecto a las células HaCaT parentales en la periferia de la placa. (Fig.13B).

Además, se realizó un tratamiento a las células durante 30 minutos con el inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones, Rotenona (1 μ M), que también provocó una disminución en la intensidad de fluorescencia, confirmando que la intensidad de fluorescencia de la sonda Mitotracker Deep Red es sensible al potencial de membrana mitocondrial (Fig.13C).

Por lo tanto, estos resultados indican que, en las zonas periféricas de la placa de cultivo, donde las células se encuentran más alejadas de la fuente de oxígeno y en condiciones altas de hipoxia, el potencial de

membrana mitocondrial es significativamente reducido comparado con las células que se encuentran en la región central.



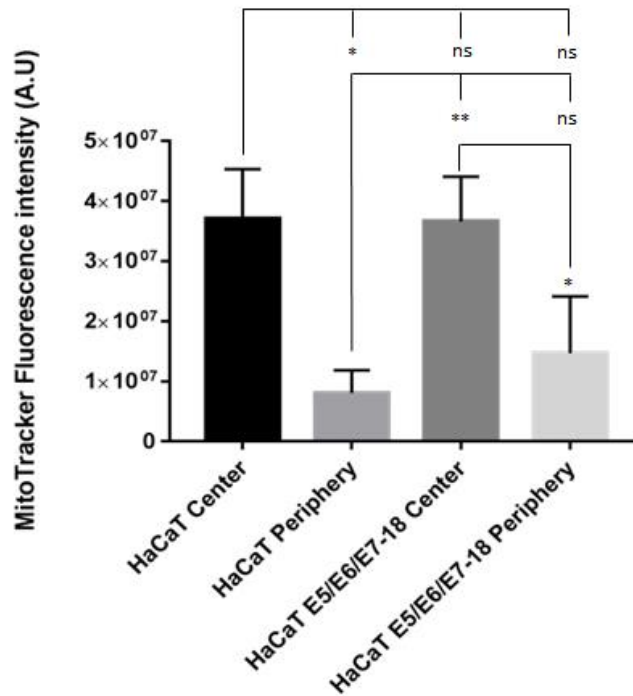
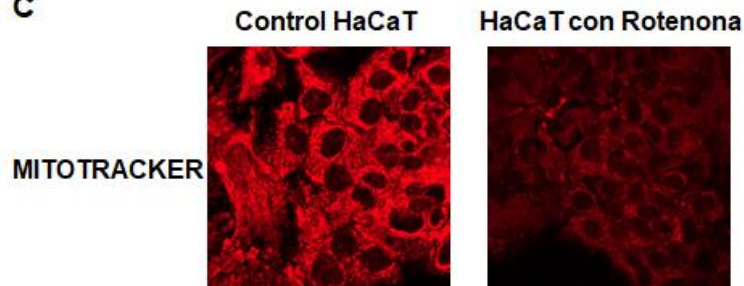
B**C**

Fig.13. Detección simultánea de los niveles de hipoxia intracelular y potencial mitocondrial. **A.** Observación por microscopía confocal de las señales de BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye y MitoTracker Deep Red FM en células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos: **a.** HaCaT parentales en la región central. **b.** HaCaT parentales en una región periférica. **c.** HaCaT E5/E6/E7-18 en la región central. **d.** HaCaT E5/E6/E7-18 en una región periférica. **B.** Cuantificación del potencial mitocondrial en las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales, tanto en la zona central como en zonas periféricas de la placa de cultivo (p-valor = 0,0049). **C.** Observación por microscopía confocal de las señales de Mitotracker en células HaCaT parentales sin cubreobjetos y luego de 1 hora de tratamiento con Rotenona (1 μ M). (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, (****) $P < 0.0001$. Barra de calibración (A: a-d): 20 μ m.

5.5. Estudio de parámetros metabólicos

Para caracterizar las diferencias metabólicas entre las células HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18 se tomaron medidas de parámetros metabólicos como los niveles de lactato y CO_2 , así como los valores de pH, mediante el radiómetro ABL800Flex. De esta forma, se obtuvieron niveles levemente incrementados de lactato en los sobrenadantes de las células HaCaT E5/E6/E7-18 en comparación con las HaCaT parentales, ambas en normoxia y luego de 24 horas de tratamiento con cobreobjetos (Fig. 14A). Independientemente de dicha diferencia metabólica entre las líneas celulares HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales, ambas muestran un aumento significativo en los niveles tanto de lactato como de CO_2 , en los sobrenadantes de las células luego de 24 horas de tratamiento con cobreobjetos (Fig. 14B). Mientras tanto, el pH de los sobrenadantes de las células disminuyó significativamente luego del tratamiento con cobreobjetos para ambas líneas celulares (Fig. 14C). A su vez, se pudo visualizar macroscópicamente un cambio de color en el medio de cultivo, específicamente del indicador de pH Rojo Fenol presente en el medio, luego de 24 horas de tratamiento con cobreobjetos, con respecto a un cultivo tratado en normoxia (Fig.14D). Este cambio de color ocurre debido a la disminución de pH y, por lo tanto, al aumento de la acidificación del medio. Estos resultados confirman las observaciones previas de nuestro grupo de trabajo sobre la acidificación extracelular luego del tratamiento con cobreobjetos (Arocena M. et al, 2019), y sugieren que tanto el aumento de lactato como el de CO_2 contribuyen a la disminución del pH.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, se observaron diferencias significativas entre las condiciones de normoxia e hipoxia, tanto para las células HaCaT parentales como para HaCaT E5/E6/E7-18, en todos los parámetros metabólicos estudiados. Particularmente, para

la producción de lactato, se obtuvo una diferencia significativa para las células HaCaT parentales en hipoxia con respecto a la misma línea en normoxia, con un p-valor < 0.0001 (****). También se evidenció una diferencia significativa para las HaCaT E5/E6/E7-18 en hipoxia con respecto a las células HaCaT E5/E6/E7-18 en normoxia, con un p-valor de 0,0003 (***). Además, se obtuvo una diferencia significativa entre ambas líneas celulares en normoxia, con un p-valor < 0.0001 (****). Sin embargo, no hubo diferencia estadística entre ambas líneas celulares en la condición de hipoxia. Por otro lado, se obtuvo también una diferencia significativa para las células HaCaT E5/E6/E7-18 en normoxia, con respecto a las HaCaT parentales en hipoxia, con un p-valor de 0,0011 (**), así como una diferencia significativa para las células HaCaT E5/E6/E7-18 en hipoxia, con respecto a las HaCaT parentales en normoxia, con un p-valor < 0.0001 (****) (Fig. 14A).

En cuanto a la producción de CO₂, se obtuvo una diferencia significativa para la línea HaCaT parental en hipoxia, con respecto a la misma línea en normoxia, con un p-valor de 0,0004 (***). También se evidenció una diferencia significativa para la línea HaCaT E5/E6/E7-18 en hipoxia con respecto a la misma línea en normoxia, con un p-valor < 0.0001 (****). Comparando ambas líneas celulares en las condiciones de hipoxia y normoxia, no se obtuvo diferencias significativas entre ellas. Complementariamente, se obtuvo diferencias significativas para la línea HaCaT E5/E6/E7-18 en hipoxia con respecto a HaCaT parentales en normoxia, con un p-valor de 0,0010 (***), así como para HaCaT E5/E6/E7-18 en normoxia con respecto a la línea HaCaT parentales en hipoxia, con un p-valor < 0.0001 (****). (Fig. 14B).

Referente a las medidas de pH extracelular, se obtuvo diferencias significativas para ambas líneas celulares en hipoxia con respecto a la condición en normoxia, con un p-valor < 0.0001 (****) para ambos casos. No hubo significancia estadística entre ambas líneas en

condiciones de normoxia ni en hipoxia. Por otro lado, se obtuvo una diferencia significativa para la línea HaCaT E5/E6/E7-18 en normoxia, con respecto a la línea HaCaT parental en hipoxia, así como para la línea HaCaT E5/E6/E7-18 en hipoxia con respecto a las células HaCaT parentales en normoxia, con un p -valor < 0.0001 (****) para ambos casos (Fig.14C).

Utilizando un enfoque basado en la aproximación de Kassirer-Bleich para el bicarbonato derivado del CO_2 , y en el enfoque iniciado por Stewart para evaluar la importancia del CO_2 en el pH de los fluidos corporales, en particular la consideración de la neutralidad eléctrica en un medio que contiene abundantes iones inorgánicos, el Dr. Miguel Arocena ha derivado una expresión simple para $[\text{H}^+]$ en función de $[\text{lactato}]$ y $p\text{CO}_2$. Se obtuvo una muy buena coincidencia entre los valores de pH experimentales y los valores predichos por esta expresión y, en particular, utilizando los valores experimentales de $[\text{lactato}]$ y $p\text{CO}_2$, se puede demostrar que, en el entorno experimental de este trabajo, la acumulación de CO_2 es la principal contribuyente a la disminución del pH luego de inducir un microambiente hipóxico mediante el uso de cubreobjetos (apéndice en D'Aiuto N. et al, 2022).

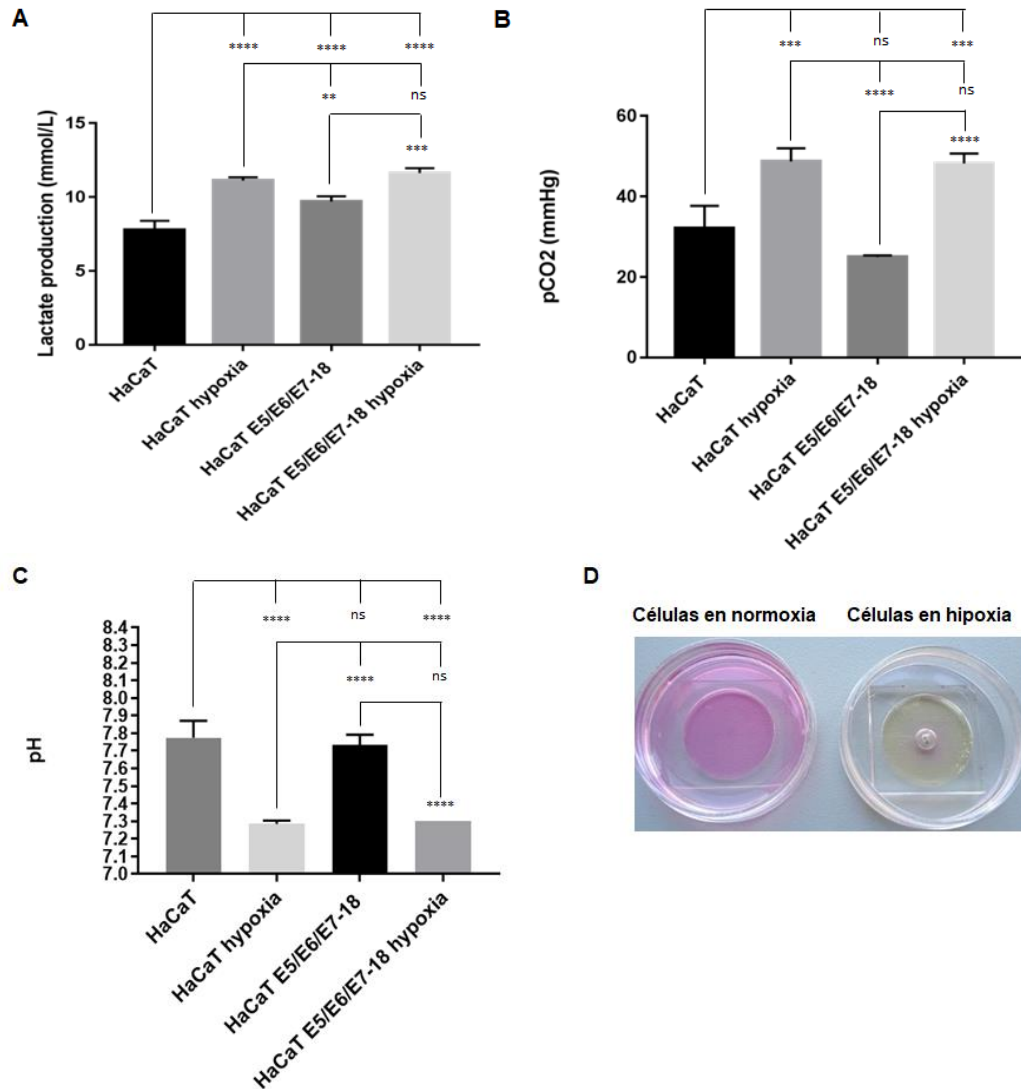


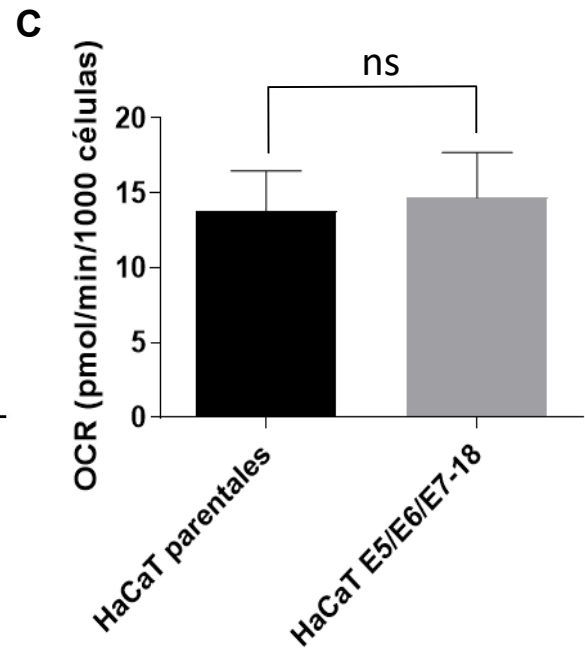
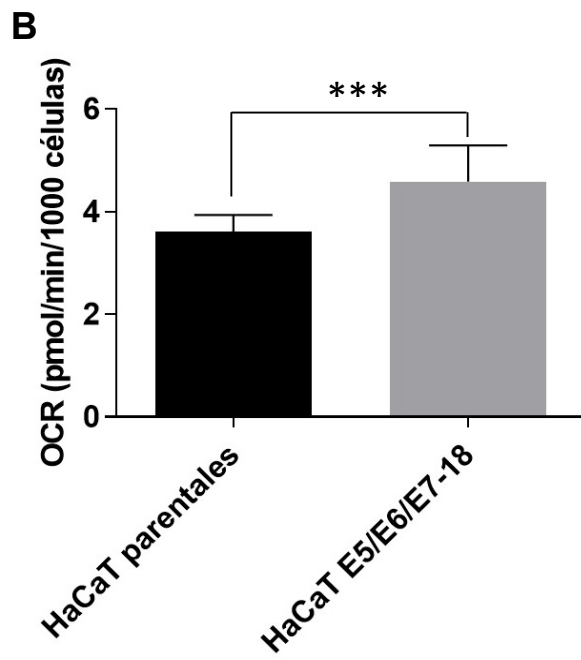
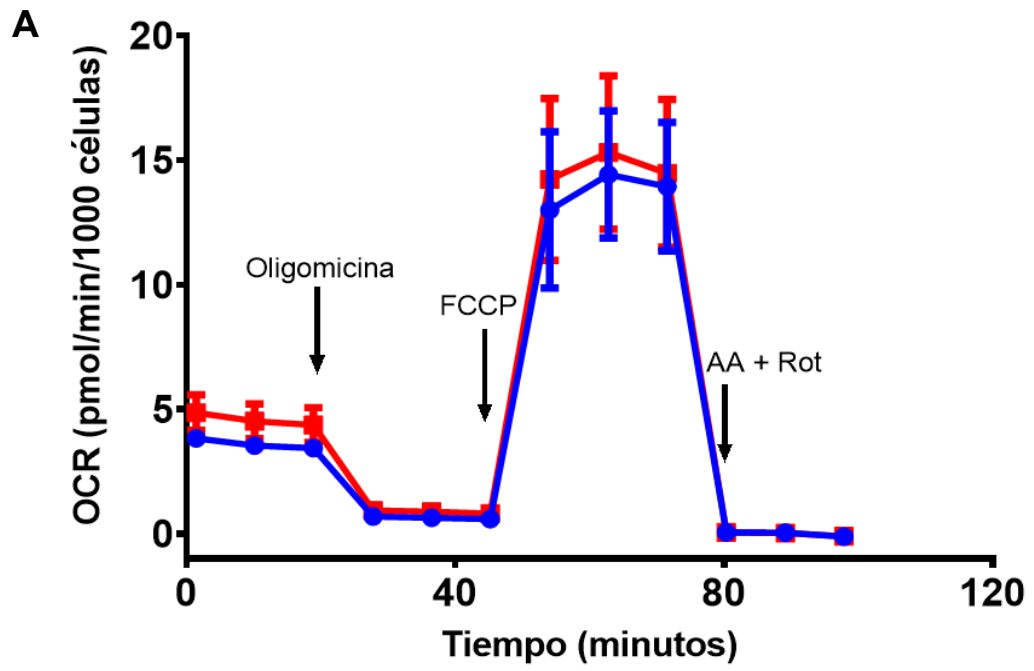
Fig.14. Medidas de parámetros metabólicos en células HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18 en condiciones de normoxia y de hipoxia. A. Niveles de la producción de lactato (p-valor < 0.0001). **B.** Niveles de la presión parcial de CO₂ (p-valor < 0.0001). **C.** Medidas del pH extracelular (p-valor < 0.0001). **D.** Observación macroscópica del cambio de color del Rojo Fenol presente en el medio de cultivo luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos (hipoxia), en comparación con una placa de cultivo sin cubreobjetos (normoxia). (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, (****) $P < 0.0001$.

Luego se evaluaron las velocidades del consumo de oxígeno (OCR) y de la acidificación extracelular (ECAR), a través del equipo Seahorse

XF24 Extracellular Flux Analyzer, para ambas líneas celulares, en condiciones de normoxia. Dichas medidas se tomaron antes y después del agregado de diferentes drogas que actúan como inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa: Oligomicina, FCCP, Antimicina A (AA) y Rotenona (Rot) (ver sección 4.8 de materiales y métodos).

Las células HaCaT E5/E6/E7-18, en condiciones basales, es decir, antes del agregado de las drogas mencionadas, mostraron un aumento tanto de OCR (Fig. 15 A) como de ECAR (Fig. 15 D), comparado con las células HaCaT parentales, confirmando así un incremento del metabolismo oxidativo, incluyendo la glucólisis aeróbica, por parte de las células HaCaT E5/E6/E7-18.

Al cuantificar y analizar los datos obtenidos, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares en condiciones basales, tanto para OCR (Fig. 15B) como para ECAR (Fig. 15D), con un p-valor de 0,0009 (***) y <0.0001 (****), respectivamente. Esto indica que hay un aumento del consumo de oxígeno y de la acidificación extracelular por parte de las células HaCaT E5/E6/E7-18 con respecto a las HaCaT parentales, ambas en condiciones de normoxia. Por otro lado, no se obtuvo diferencia entre ambas líneas ante el agregado de la droga FCCP, indicando que las células HaCaT E5/E6/E7-18 presentan un consumo máximo de oxígeno similar al de las células HaCaT parentales.



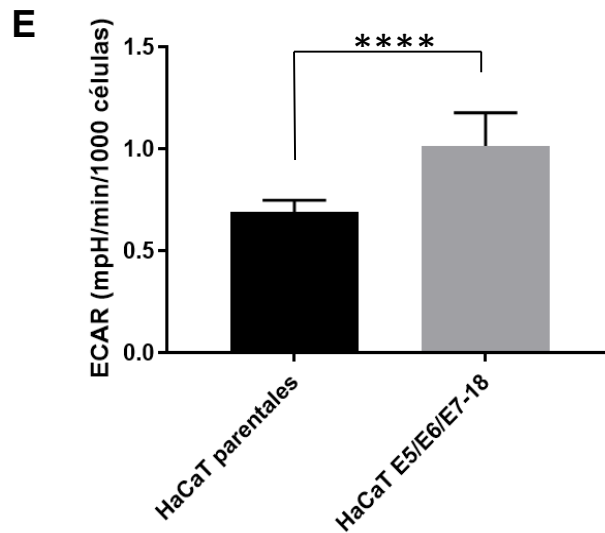
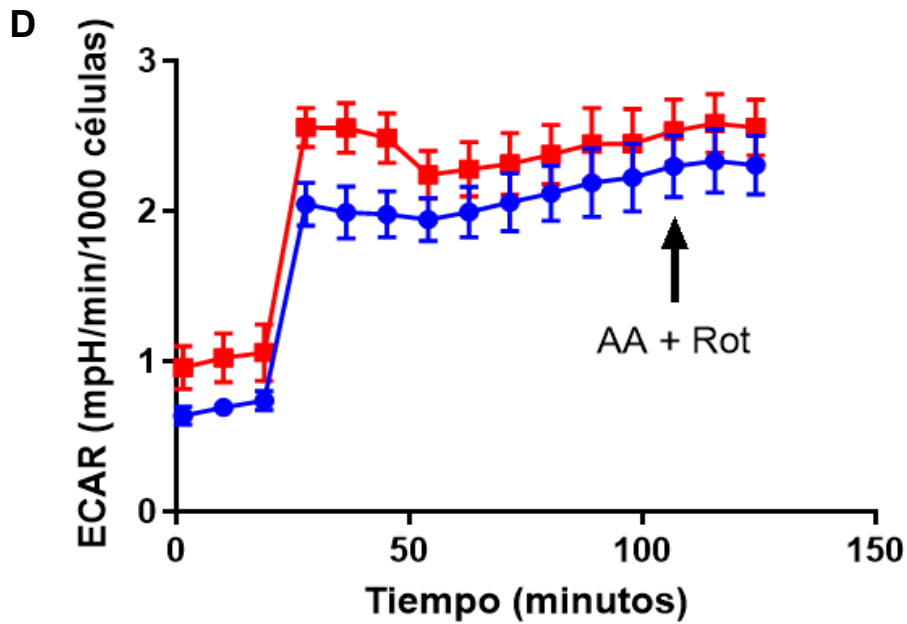


Fig.15. Medidas de las velocidades de consumo de oxígeno (OCR) y acidificación extracelular (ECAR) en células HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7-18 en condiciones de normoxia, antes y después del agregado de las drogas Oligomicina, FCCP, Antimicina A (AA) y Rotenona (Rot), a través del analizador metabólico Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer. A. Gráfico representativo de OCR en función del tiempo. **B.** Cuantificación de los niveles basales de OCR, previo al agregado de Oligomicina (p-valor < 0.0001). **C.** Cuantificación de los niveles máximos de OCR ante el agregado de FCCP. **D.** Gráfico representativo de ECAR en función del tiempo. **E.** Cuantificación de los niveles basales de ECAR, previo al agregado de Oligomicina (p-valor < 0.0001). (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, (****) $P < 0.0001$.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo, se ha estudiado la hipoxia, acidificación y estrés oxidativo generados *in vitro* a través de una variante del método hipoxia inducida por cubreobjetos. Éste, permite cultivar células en un microambiente hipóxico generado por un cubreobjetos que cubre la placa de cultivo. La variante de este método, desarrollada recientemente por el Dr. Arocena y colaboradores, permite, además, cultivar células a diferentes distancias de una fuente de oxígeno (Arocena M. et al, 2019). Esto se debe a que el cubreobjetos con el que se cubre la placa de cultivo presenta una pequeña perforación en el centro del mismo, actuando como la única fuente de oxígeno para las células (Fig. 6). De esta forma, las células que se encuentran en el centro de la placa, estarán cerca de la entrada de oxígeno, mientras que las que se encuentren en las zonas periféricas, estarán alejadas de la misma. Esta modificación del método de hipoxia inducida por cubreobjetos, permite estudiar tanto el proceso de acidificación como la interacción entre la hipoxia intracelular y el estrés oxidativo, a medida que aumenta la distancia de las células de la fuente de oxígeno.

En particular, en este trabajo, se han estudiado células que constituyen un modelo celular de un estadio intermedio de transformación maligna. Esta línea celular ha sido desarrollada recientemente por la Dra. Hochmann (Hochmann J. et al, 2020) a partir de la transducción con los oncogenes E5, E6 y E7 del virus del papiloma humano 18 (HPV-18) en queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente (HaCaT) (Fig. 5). La línea celular HaCaT, conteniendo los oncogenes del HPV-18 (HaCaT E5/E6/E7-18), tiene mayor capacidad de invasión y un metabolismo más glucolítico que las células HaCaT no transducidas (Hochmann J. et al, 2020). Esto se pudo comprobar en esta tesis al estudiar las velocidades del consumo de oxígeno (OCR) y de acidificación extracelular (ECAR) de dichas células, obteniéndose mayor OCR y ECAR, en comparación con las células control (Fig. 15), confirmando que las células HaCaT E5/E6/E7-18 adquieren un

metabolismo más oxidativo, incluyendo el aumento de la glucólisis con fermentación láctica, que las HaCaT parentales. Sin embargo, aún están lejos de desarrollar los fenotipos altamente glucolíticos e invasivos de las líneas celulares derivadas de cánceres en etapas avanzadas (Hochmann J. et al, 2020). De esta forma, esta línea celular, representa un buen modelo para el estudio del proceso temprano de carcinogénesis.

Utilizando este modelo celular, se han podido evaluar las contribuciones de lactato y CO₂ a la acidificación extracelular, así como el estrés oxidativo y el estado hipóxico de las células, simultáneamente, tanto cerca de la fuente de oxígeno, como a grandes distancias de ella, representando así el microambiente temprano de un tejido tumoral.

Al evaluar la disponibilidad de O₂, luego de 24 horas de tratamiento con cubreobjetos, se han obtenido resultados que indican una disminución del mismo en los sobrenadantes de las células, tanto HaCaT E5/E6/E7-18, como HaCaT parentales (Fig. 10). Por lo tanto, esto indica que hay una disminución del nivel de O₂ extracelular, lo que implica que las células lo están consumiendo mediante el proceso de respiración. Al mismo tiempo, se han detectado células altamente hipóxicas en la periferia de la placa, más alejadas de la fuente de oxígeno, tanto mediante la tinción con pimonidazol (Fig. 9) como mediante el uso del marcador de hipoxia de células vivas BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye (Fig. 11). La detección de hipoxia por la formación de aductos de pimonidazol es sensible sólo a niveles intracelulares muy bajos de O₂ (Raleigh J. et al., 2020), y no se ha observado tinción con pimonidazol en las células de la región central de la placa, cerca de la fuente de oxígeno (Fig. 9). Sin embargo, sí se ha detectado una señal de hipoxia moderada en las células de esta región con la sonda de hipoxia BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye (Fig. 11), de acuerdo con las propiedades informadas por los fabricantes de Biotracker de detectar condiciones hipóxicas más leves que el pimonidazol. Por lo tanto, en conjunto, estos resultados indican que el O₂ disminuye después del tratamiento con cubreobjetos debido a la respiración celular y que, como

consecuencia, las células más alejadas de la fuente de oxígeno se vuelven altamente hipóxicas, mientras que las células cercanas a la fuente de oxígeno se vuelven solo moderadamente hipóxicas.

Además de inducir hipoxia, el tratamiento con cubreobjetos provoca una acumulación tanto de lactato (Fig. 14A) como de CO_2 (Fig. 14B), así como una disminución significativa del pH del medio extracelular (Fig. 14C). Como se ha podido demostrar, en el entorno experimental de este trabajo, la acumulación de CO_2 es la principal contribuyente a la disminución del pH luego de inducir un microambiente hipóxico mediante el uso de cubreobjetos (ver apéndice en D'Aiuto N. et al, 2022). Estos resultados concuerdan con estudios previos, que muestran que la acidificación tumoral también está relacionada con la producción de CO_2 por parte de las células tumorales, y que la acidificación puede ocurrir incluso en células con alteración de la glucólisis o células deficientes en la enzima lactato deshidrogenasa, que tienen una producción de lactato marcadamente disminuida (Helmlinger, G. et al, 2002; Yamagata, M. et al, 1998). En el modelo utilizado en este trabajo, el CO_2 se acumula debido a que el cubreobjetos impide el intercambio de gases con el medio ambiente. En el microambiente de los tumores no vascularizados, o pobremente vascularizados, se esperaría que el CO_2 se acumulara, ya sea por respiración celular hasta que el oxígeno se consuma por completo, o por otras vías metabólicas, como la vía de las pentosas (Kato, Y. et al., 2013; Helmlinger, G. et al, 2002), que conducen a la acidificación. Por lo tanto, este método modificado de hipoxia inducida por cubreobjetos constituye un modelo simple y útil para analizar las diferentes contribuciones del metabolismo celular a la acidificación, en contextos como el microambiente tumoral. Además, a través del analizador metabólico Seahorse, se observó que, en condiciones alteradas, provocadas por el agregado de drogas que inhiben la cadena respiratoria (Antimicina A y Rotenona), las células HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT parentales presentan una velocidad de acidificación extracelular similar (Fig. 15 D). Esto podría explicar el hecho de que, en condiciones de hipoxia, donde se ha visto que

el potencial mitocondrial se encuentra disminuido (Fig. 13), no haya una diferencia significativa de los niveles de lactato y CO₂ entre ambas líneas celulares. Teniendo en cuenta estos resultados en conjunto, y la capacidad máxima de consumo de oxígeno similar entre ambas líneas celulares (Fig. 15 C), se pudo comprobar que, en condiciones alteradas, ya sean provocadas por una inducción de hipoxia o por el agregado de drogas, las células HaCaT E5/E6/E7-18 y las HaCaT parentales presentan una capacidad metabólica máxima similar.

Al estudiar simultáneamente la hipoxia y el estrés oxidativo, combinando la sonda de detección de hipoxia BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye con la sonda de detección de ROS Deep Red, se observaron, microscópicamente, mayores niveles de especies reactivas del oxígeno en células moderadamente hipóxicas, cerca del centro de la placa, mientras que los niveles de estrés oxidativo en células altamente hipóxicas en la periferia de la placa se redujeron, para ambas líneas celulares (Fig.11 A). Sin embargo, dicha diferencia fue estadísticamente significativa únicamente para las células pre-tumorales (Fig. 11 C). El mismo patrón se obtuvo al estudiar particularmente el radical libre superóxido en las mitocondrias, indicando mayor estrés oxidativo en las células que se encuentran en un estado de hipoxia moderado, en comparación con las células en alto estado de hipoxia (Fig.12 A), con diferencia estadísticamente significativa únicamente para las células HaCaT parentales. La falta de diferencia significativa entre las células pre-tumorales presentes en el centro y la periferia de las cámaras de cultivo se puede deber al alto desvío estándar obtenido para dichas células en el centro de la placa. Al mismo tiempo, se observó una disminución en la intensidad de la fluorescencia de la sonda MitoTracker Deep Red, que es sensible al potencial de la membrana mitocondrial, en las células de las zonas periféricas de la placa, donde la hipoxia intracelular es más alta, con respecto a las células en la zona central (Fig.13), para ambas líneas celulares, con diferencias estadísticamente significativas. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que, a altos niveles de hipoxia

intracelular, el potencial de membrana mitocondrial disminuye, conduciendo a niveles más bajos de estrés oxidativo, en comparación con las células que presentan una hipoxia intracelular moderada (en el centro de la placa), en las que se conserva el potencial de membrana mitocondrial. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores en los que se ha demostrado que una cadena de transporte de electrones funcional y, por lo tanto, un alto potencial de membrana mitocondrial, son necesarios para la producción de ROS en hipoxia (Martínez-Reyes, I. et al., 2016). Además, el pico de producción de ROS mitocondrial, que se ha demostrado en un estudio previo que ocurre en los primeros minutos de hipoxia, se ha relacionado con un cierto grado de disponibilidad de O₂ que permanece dentro de las células al comienzo de la hipoxia (Hernansanz-Agustín, P. et al., 2014). Por ende, podría esperarse que las células más cercanas a la fuente de oxígeno conserven un cierto nivel de O₂ intracelular, lo que se traduciría en la hipoxia moderada que se observó con la sonda BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye. Esto, a su vez, podría llevar a un pico de producción de ROS mitocondrial y al aumento de niveles de ROS que se observaron en las células con hipoxia moderada.

Los resultados obtenidos destacan la utilidad de este método de hipoxia inducida por cubreobjetos modificado para visualizar simultáneamente los niveles de hipoxia intracelular y estrés oxidativo, al estudiar la asociación entre la hipoxia y la producción de ROS intracelular. Además, es importante considerar las variabilidades del tipo de célula, ya que, por ejemplo, niveles extracelulares de O₂ similares pueden dar como resultado niveles de O₂ intracelular marcadamente diferentes según el tipo de célula. Por ejemplo, células con un metabolismo glucolítico alto y un metabolismo oxidativo más bajo, tienen una menor tasa de consumo de oxígeno y, por ende, tienen niveles intracelulares de O₂ mayores que los de líneas celulares con mayor metabolismo oxidativo, a los mismos niveles de O₂ extracelular (Potter, M., 2016). Por lo tanto, la visualización simultánea de los niveles de hipoxia intracelular y especies reactivas del oxígeno permitiría evaluar si las diferencias en los niveles de ROS intracelulares observadas entre distintos

tipos de células podrían estar relacionadas con diferentes niveles de hipoxia intracelular, también dependientes del tipo celular.

Durante el desarrollo de los tumores, las células tumorales están sujetas a niveles fluctuantes de O_2 , ya sea en estado avascular, o debido a una red vascular desorganizada después de que ha ocurrido la angiogénesis, dando lugar a condiciones de hipoxia intermitente, que hacen que las células tumorales sean más resistentes a los estímulos apoptóticos (Martinive, P. et al., 2006). Los resultados mencionados anteriormente (Fig.11) sugieren que la hipoxia intracelular moderada se asocia con un aumento de los niveles de ROS intracelular. Por este motivo, se esperaría que las células tumorales sometidas a condiciones hipóxicas intermitentes desarrollaran niveles de hipoxia intracelular más leves y, en consecuencia, niveles más altos de ROS intracelulares, favoreciendo la selección de clones tumorales más resistentes y agresivos (Gillies, R. J., 2012). Además, también se podría esperar que la hipoxia intermitente provoque una mayor acumulación de CO_2 , debido a los períodos de respiración celular seguidos de un intercambio de gases deteriorado, llevando a la acidificación extracelular, lo que constituye otra presión selectiva hacia las células tumorales más agresivas.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten hacer la hipótesis de que las células en etapas intermedias de transformación maligna, cuando se exponen al microambiente hipóxico y avascular del tumor temprano, causarán acidificación extracelular, principalmente a través de la acumulación de CO_2 , y desarrollarán niveles más altos de ROS en regiones más cercanas a los capilares del estroma subyacente, que constituyen la fuente de oxígeno. Por lo tanto, en este estudio se ha podido demostrar que el método modificado de hipoxia inducida por cubreobjetos constituye un modelo simple, pero que puede resultar útil para estudiar cómo un microambiente alterado puede afectar procesos como la progresión tumoral.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró avanzar en la caracterización de las respuestas adaptativas de las células pre-tumorales en estudio, en respuesta a un microambiente alterado *in vitro*, que representa el microambiente tumoral temprano *in vivo*. En particular, se estudió la respuesta frente a hipoxia inducida por cubreobjetos en una línea celular en un estado intermedio de carcinogénesis, y se pudo comprobar una diferencia en el nivel de hipoxia intracelular dependiente de la distancia a la fuente de oxígeno.

Se trata de un estudio pionero porque este método permitió estudiar el microambiente tumoral temprano mediante la co-localización de diferentes sondas en células vivas. De esta manera, se pudo obtener resultados precisos sobre el estrés oxidativo y los cambios en el potencial de las membranas mitocondriales, generados por el microambiente hipóxico al que se indujo a las células. En este sentido, se obtuvieron mayores niveles de especies reactivas del oxígeno en células moderadamente hipóxicas, y niveles más reducidos en células altamente hipóxicas. A su vez, hubo una disminución del potencial de la membrana mitocondrial en las células que se encontraban en las zonas donde la hipoxia intracelular es más alta.

Por otro lado, se estudiaron parámetros vinculados al metabolismo oxidativo y glucolítico en normoxia e hipoxia (producción de CO₂ y lactato, respectivamente, así como el pH del sobrenadante celular), y también se cuantificó precisamente las tasas de consumo de oxígeno (OCR) y de acidificación extracelular (ECAR) mediante el analizador metabólico Seahorse. Los primeros parámetros mostraron que las células, en condiciones de hipoxia, aumentan la producción de CO₂ y de lactato, lo cual contribuye al aumento de la acidificación extracelular, disminuyendo el valor de pH. En segunda instancia, observamos, en condiciones de normoxia, un aumento del consumo de oxígeno (OCR) y de la acidificación extracelular (ECAR) por parte de las células HaCaT E5/E6/E7-18 en comparación con las HaCaT parentales, confirmando que las células que representan el modelo

de estudio pre-tumoral, presentan un metabolismo oxidativo más elevado, así como un aumento de la glucólisis aeróbica, en relación a las células parentales.

En conjunto, se ha comprobado que las células pre-tumorales HaCaT E5/E6/E7-18, sometidas a un microambiente alterado *in vitro*, son capaces de desarrollar respuestas adaptativas frente a los distintos tipos de estrés oxidativo inducidos. De esta forma, se ha podido contribuir a la caracterización de la interacción entre los niveles reducidos de oxígeno, la acidificación, y el estrés oxidativo *in vitro*. Esto se ha realizado a través de un método simple, que puede aportar a la comprensión de los procesos por los cuales las células pre-tumorales avanzan en el desarrollo tumoral a medida que se adaptan y sobreviven al microambiente tumoral temprano *in vivo*.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Complementariamente a este trabajo, se está estudiando la relación entre estrés oxidativo, hipoxia y daño al ADN en las células HaCaT parentales y HaCaT E5/E6/E7 -18. En correlación con los resultados obtenidos en esta tesis acerca de la asociación entre el estrés oxidativo, y la hipoxia, también observamos un aumento del daño en el ADN en la condición de hipoxia, para ambas líneas celulares, mediante los ensayos de cometa e inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-gamma h2AX. Finalmente, cabe destacar que, a partir de la obtención de estos resultados, se está preparando un manuscrito denominado "Association between oxidative stress, hypoxia and genetic damage in human keratinocytes transduced with viral oncogenes, E5/E6/E7 of HPV-18", el cual será enviado a una revista arbitrada internacional.

CONTRIBUCIONES

Cabe destacar que los resultados obtenidos en esta tesis dieron lugar a la publicación del trabajo titulado “Hypoxia, acidification and oxidative stress in cells cultured at large distances from an oxygen source”, en la revista internacional Scientific Reports en diciembre de 2022, del cual soy primera autora (ver anexo).

Además, dichos resultados han sido presentados y expuestos en el III Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, así como en la XVII Reunión anual de la Sociedad Uruguaya de Investigación Odontológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, N. y Simon M. (2020). Tumor Microenvironment. *Curr Biol*, (16): R921–R925.
- Arocena, M. et al. (2019). Using a variant of coverslip hypoxia to visualize tumor cell alterations at increasing distances from an oxygen source. *Journal of Cell Physiology*, 234:16671–16678.
- Boedtkjer, E. y Pedersen S. (2019). The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Reviews*, 16:50.
- Bristow, R. et al. (2008). Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*, 8 (3): 180-92.
- D'Aiuto, N. et al. (2022). Hypoxia, acidification and oxidative stress in cells cultured at large distances from an oxygen source. *Scientific Reports*, 12:21699.
- Defilippis, R. A. et al. (2003). Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells. *Journal of Virology*, 77 (2): 1551–1563.
- Dengler, V. L. et al. (2014). Transcriptional Regulation by Hypoxia Inducible Factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 49 (1): 1–15.
- DiMaio, D. et al. (2013). The E5 proteins. *Virology*, 445(1-2): 99-114.
- Doorbar, J. et al. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Elsevier*, 55-70.
- Gatenby, R. A. (2008). A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 56-61.
- Gerstung, M. e. (2020). The evolutionary history of 2,658 cancers. . *Nature*, 122-128.
- Gillies, R. J. et al. (2002). MRI of the tumor microenvironment. *Journal of Magnetic Resonance* , 430–450.
- Gillies, R. J. et al. (2012). Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat. Rev. Cancer*., 12: 487–493 .
- Gillies, R. J. y Gatenby, R. (2007). Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis*, 26:311–317.
- Gillies, R. J. y Gatenby, R. (2015). Metabolism and Its Sequelae in Cancer Evolution and Therapy. *The Cancer Journal*, Volume 21, Number 2.

- Globocan 2020, IARC. (20 de Mayo de 2023). Obtenido de <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
- Greene, A. W. et al. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep*, 13: 378–385.
- Hanahan, D. y Weinberg R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 57–70.
- Hanahan, D. y Weinberg R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 646-674.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *American Association for Cancer Research*, 31-46.
- Helmlinger, G. et al. (2002). Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor. . *Metabolism* , 1(8), 1284–1291.
- Hernansanz-Agustín, P. et al. (2014). Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. . *Free Radic. Biol. Med.*, 71, 146–156.
- Hochmann, J. et al. (2020). Human papillomavirus type 18 E5 oncoprotein cooperates with E6 and E7 in promoting cell viability and invasion and in modulating the cellular redox state. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 115: e190405.
- Ibrahim-Hashim, A. (2017). Defining cancer subpopulations by adaptive strategies rather than molecular properties provides novel insights into intratumoral evolution. *Cancer Research*, 2242-2254.
- Kato, Y. et al. (2013). Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.*, 13, 89.
- Martínez-Reyes, I. y Chandel N. (2021). Cancer metabolism: looking forward. *Nature Reviews*.
- Martinive, P. et al. (2006). Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: Implications for anticancer therapies. *Cancer Res*, 66: 11736–11744.
- Marur, S. et al. (2010). HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 11: 781–89.
- Mclaughlin-Drubin, M. E. et al. (2009). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*, 143: 195–208.
- NIH (20 de Mayo de 2023). *Instituto Nacional del Cáncer - NIH*. Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/carcinoma-de-celulas-escamosas>

- Nurmik, M. et al. (2020). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts. *International Journal of Cancer*, 895–905.
- Oyervides-Muñoz, M. A. et al. (2018). Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. . *Infection, Genetics and Evolution.*, 61: 134-144.
- Peng, Q. et al. (2017). Tumor-like microenvironment . *Expert Review of Clinical Immunology*, 13(6), 635–643.
- Potter, M. et al. (2016). Monitoring intracellular oxygen concentration: Implications for hypoxia studies and real-time oxygen monitoring. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 876: 257–263.
- Raleigh, J. A. et al. (2000). Comparison between the comet assay and pimonidazole binding for measuring tumour hypoxia. *British Journal of Cancer*, 83(11): 1525–1531.
- Serrano, B. et al. (2018). Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.*, 47: 14-26.
- Tafari, M. et al. (2016). The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev.*
- Toth, R. K. et al. (2017). Strange Bedfellows: Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 (Nrf2) and Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) in Tumor Hypoxia. *Antioxidants*, 6-27.
- Townley, A. R. y Wheatley, S. P. (2020). Mitochondrial survivin reduces oxidative phosphorylation in cancer cells by inhibiting mitophagy. *J. Cell Sci*, 133, 575.
- Vaupel, P. et al. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis*, 26: 225–239.
- Victoria, H. C. (2010). Differentiated invasive squamous cell carcinoma: a case presentation. *Archivo médico de Camaguey*, v4, n4.
- Yamagata, M. et al. (1998). Te contribution of lactic acid to acidification of tumours: Studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br. J. Cancer* , 77, 1726–1731 .

ANEXO



OPEN

Hypoxia, acidification and oxidative stress in cells cultured at large distances from an oxygen source

Natali D'Aiuto^{1,2,6}, Jimena Hochmann^{2,3,6}✉, Magdalena Millán², Andrés Di Paolo², Ronell Bologna-Molina⁴, José Sotelo Silveira^{2,5} & Miguel Arocena^{1,2}✉

Hypoxia is a condition frequently encountered by cells in tissues, whether as a normal feature of their microenvironment or subsequent to deregulated growth. Hypoxia can lead to acidification and increased oxidative stress, with profound consequences for cell physiology and tumorigenesis. Therefore, the interplay between hypoxia and oxidative stress is an important aspect for understanding the effects of hypoxic microenvironments on cells. We have used a previously developed variant of the method of coverslip-induced hypoxia to study the process of acidification in a hypoxic microenvironment and to simultaneously visualize intracellular levels of hypoxia and oxidative stress. We observed high accumulation of CO₂ in hypoxic conditions, which we show is the main contributor to acidification in our model. Also, increased levels of oxidative stress were observed in moderately hypoxic cells close to the oxygen source, where the mitochondrial membrane potential was preserved. Conversely, cells at large distances from the oxygen source showed higher levels of hypoxia, milder oxidative stress and reduced mitochondrial membrane potential. Our results contribute to characterize the interplay between reduced oxygen levels, acidification and oxidative stress in a simple in vitro setting, which can be used to model cell responses to an altered environment, such as the early tumor microenvironment.

Cells have evolved sophisticated mechanisms for sensing and adapting to low levels of O₂, which are frequently encountered in tissues, as well as during early tumor development^{1,2}. Cellular responses to hypoxia are centered on the action of hypoxia inducible factors (HIF), requiring stabilization of the HIF-1 subunit HIF-1 α , which, together with HIF-1 β , form a functional HIF-1 heterodimer that activates the transcription of multiple target genes³. Increased levels of HIF-1 α are associated with hypoxia in tissues and cells, and are commonly detected by immunostaining⁴. A more direct method for hypoxia assessment by immunostaining is the use of nitroimidazoles such as pimonidazole, which under low intracellular levels of O₂ forms adducts with cellular proteins, detectable by specific antibodies⁵. More recently, hypoxia specific fluorescent probes have become available, allowing for real time imaging of the hypoxic status of cells under different experimental conditions⁶.

The tumor microenvironment has been shown to have an acidic extracellular pH, which might constitute a selective pressure favoring the survival of more aggressive tumor cells, as well as a factor leading to decreased chemotherapy effectiveness⁷. Tumor acidification is thought to be related to lactate production by increased anaerobic glycolysis in hypoxic conditions, although CO₂ production is an alternative mechanism of acidification as well⁸. For instance, tumor cells with impaired glycolysis show an acidified microenvironment, linked to their CO₂ production⁹. Therefore, in vitro models of the tumor microenvironment that allow to determine the contributions of lactate and CO₂ production to extracellular acidification would contribute towards understanding the mechanisms of pH decrease during tumor growth.

¹Cátedra de Bioquímica y Biofísica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ²Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁴Departamento de Patología Molecular, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁵Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁶These authors contributed equally: Natali D'Aiuto and Jimena Hochmann. ✉email: jhochmann@fmed.edu.uy; m.arocena.sutz@gmail.com

Hypoxic conditions are also associated with higher intracellular levels of oxidative stress, particularly in the form of increased reactive oxygen species (ROS), produced mainly at the level of the mitochondrial respiratory complex III¹⁰. Increased ROS as a consequence of hypoxia participate in the O₂ sensing mechanism of cells¹¹, but they can also have adverse consequences, particularly in the frequently hypoxic tumor microenvironment, where they contribute to increased tumor genetic instability and invasiveness^{12,13}. Proposed mechanisms of hypoxia-induced generation of ROS include a slowed electron transport chain, which would allow partially reduced ubiquinone (ubisemiquinone) to transfer electrons to O₂, even if O₂ levels are low^{14,15}. Both a functional electron transport chain and the maintenance of mitochondrial membrane potential have been linked to mitochondrial generation of ROS during hypoxia¹⁶. In particular, mitochondrial ROS production occurs as a transient burst of superoxide (O₂⁻) generation during the first minutes of acute hypoxia, which is related to the activation of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger^{17,18}.

Increased oxidative stress can be detected not only under low ambient O₂ but also immediately after reoxygenation, suggesting a complex interplay between varying levels of microenvironment O₂ levels and ROS production¹⁹. Therefore, important aspects of the study of hypoxia-induced oxidative stress are the methodologies used to recreate a hypoxic cellular environment and to evaluate intracellular hypoxia as well as oxidative stress levels. In particular, to define more precisely the links between hypoxia and oxidative stress, methodologies devised to simultaneously assess the intracellular hypoxic and ROS status would constitute a useful contribution. Microfluidic systems have been used to expose cells to different levels of ambient O₂ while simultaneously imaging the fluorescence intensity of ROS sensitive fluorescent probes²⁰. Alternatively, cell culture chambers that restrict gas exchange with the environment have been used to create cell-generated oxygen gradients, and to image hypoxic gradients and other relevant parameters, such as mitochondrial membrane potential^{21,22}.

Recently, we have modified the method of coverslip-induced hypoxia to create simple cell culture chambers where cells can be cultured at large distances from an oxygen source, generating high levels of intracellular hypoxia that are compatible with live cell imaging²³. In the present study, we have used this method to simultaneously visualize the hypoxic and oxidative status of cells at large distances from an oxygen source.

On the other hand, in our previous study, we used the modified method of coverslip-induced hypoxia in LNCaP cells, which is a metastatic and highly glycolytic cancer cell line, and therefore represents a cellular model of advanced cancer progression²³. However, it would also be important to use a cellular model more representative of intermediate stages of malignant transformation, considering in particular that hypoxia in the early tumor microenvironment is a powerful selective force driving tumor progression².

In the present study, we have used, as a cell model, the human keratinocyte, immortalized, non-tumorigenic HaCaT cell line, transduced with viral oncogenes E5, E6 and E7 of Human Papilloma Virus type 18 (HPV-18) oncogenes, which represents a cellular model of an intermediate stage of malignant transformation induced by high risk HPV. Previous results from our group have shown that this cell line exhibited increased levels of oxidative stress as well as a more invasive phenotype compared to the HaCaT parental cell line without viral oncogenes, which are non transformed cells²⁴. In both HaCaT parental and HaCaT transduced with viral oncogenes (henceforth referred as HaCaT E5/E6/E7-18), we have observed increased oxidative stress levels when cells are close to the oxygen source, observing also mild intracellular hypoxia levels and preservation of the mitochondrial membrane potential in this situation. In cells at large distances from an oxygen source, which are highly hypoxic, oxidative stress levels are reduced and the mitochondrial membrane potential decreases. Moreover, we have observed increased acidification, accompanied by increased lactate and CO₂ levels. Next, we have developed a simple approach to assess the contributions of lactate and CO₂ to pH decrease, showing that, in our in vitro model of the tumor microenvironment, the main contribution to acidification comes from CO₂ production.

Therefore, our results show that the modified method of coverslip-induced hypoxia can be used to recreate a hypoxic, acidified microenvironment. With this method, the contributions of lactate and CO₂ to acidification can be assessed, and in particular the oxidative and hypoxic status of cells can be visualized simultaneously, providing a method to study the contributions of different environmental stresses on cell physiology.

Results

Intracellular hypoxia in cells at large distances from an oxygen source. HaCaT cells (both parental and E5/E6/E7-18) were cultured for 24 h under a coverslip with a central hole that serves as the only oxygen source (see Fig. 1A for a schematic of the method). In the periphery of the cell chamber, cells developed the high levels of intracellular hypoxia that can be detected by pimonidazole, but not near the center of the chamber (Fig. 1B), or at intermediate regions (data not shown). Therefore, we have studied intracellular hypoxia and other cellular properties (as detailed in following sections) in cells either close to the oxygen source (cells near the center of the chamber) or at a large distance from this source (cells at the periphery of the chamber). However, when instead of pimonidazole we used BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye to visualize intracellular hypoxia in live cells, after 24 h of coverslip treatment a moderate level of signal was observed near the center of the chamber, although the signal was much stronger in the periphery, indicating that intracellular hypoxia levels are high in the periphery but that milder levels can also be found in the central zone of the chamber (Fig. 1D,E). O₂ levels in the culture medium are significantly reduced after 24 h of coverslip treatment (Fig. 1C), which, taken together with the previous results, suggests that cell respiration lowers O₂ levels in the coverslip treatment condition, and therefore cells in the periphery of the chamber, far from the oxygen source, become more hypoxic than cells in the central region of the chamber, near the oxygen source.

Acidification, CO₂ and lactate production after coverslip-induced hypoxia. In our previous study, we observed that HaCaT E5/E6/E7-18 cells have increased expression of the glycolytic enzyme Enolase2²⁴ compared to parental HaCaT cells. To further characterize metabolic differences between HaCaT parental and

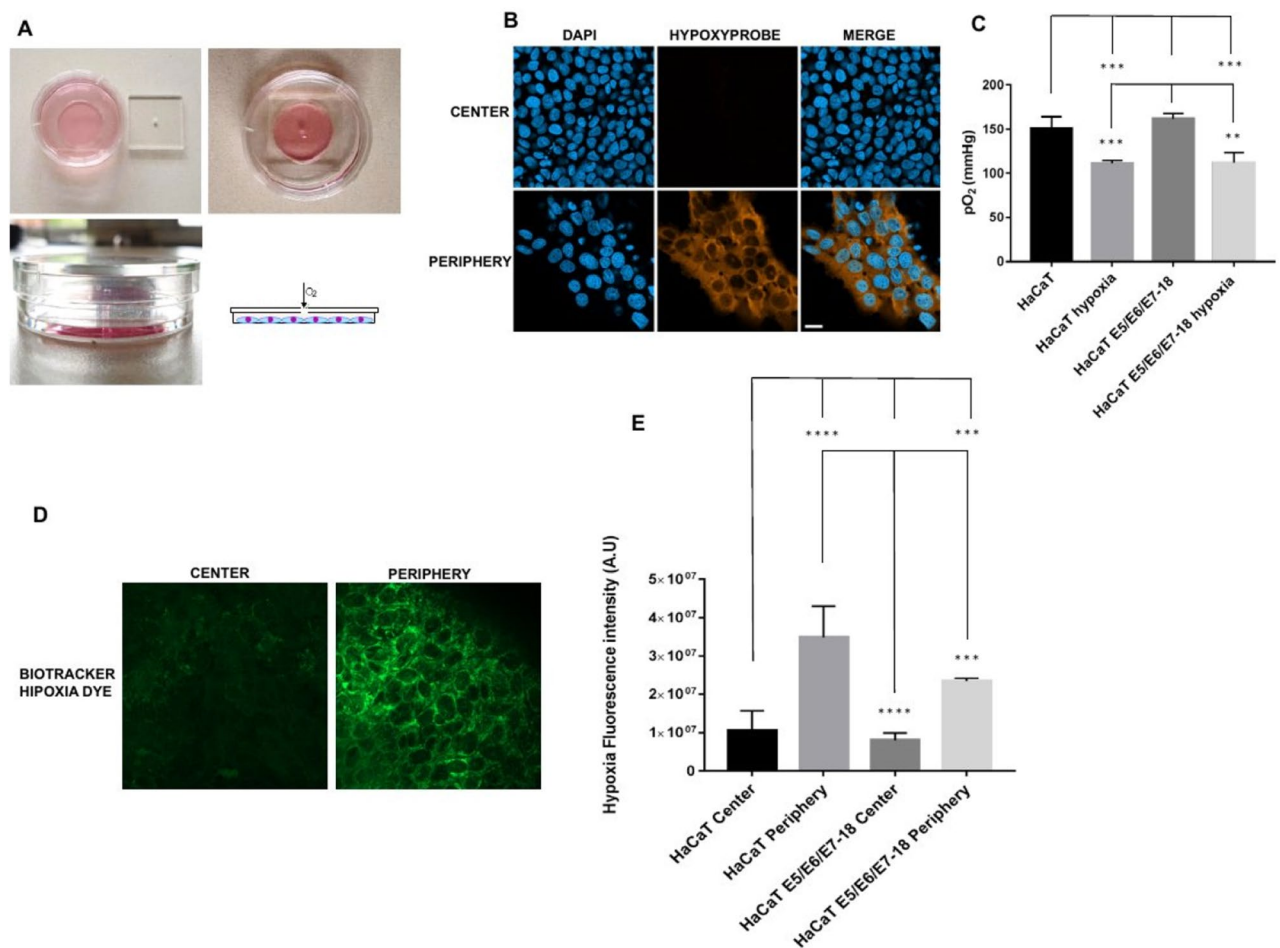


Figure 1. (A) Schematics of the cell chamber used in the coverslip-induced hypoxia variant. An acrylic coverslip with a central hole is placed on top of the well of a 35 mm glass bottom dish. The central hole is the only oxygen source, and cells inside the well are at varying distances from it. (B) Representative images of pimonidazole adduct detection (Hypoxyprobe), shown here in HaCaT E5/E6/E7 HPV-18 cells cultured under coverslips for 24 h. Images from the central zone or the periphery of the cell chamber are shown. (C) Quantification of O₂ levels in HaCaT parental and HaCaT E5/E6/E7 HPV-18 cells in normoxia and with a coverslip. (D) BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye signal in control cells, or in cells under coverslips for 24 h, either in the central zone or the periphery of the cell chamber. (E) Quantification of hypoxia signal through BioTracker Green Hypoxia Dye in HaCaT E5/E6/E7-18 and parental HaCaT cells. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$. Scale bar: 20 μm .

E5/E6/E7-18 cells in normoxic conditions, we measured oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) with a Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer. HaCaT E5/E6/E7-18 cells showed increased OCR and ECAR compared to HaCaT parental cell lines (Fig. 2A,B). Slightly increased levels of lactate were also observed in the cell supernatants for HaCaT E5/E6/E7-18 cells compared to HaCaT parental cells, both in normoxia and after coverslip treatment (Fig. 2C). Independently of these metabolic differences between HaCaT E5/E6/E7-18 cells and parental cells, both cell lines showed significantly increased levels of lactate and CO₂ in the cell supernatant after coverslip treatment (Fig. 2D), whereas the pH of the cell supernatant decreased significantly after coverslip treatment for both cell lines (Fig. 2E,F). These results confirm our previous observations of extracellular acidification after coverslip treatment²³, and suggest that both lactate and CO₂ increase contribute to pH decrease.

Contributions of CO₂ and lactate to acidification after coverslip-induced hypoxia. To assess more precisely the contributions of lactate and CO₂ to the observed pH decrease, we developed a simple approach, based on the Kassirer–Bleich approximation for the CO₂ derived bicarbonate, and on the electrical neutrality in a medium containing abundant inorganic ions such as Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Cl⁻²⁵. As detailed in Appendix 1, we obtain the following equation, which relates [H⁺] to [lactate] and pCO₂:

$$[H^+] \approx \frac{0.000024 \times pCO_2}{\Delta_{\text{inorganic ions}} - [\text{lactate}]}$$

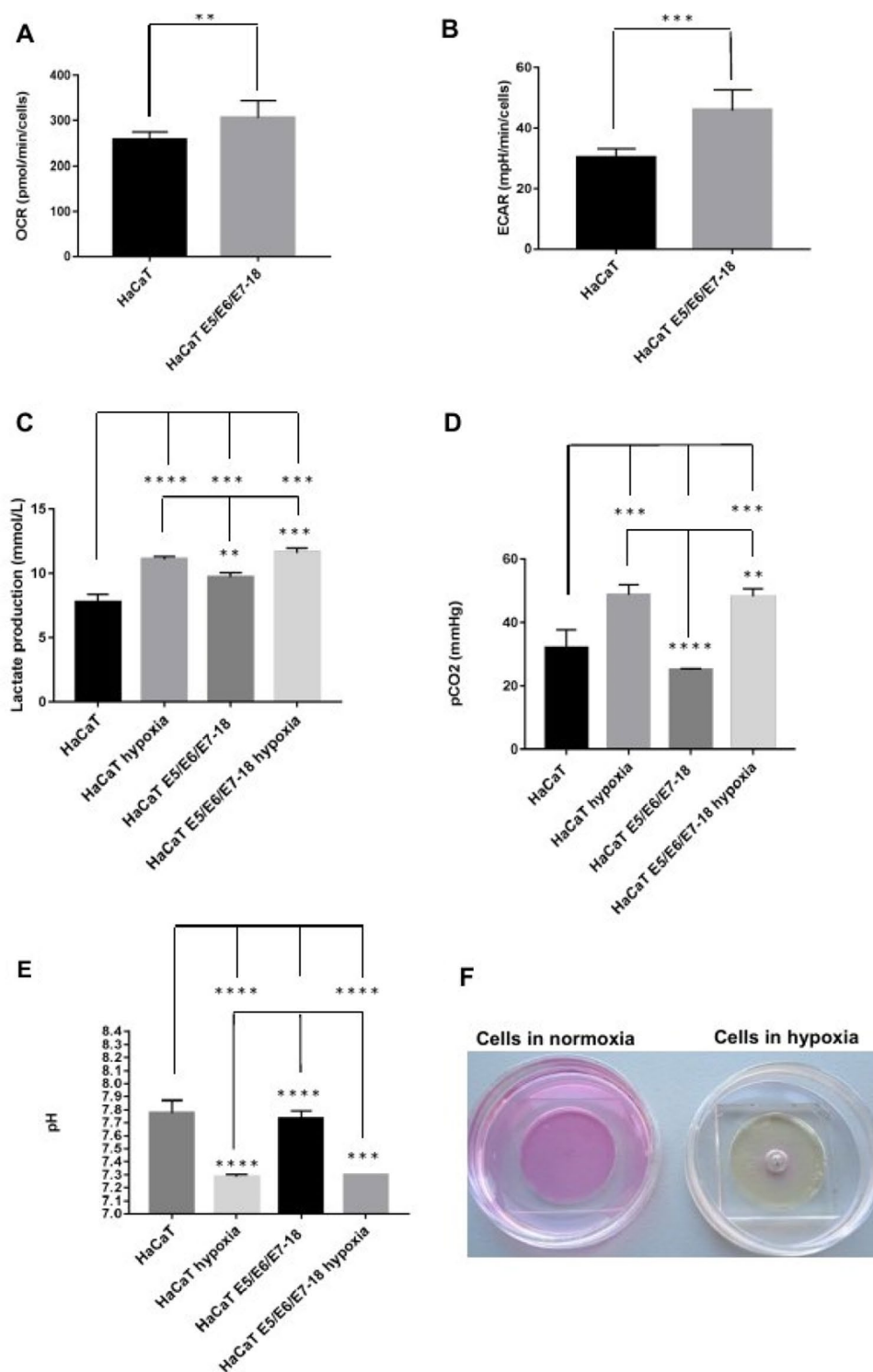


Figure 2. Measurement of metabolic parameters in HaCaT parental and HaCaT E5/E6/E7-18 cell lines. **(A)** Oxygen Consumption Rate (OCR) **(B)** Extracellular Acidification Rate (ECAR) **(C)** Lactate production levels measured in HaCaT parental and HaCaT E5/E6/E7-18 cells in normoxia and hypoxia conditions. **(D)** CO₂ levels measured in HaCaT parental and HaCaT E5/E6/E7-18 cells in normoxia and hypoxia conditions. **(E)** pH measurements in HaCaT parental and HaCaT E5/E6/E7-18 cells in normoxia and hypoxia. **(F)** Changes in phenol red culture medium can be seen after coverslip treatment. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$.

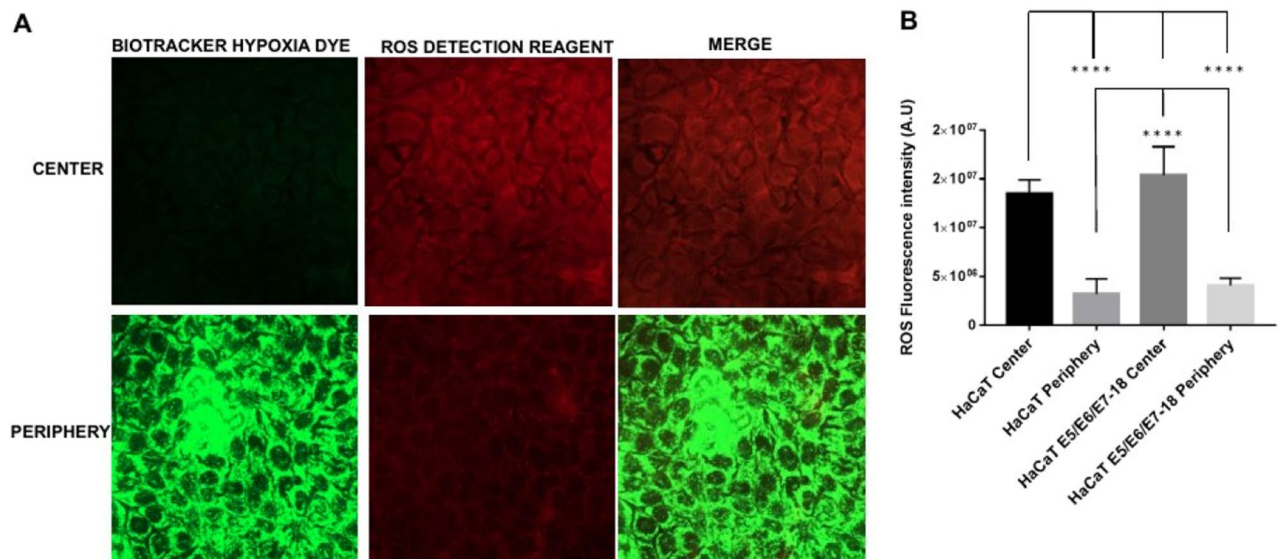


Figure 3. Simultaneous detection of intracellular hypoxia and ROS levels (A). Representative images of BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye, and ROS Detection Reagent Deep Red signal in cells under coverslips for 24 h, either in the central zone or the periphery of the cell chamber. (B) Quantification of Hypoxia and ROS intensity (mean ± SEM) in normoxia and coverslip conditions for HaCaT parental and HaCaT E5/E6/E7-18 cells.

where $\Delta_{\text{inorganic ions}}$ is the difference in charge between the aforementioned inorganic ions. As shown in Appendix 1, this equation fits closely the experimental pH values observed, and it allows to show in a straightforward manner that the observed increase in pCO_2 contributes much more importantly than the observed increase in lactate concentration to the observed decrease in pH. Therefore, in our model of coverslip-induced hypoxia and with the HaCaT cell lines used, the acidification we observed is related mainly to CO_2 accumulation.

Simultaneous visualization of hypoxia and oxidative stress in coverslip-induced hypoxia. Next, live cells under coverslips were incubated simultaneously with the BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye (498/520 nm excitation/emission) and with the ROS Detection Reagent Deep Red (640/675 nm excitation/emission). The ROS Detection Reagent signal was significantly higher near the center of the chamber (close to the oxygen source), where intracellular hypoxia was mild, than in the periphery (farther from the oxygen source), where intracellular hypoxia was high (Fig. 3A and B).

Simultaneous visualization of hypoxia and mitochondrial membrane potential in coverslip-induced hypoxia. We then assessed the status of the mitochondrial membrane potential with the fluorescent probe Mitotracker Deep Red, that shows mitochondrial accumulation dependent upon mitochondrial membrane potential^{26,27}, confirmed also by decreased staining intensity after treatments that reduce mitochondrial membrane potential²⁸. Also, given that Mitotracker Deep Red has an excitation/emission maxima of 644/665 nm, we used it simultaneously with the Biotracker Green Hypoxia Dye. After 24 h under coverslips, cells showed significantly decreased Mitotracker Deep Red fluorescence intensity in the periphery, where the hypoxia signal was high, compared with the central region of the chamber, where the hypoxia signal was low (Fig. 4A and B). Moreover, a 30 min treatment with the electron transport inhibitor rotenone (1 μM) caused a decrease in fluorescence intensity as well, confirming that Mitotracker Deep Red fluorescence intensity is sensitive to the mitochondrial membrane potential (Fig. 4C). Our results therefore indicate that in the periphery of the chamber, where cells are furthest from the oxygen source and experiencing high intracellular hypoxia, mitochondrial membrane potential is significantly reduced compared to cells near the oxygen source, which experience milder levels of intracellular hypoxia.

Discussion

In this study, we have analyzed the acidification, hypoxia and oxidative stress generated by a modified method of coverslip-induced hypoxia that permits to culture cells at large distances from an oxygen source. We observed decreased O_2 in cell supernatants after 24 h of coverslip treatment, at which time we detected highly hypoxic cells in the periphery of the chamber, furthest from the oxygen source, both by pimonidazole staining and by using the live cell hypoxia marker BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye. Hypoxia detection by pimonidazole adduct formation is sensitive only to very low intracellular levels of O_2 ⁵, and we did not observe pimonidazole staining in cells in the central region of the chamber, near the oxygen source. However, we detected a moderate hypoxia signal in cells in this region with the BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye, in agreement with the manufacturers' reported properties of the Biotracker dye of detecting milder hypoxic conditions than pimonidazole. Therefore, taken together, our results can be interpreted as indicating that O_2 decreases after coverslip treatment due to cell

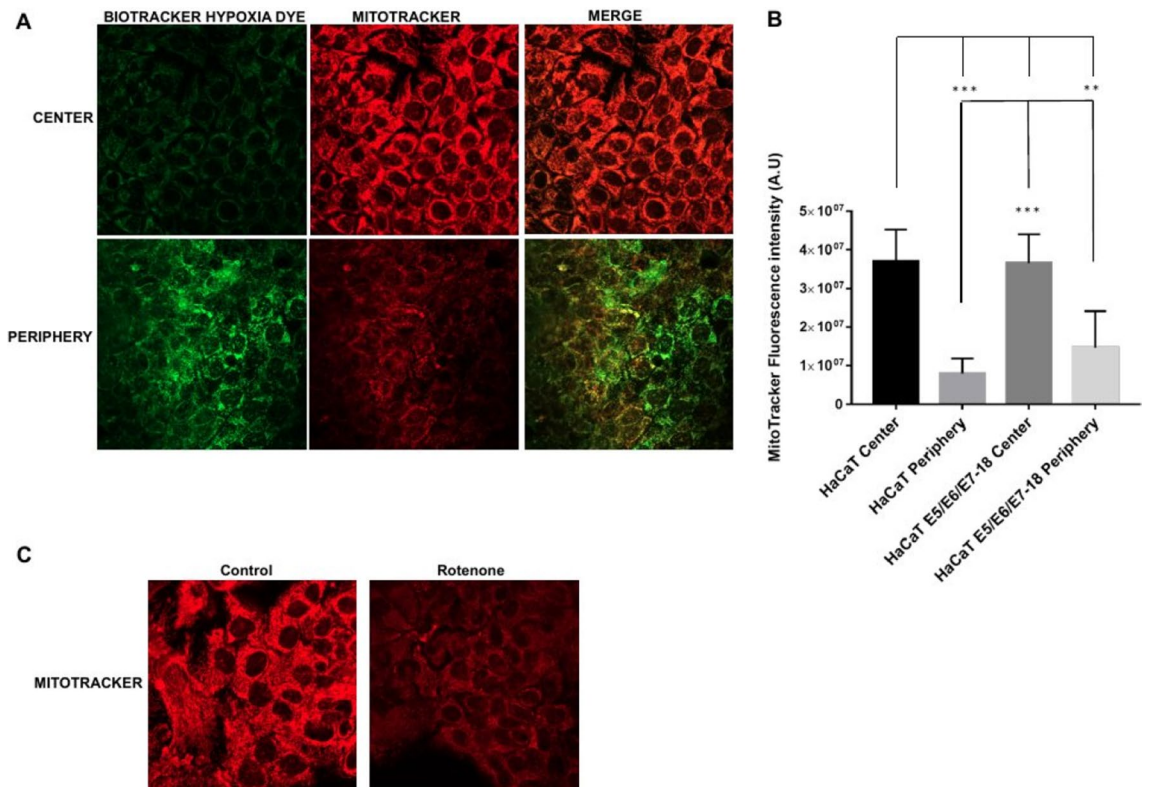


Figure 4. Mitochondria potential in HaCaT parental and HaCaT E5/E6/E7-18 cell lines. (A) Representative images of MitoTracker Deep Red FM signal in cells under coverslips for 24 h, either in the central zone or the periphery of the cell chamber. (B) Quantification of mitochondrial potential (mean \pm SEM) in normoxia and hypoxia conditions for HaCaT parental and HaCaT E5/E6/E7-18 cells. (C) Representative images showing Mitotracker signal in HaCaT cells in control conditions and after 1 h rotenone (1 μ M). (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$. Scale bar: 20 μ m.

respiration, and that cells farther from the oxygen source become as a consequence highly hypoxic, whereas cells near the oxygen source become only moderately hypoxic.

Coverslip treatment also leads to a significant decrease in the pH of the extracellular medium, while causing accumulation of both lactate and CO₂. As shown in Appendix 1, we derived a simple expression for [H⁺] as a function of [lactate] and pCO₂, using an approach drawing on the Kassirer–Bleich approximation for the CO₂ derived bicarbonate, and on the approach pioneered by Stewart for assessing the importance of CO₂ in the pH of body fluids, in particular the consideration of electrical neutrality in a medium containing abundant inorganic ions²⁵. We obtained a very good fit between the experimental pH values and the values predicted by this expression and, in particular, using the experimental values for [lactate] and pCO₂, it is straightforward to show that, in our experimental setting, CO₂ accumulation is the main contributor to pH decrease after coverslip-induced hypoxia. These results are in agreement with previous studies, which show that tumor acidification is related to CO₂ production by tumor cells, and that acidification can occur even in glycolysis impaired cells or cells deficient in lactate dehydrogenase, which have markedly decreased lactate production^{9,29}. In our model, CO₂ accumulates due to the coverslip precluding gas exchange with the environment. In the microenvironment of non-vascularized or poorly vascularized tumors, CO₂ would be expected to accumulate, either by cellular respiration until oxygen is completely consumed, or by other metabolic routes, such as the pentose phosphate pathway^{8,9}, leading to acidification. Therefore, our modified method of coverslip-induced hypoxia constitutes a simple yet useful model for analyzing the different contributions of cell metabolism towards acidification in contexts such as the tumor microenvironment.

When we visualized simultaneously hypoxia and oxidative stress, by combining the BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye and the ROS Detection Reagent Deep Red probe, we observed increased levels of oxidative stress in moderately hypoxic cells near the center of the chamber, whereas levels of oxidative stress in highly hypoxic cells in the periphery of the chamber were reduced. At the same time, we observed a decrease in fluorescence intensity of the MitoTracker Deep Red probe, which is sensitive to the mitochondrial membrane potential, in cells in the periphery of the chamber, where intracellular hypoxia is highest. Taken together, these results suggest that, at high levels of intracellular hypoxia, mitochondrial membrane potential decreases, leading to lower oxidative stress levels compared with cells with moderate intracellular hypoxia, in which the mitochondrial membrane potential is preserved. In agreement with these results, both a functional electron transport chain and mitochondrial membrane potential have been shown to be required for ROS production in hypoxia¹⁶. Moreover, the mitochondrial ROS burst that has been shown in a previous study to occur in the first minutes of hypoxia

has been related to a certain degree of O₂ availability remaining inside cells at the beginning of hypoxia¹⁷. The cells that are close to the oxygen source in our coverslip-induced hypoxia method would be in a similar situation to the cells at the beginning of hypoxia in that study, with a certain level of O₂ remaining inside the cells (which in our cells translates as moderate intracellular hypoxia as visualized by the BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye). Therefore, the increased level of oxidative stress that we observed in cells close to the oxygen source is in agreement with the increased ROS production observed previously in cells at the initial stages of hypoxia¹⁷.

Our results also highlight the usefulness of our modified coverslip-induced hypoxia method for simultaneously visualizing levels of intracellular hypoxia and oxidative stress when studying the links between hypoxia and ROS production. In particular, the temporal dynamics of ROS production in hypoxia would be an important issue that could be analyzed with this method¹⁷. Also, it is important to consider cell type variabilities, as for instance similar extracellular O₂ levels can result in markedly different intracellular O₂ levels depending on the cell type, with more glycolytic cell types showing higher intracellular O₂ levels at low extracellular levels of O₂³⁰. Therefore, simultaneously visualizing levels of intracellular hypoxia and oxidative stress would allow to assess whether differences in intracellular ROS levels across cell types might be related to cell type dependent levels of intracellular hypoxia under similar low O₂ culture conditions.

During tumor development, tumor cells are subjected to fluctuating O₂ levels, either in the avascular state or due to a disorganized vascular network after angiogenesis has occurred, giving rise to conditions of intermittent hypoxia, which render tumor cells more resistant to apoptotic stimuli³¹. If moderate intracellular hypoxia, rather than nearly anoxic intracellular conditions, is associated with increased intracellular ROS levels, as suggested by our results, it would be expected that tumor cells subjected to intermittent hypoxic conditions would develop milder intracellular hypoxia levels, and consequently higher intracellular ROS levels, favoring the selection of more resistant and aggressive tumor clones¹². In addition, intermittent hypoxia could also be expected to cause increased CO₂ accumulation, due to periods of cellular respiration followed by impaired gas exchange, therefore leading to extracellular acidification, which constitutes another selective pressure towards more aggressive tumor cells⁸.

Our modified method of coverslip-induced hypoxia allows to study both the process of acidification and the interplay between intracellular hypoxia and oxidative stress as the distance from an oxygen source increases. In particular, in this study we have used HaCaT E5/E6/E7–18 cells, a recently developed cellular model of an intermediate stage of malignant transformation induced by high risk HPV, which have increased invasion capabilities and a more glycolytic metabolism compared to parental, non transduced HaCaT cells, but are still far from developing the highly glycolytic and invasive phenotypes of cell lines derived from advanced stage cancers²⁴. Using this cellular model, we have been able to assess the contributions of lactate and CO₂ to extracellular acidification, and to simultaneously assess both the oxidative stress and hypoxic status of cells either close to an oxygen source or at large distances from it. Our results suggest that cells at intermediate stages of malignant transformation, when exposed to the hypoxic, avascular early tumor microenvironment, will cause extracellular acidification mainly through CO₂ accumulation, and will develop higher levels of ROS in regions closer to the capillaries from the underlying stroma, which constitute the oxygen source. Therefore, in this study we have shown that our modified method of coverslip-induced hypoxia constitutes a simple yet useful model to study how an altered microenvironment can impact processes such as tumor progression.

Materials and methods

Cell culture. Spontaneously immortalized human keratinocyte (HaCaT) cells were purchased from Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brazil (batch number 001071, certificate of analysis provided by the supplier) and maintained in Dulbecco's modified eagle's medium. (DMEM) low glucose medium (Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, MA, USA). HaCaT cells were tested internally for mycoplasma by polymerase chain reaction (PCR). HaCaT E5/E6/E7 HPV-18 cells were obtained through co-infection with a retroviral vector carrying the MSCV-N-puro-18E5 plasmid (Addgene # 37882, MA, USA) and with a pLXSN retroviral vector that contained cloned HPV-18 E6/E7 genes gently provided by Dr. Laura Sichero. The preparation and characterization of these cell lines was detailed in Hochmann et al.²⁴.

Coverslip-induced hypoxia. To culture cells at large distances from an oxygen source, we used the variant of coverslip-induced hypoxia described previously²³. Briefly, cells were cultured in the 10 mm radius wells of glass bottom dishes (35 mm diameter, Cellvis, CA, USA), and after cells were adhered the wells were covered with square acrylic coverslips (24 mm width, 2 mm thickness) with a square hole in the middle (1 mm width). In this way, cell culture chambers are obtained where cells in the periphery of the chamber are located at 10 mm from the coverslip hole (which serves as the only oxygen source). The method is depicted in Fig. 1A.

Hypoxia detection in fixed cells. For hypoxia detection in fixed cells, we used a hypoxia detection kit (Hypoxyprobe, MA, USA) as described previously²³. Cells under coverslips for 22 h were incubated with the hypoxia marker pimonidazole for another 2 h at a final concentration of 200 μM in the medium. Next, cells were fixed 10 min with 4% paraformaldehyde, washed in phosphate buffered saline (PBS), permeabilized with 0.1% Triton X 100, blocked with 3% bovine serum albumin, and stained with an antibody that recognizes pimonidazole adducts conjugated to Dylight™ 549 fluorophore (1:200 dilution). Nuclei were stained with 4',6 diamidino 2 phenylindole (DAPI; Invitrogen, MA, USA). Cells were visualized with a Zeiss LSM 800 confocal microscope.

Hypoxia and ROS Detection in live cells. After 24 h of coverslip treatment, we evaluated simultaneously the levels of hypoxia and ROS in HacaT (parental and E5/E6/E7–18) live cells. At 21 h of coverslip treatment, we

added both BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye (Millipore, CA, USA, 5 μ M final concentration) and ROS Detection Reagent Deep Red (Sigma, MO, USA, 1:1000 dilution from stock solution) through the central hole in the coverslip, or to control cells without coverslips, and after 3 h (completing 24 h of coverslip treatment) cells were visualized by confocal microscopy, and the temperature during measurements was kept at 37 °C.

Mitochondrial membrane potential detection in live cells. To detect mitochondrial membrane potential in live cells, we used the far red fluorescent dye MitoTracker Deep Red FM (Thermo Scientific, USA) that stains mitochondria in live cells and shows accumulation which is dependent upon mitochondrial membrane potential^{26,27}.

After 21 h of coverslip treatment, MitoTracker Deep Red was added through the central hole in the coverslip or to cells without coverslip (500 nM final concentration), simultaneously with BioTracker™ 520 Green Hypoxia Dye (5 μ M final concentration) and cells were incubated for another 3 h at 37 °C, and then were visualized by confocal microscopy.

Measurements of O₂, CO₂, lactate and pH. HaCaT (parental and E5/E6/E7–18) cells were incubated with or without coverslips for 24 h. After this period, cells supernatants were collected and analyzed immediately in a ABL800Flex radiometer to obtain values of pH, O₂, lactate and CO₂ levels as well as levels of important extracellular ions (see Appendix 1).

Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) measurements. OCR and ECAR were measured in HaCaT (parental and E5/E6/E7–18) cell using a Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer (Agilent, USA). Seahorse XF Wave Software was used to analyze the data.

Statistical analysis. Statistical analysis and graphical presentation were conducted using GraphPad Prism version 8.0.1 (244) software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). All experiments were performed in triplicate and data were presented as the mean \pm standard deviation (SD). Data were analyzed by One-Way unpaired ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test with the exception of data retrieved from Seahorse Analyzer, which was analyzed using Student's Test in order to compare only two means.

Data availability

All data associated with this study are present in the paper or the Supplementary Materials.

Received: 15 August 2022; Accepted: 12 December 2022

Published online: 15 December 2022

References

1. Semenza, G. L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 47–71 (2014).
2. Gillies, R. J. & Gatenby, R. A. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 311–317 (2007).
3. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors: Coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J.* **36**, 252–259 (2017).
4. Vukovic, V. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α is an intrinsic marker for hypoxia in cervical cancer xenografts. *Cancer Res.* **61**, 7394–7398 (2001).
5. Raleigh, J. A., Chou, S.-C., Arteel, G. E. & Horsman, M. R. Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiat. Res.* **151**, 580 (1999).
6. Piao, W. *et al.* Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 13028–13032 (2013).
7. De Milito, A. & Fais, S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol.* **1**, 779–786 (2005).
8. Kato, Y. *et al.* Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* **13**, 89 (2013).
9. Helmlinger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N. S. & Jain, R. K. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor. *Metabolism* **1**(8), 1284–1291 (2002).
10. Guzy, R. D. *et al.* Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* **1**, 401–408 (2005).
11. Lee, P., Chandel, N. S. & Simon, M. C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 268–283 (2020).
12. Gillies, R. J., Verduzco, D. & Gatenby, R. A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 487–493 (2012).
13. Shimojo, Y. *et al.* Attenuation of reactive oxygen species by antioxidants suppresses hypoxia-induced epithelial–mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **30**, 143–154 (2013).
14. Guzy, R. D. & Schumacker, P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. In *Experimental Physiology*, vol. 91 807–819 (Blackwell Publishing Ltd, 2006).
15. Klimova, T. & Chandel, N. S. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* **15**, 660–666 (2008).
16. Martínez-Reyes, I. *et al.* TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. *Mol. Cell* **61**, 199–209 (2016).
17. Hernansanz-Agustín, P. *et al.* Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radic. Biol. Med.* **71**, 146–156 (2014).
18. Hernansanz-Agustín, P. *et al.* Na⁺ controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain. *Nature* **586**, 287–291 (2020).
19. Abramov, A. Y., Scorziello, A. & Duchon, M. R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J. Neurosci.* **27**, 1129–1138 (2007).
20. Berger Fridman, I., Ugolini, G. S., Vandelinder, V., Cohen, S. & Konry, T. High throughput microfluidic system with multiple oxygen levels for the study of hypoxia in tumor spheroids. *Biofabrication* **13**, 035037 (2021).
21. Hoh, J. H., Werbin, J. L. & Heinz, W. F. Restricted exchange microenvironments for cell culture. *Biotechniques* **64**, 101–109 (2018).

22. Gilmore, A. C. *et al.* An in vitro tumorigenesis model based on live-cell-generated oxygen and nutrient gradients. *Commun. Biol.* **4**, (2021).
23. Arocena, M. *et al.* Using a variant of coverslip hypoxia to visualize tumor cell alterations at increasing distances from an oxygen source. *J. Cell. Physiol.* **234**, 16671–16678 (2019).
24. Hochmann, J. *et al.* Human papillomavirus type 18 e5 oncoprotein cooperates with e6 and e7 in promoting cell viability and invasion and in modulating the cellular redox state. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **115**, (2020).
25. Morgan, T. J. The Stewart approach—One clinician's perspective. *Clin. Biochem. Rev.* **30**, 41–54 (2009).
26. Greene, A. W. *et al.* Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep.* **13**, 378–385 (2012).
27. Townley, A. R. & Wheatley, S. P. Mitochondrial survivin reduces oxidative phosphorylation in cancer cells by inhibiting mitophagy. *J. Cell Sci.* **133**, 575 (2020).
28. Mot, A. I., Liddell, J. R., White, A. R. & Crouch, P. J. Circumventing the Crabtree effect: A method to induce lactate consumption and increase oxidative phosphorylation in cell culture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **79**, 128–138 (2016).
29. Yamagata, M., Hasuda, K., Stamato, T. & Tannock, I. F. The contribution of lactic acid to acidification of tumours: Studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br. J. Cancer* **77**, 1726–1731 (1998).
30. Potter, M., Badder, L., Hoade, Y., Johnston, I. G. & Morten, K. J. Monitoring intracellular oxygen concentration: Implications for hypoxia studies and real-time oxygen monitoring. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 876 257–263 (Springer New York LLC, 2016).
31. Martinive, P. *et al.* Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: Implications for anticancer therapies. *Cancer Res.* **66**, 11736–11744 (2006).

Acknowledgements

This work was funded by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). We are grateful to Ines Marmisolle for her assistance in mitochondrial membrane potential experiments. We are also grateful to Valeria Valez and Martín Angulo for assistance with the Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer and the ABL800Flex radiometer, respectively.

Author contributions

N.D., J.H., M.M. and M.A. performed experiments. A.D.P., R.B.M. and J.S.S. assisted with data acquisition and analysis. M.A. developed the approach to assess pH dependence on CO₂ and lactate. N.D., J.H. and M.A. wrote the paper.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26205-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.H. or M.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022