



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



MEDIKUNTZA ETA ODONTOLOGIA FAKULTATEA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Efecto de la presión parcial de O₂ sobre los sistemas antioxidantes y los niveles intracelulares de ROS en células tumorales

Memoria del Trabajo Fin de Máster

Máster “Biología Molecular y Biomedicina”

Trabajo realizado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología,
UPV/EHU (Leioa) y dirigido por Rosaura Navarro Lobato y M^a Begoña Ruiz Larrea

IRATXE SUÁREZ BILBAO

21/06/2013

ÍNDICE

Abstract / Resumen	Pág. 3
Introducción	Pág. 4
Objetivos	Pág. 7
Materiales y métodos	Pág. 8
Resultados	Pág. 15
Discusión	Pág. 19
Conclusiones	Pág. 21
Importancia y futuras investigaciones	Pág. 22
Agradecimientos	Pág. 23
Bibliografía	Pág. 24

ABSTRACT

Molecular oxygen is important in cellular aerobic metabolism. During these reactions, reactive oxygen species (ROS) are produced and can damage proteins, lipids, and DNA, resulting in oxidative stress. However, antioxidant systems, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, and catalase protect cells against oxidative damage. Solid tumors grow in a low pO_2 atmosphere, so intracellular ROS levels could be altered, affecting the progression, aggressiveness, and invasiveness of the tumor. The aim of this work was to determine the effects of the O_2 partial pressure on the intracellular basal levels of ROS and the antioxidant SOD activity in different tumor cell lines. For this purpose, the human A375 (melanoma), HeLa (cervix), HepG2, SK-Hep-1, Huh-7, PLC/PRF/5, and CHL (hepatocarcinomas), and rat McA-RH7777 (hepatoma) cell lines were used at two O_2 conditions: (a) 21% pO_2 (high), and (b) 8% pO_2 (low). Results showed that the intracellular basal levels of ROS varied depending on the tumor cell line. Thus, SK-Hep-1 and PLC/PRF/5 showed the highest ROS values, while HeLa showed the lowest basal ROS levels. The 8% pO_2 significantly decreased ROS in A375, SK-HEP-1, Huh-7, and McA-RH7777. The pO_2 affected SOD activity depending on the cell type; thus, 8% pO_2 increased SOD activity in HepG2, while decreased it in PLC/PRF/5 and CHL.

RESUMEN

El oxígeno molecular es esencial en el metabolismo celular aerobio. Durante estas reacciones se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden originar un estrés oxidativo en la célula, provocando lesiones en proteínas, lípidos y DNA. Sin embargo, los sistemas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa, protegen a las células de dicho estrés. Los tumores sólidos crecen y se desarrollan a pO_2 bajas, de forma que los niveles intracelulares de ROS podrían modificarse, afectando a la progresión, agresividad, e invasividad del tumor. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la presión parcial de O_2 sobre los niveles intracelulares basales de ROS y la actividad antioxidante SOD en diferentes líneas celulares tumorales. Con este propósito se utilizaron las líneas celulares humanas A375 (melanoma), HeLa (cáncer de cuello de útero), HepG2, SK-HEP-1, Huh-7, PLC/PRF/5 y CHL (hepatomas) y de rata McA-RH7777 (hepatoma) en dos condiciones de pO_2 : (a) al 21% (alta) y (b) al 8% (baja). Los resultados mostraron que los niveles estacionarios de ROS variaron dependiendo de la línea celular tumoral. Así, SK-Hep-1 y PLC/PRF/5 presentaron los valores de ROS más altos, mientras que HeLa presentó los valores mínimos. La pO_2 del 8% disminuyó significativamente los niveles de ROS en A375, SK-HEP-1, Huh-7 y McA-RH7777. La pO_2 afectó a la actividad SOD dependiendo de la línea celular; así, la pO_2 del 8% incrementó la actividad SOD en HepG2, mientras que la disminuyó en PLC/PRF/5 y CHL.

INTRODUCCIÓN

El O_2 es una molécula esencial en los organismos que utilizan el metabolismo aerobio. Las diferentes reacciones que tienen lugar en este tipo de metabolismo producen especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (HO^\cdot) (Limón-Pacheco y cols, 2009; Reuter y cols, 2010).

A concentraciones bajas los ROS participan en un gran número de procesos celulares y son necesarios para el correcto funcionamiento de la célula, ya que pueden actuar como segundos mensajeros en la transducción de señales y en la regulación de la expresión genética (Cooke y cols, 2003; Marnett, 2000; Valko y cols, 2006). De ahí la importancia de mantener sus concentraciones dentro de unos niveles fisiológicos. Cuando el equilibrio oxidantes/antioxidantes se rompe a favor de los primeros se produce lo que se conoce como *estrés oxidativo*, responsable de daños a nivel celular y tisular (Limón-Pacheco y cols, 2009; Kietzmann y cols, 2005).

El radical O_2^- es el precursor de la mayor parte de ROS y puede llegar a ser un mediador en la sucesión de reacciones oxidativas. El óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) son otras especies radicalarias celulares importantes (Al-Gubory y cols, 2010; Guthrie y cols, 2006). La producción de NO partiendo de la L-Arg, gracias al enzima NO sintasa (NOS) constituye un proceso bioquímico relevante en la señalización, ya que el NO actúa como regulador de diferentes actividades celulares y de la muerte celular programada. El O_2^- puede ser producido por 2 rutas metabólicas distintas: enzimática y no enzimática. La no enzimática tiene lugar cuando un electrón es transferido al O_2 mediante grupos prostéticos o coenzimas reducidos. En la enzimática el O_2^- es producido por reacciones catalizadas por diferentes enzimas tales como la NADH/NADPH oxidasa, xantina oxidasa, lipoxigenasa, ciclooxigenasa o sistemas de enzimas como el del citocromo P-450 o los de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Taverne y cols, 2013). El NO reacciona con el O_2^- formando $ONOO^-$ (Brüne y cols, 2003), éste es una de las causas del estrés oxidativo provocando aterosclerosis a consecuencia de la peroxidación de lípidos o la nitrosilación de proteínas (Kyaw y cols, 2004). A su vez, el H_2O_2 puede convertirse en HO^\cdot mediante la reacción de Fenton oxidando el Fe^{2+} a Fe^{3+} . El HO^\cdot es un radical altamente oxidante e inestable.

El organismo ha desarrollado una serie de sistemas encaminados a controlar y evitar la sobreproducción de ROS. Los antioxidantes suelen estar presentes en lugares donde se producen los ROS y donde sus efectos son más perjudiciales. Estos antioxidantes pueden ser de 2 tipos: los que tienen función catalítica o antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa,

glutación peroxidasa) y los antioxidantes no enzimáticos (glutación (GSH), vitaminas C y E, entre otros) (Reuter y cols, 2010).

Los antioxidantes enzimáticos forman parte de la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo. Las superóxido dismutasas (SODs) son una familia de metaloenzimas que eliminan el O_2^- transformándolo en H_2O_2 . Están presentes en todos los organismos aerobios. En los mamíferos en concreto existen 2 formas de SOD: CuZn-SOD y Mn-SOD. La primera forma se localiza en el citosol y en el medio extracelular y la segunda, en la mitocondria. El H_2O_2 producido por SOD es eliminado por los enzimas catalasa y glutación peroxidasa. La catalasa cataliza la reacción que convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 y la glutación peroxidasa reduce el H_2O_2 utilizando el GSH como reductor. El glutación se oxida a GSSG para volver a reducirse mediante la reacción catalizada por la glutación reductasa, utilizando NADPH proveniente de la ruta metabólica de las pentosas fosfato como reductor.

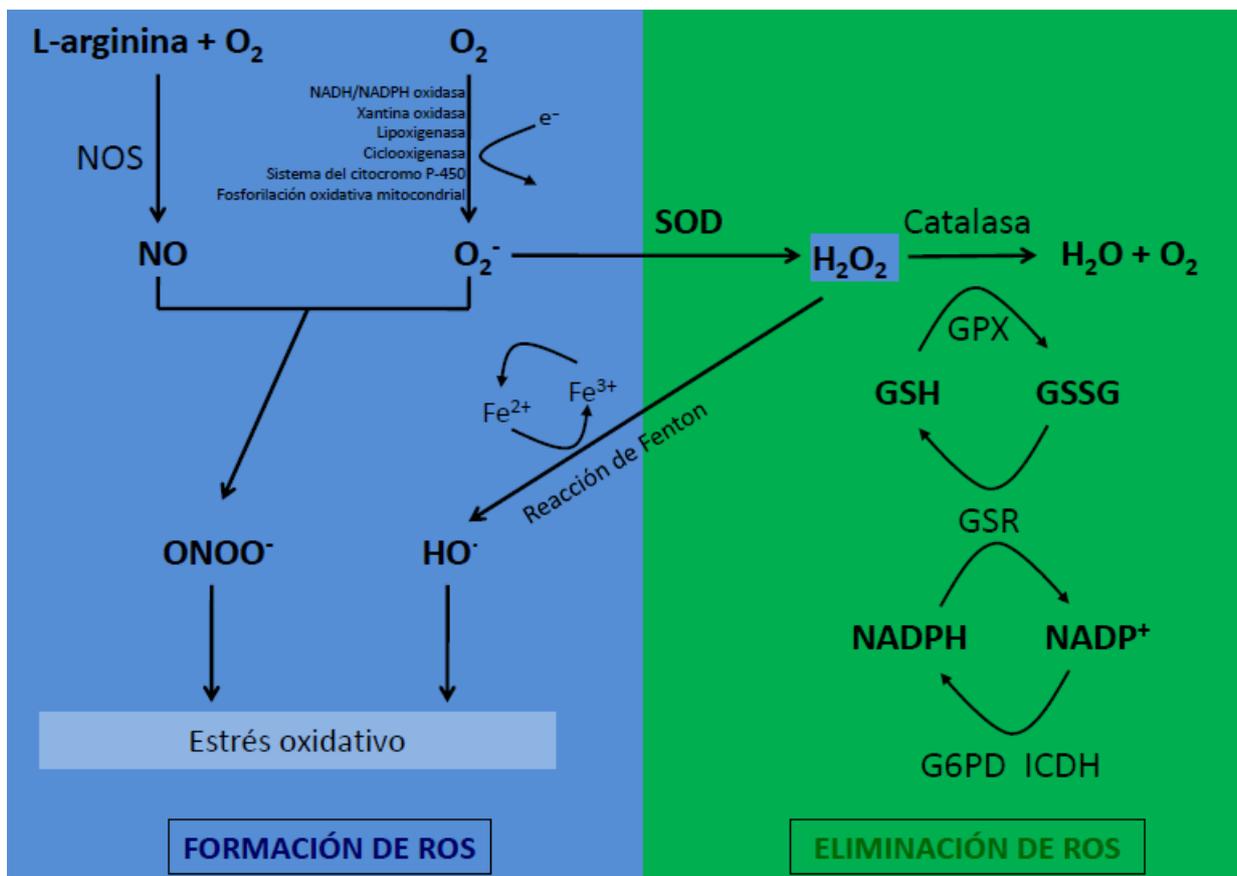


Figura 1. Esquema de las reacciones metabólicas que producen y eliminan diferentes tipos de ROS. En la zona azul están representadas las reacciones generadoras de ROS y en la zona verde las reacciones que los eliminan. NO (óxido nítrico), NOS (óxido nítrico sintasa), ONOO⁻ (peroxinitrito), HO· (radical hidroxilo) SOD (superóxido dismutasa), GPX (glutación peroxidasa), GSH (glutación reducido), GSSG (glutación oxidado), GSR (glutación reductasa), G6PD (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), ICDH (isocitrato deshidrogenasa).

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, habiendo un interés creciente por desarrollar compuestos anticancerígenos capaces de detener o retrasar la progresión del tumor. Los tumores sólidos suponen aproximadamente el 90% de todos los cánceres conocidos (Brown 2000). El proceso de la progresión del tumor (es decir, la proliferación, la invasión local y metástasis) se caracteriza por un crecimiento celular rápido acompañado por alteraciones del microambiente de las células tumorales. Las alteraciones en el microambiente celular se deben en gran medida a un suministro inadecuado de oxígeno (Ryan 2000; Vaupel 1989).

Presiones de O_2 bajas pueden inducir cambios en el proteoma de las células tumorales, disminuyendo el crecimiento (deteniendo el ciclo celular y la diferenciación) y provocando la muerte celular por apoptosis o por necrosis (Giaccia 1996; Moulder y Rockwell 1987; Riva y cols. 1998). Alternativamente, pueden inducir cambios proteómicos que permitan a las células tumorales adaptarse a la baja concentración de O_2 y de nutrientes para sobrevivir. En este caso se estimula la angiogénesis, la glicólisis, se inhibe la apoptosis y se sobreexpresan factores de crecimiento y otras proteínas involucradas en la invasión del tumor.

OBJETIVOS

Este trabajo fin de máster se enmarca en la línea de investigación sobre “*Respuesta de células hepáticas a agentes antitumorales*” del grupo *Radicales Libres y Estrés Oxidativo* del Departamento de Fisiología de la UPV/EHU. En esta línea se estudia la citotoxicidad y los mecanismos moleculares implicados que inducen fármacos antitumorales y extractos vegetales en diversas células cancerosas. Los resultados obtenidos hasta el momento se han llevado a cabo a una presión parcial de oxígeno del 21%. Los cultivos convencionales de líneas celulares se realizan habitualmente en estas condiciones de oxígeno atmosférico; sin embargo, *in vivo* las células de los tejidos se desarrollan a tensiones de oxígeno inferiores. Además, las células tumorales se encuentran alejadas de los vasos sanguíneos y proliferan a concentraciones de O₂ incluso inferiores.

El OBJETIVO de este trabajo de investigación fue determinar el efecto de la presión parcial de O₂ sobre los niveles intracelulares estacionarios de ROS y los sistemas antioxidantes, en particular la actividad SOD, en diferentes líneas celulares de tumores humanos y de rata. Para ello se utilizó la línea de melanoma humano A375, la línea tumoral de cuello de útero humano HeLa, los hepatomas humanos HepG2, SK-HEP-1, Huh-7, PLC/PRF/5 y CHL y el hepatoma de rata McA-RH7777 en 2 condiciones de pO₂: (a) del 21% (H, high) y (b) del 8% (L, low).

En estas condiciones se midieron los siguientes parámetros:

- Niveles intracelulares de ROS mediante una sonda fluorescente por citometría de flujo.
- Actividad SOD, mediante un ensayo colorimétrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares y mantenimiento

Las líneas celulares humanas y de rata se mantuvieron en su correspondiente medio de cultivo (EMEM: Eagle's minimum essential medium o DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium), conteniendo L-glutamina (2 mM), estreptomicina (0,1 mg/ml) y penicilina (100 U/ml) y los componentes que se especifican en la tabla 1.

Línea	Medio	Suero	HEPES	NaHCO₃	Piruvato
A375	DMEM	Suero bovino fetal (FBS) al 10%	2,38 mg/ml	3,7 mg/ml	-
HeLa	DMEM	FBS al 10%	2,38 mg/ml	3,7 mg/ml	1 mM
HepG2	EMEM	FBS al 10%	-	-	-
SK-HEP-1	EMEM	FBS al 10%	-	-	-
Huh-7	EMEM	FBS al 10%	-	-	-
PLC/PRF/5	EMEM	FBS al 10%	-	-	-
CHL	EMEM	FBS al 10%	-	-	-
McA-RH7777	EMEM	FBS al 5% y suero de caballo al 20%	-	-	-

Tabla 1. Medio de cultivo utilizado para cada línea celular.

Las células se incubaron en frascos Corning de 75 cm² (Fig. 2) a 37 °C, en una atmósfera humidificada y con 5% de CO₂ y a 2 concentraciones de O₂: 21% y 8%. Cuando las células alcanzaban una confluencia del 70-75% se levantaban utilizando una disolución de tripsina al 0,1% y EDTA al 0,04%. La reacción se detuvo añadiendo 5 ml de medio de cultivo con suero (el suero contiene inhibidores de tripsina). A continuación, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco.



Figura 2. Frascos Corning de 75 cm² en los que se incuban las líneas celulares.

Determinación de ROS

Para la determinación de los niveles basales de ROS se utilizó el método de la sonda fluorescente diclorofluoresceína (DCF) (Giordo y cols, 2013; Guthrie y cols, 2006). Las células se incubaron con la sonda en su forma reducida y esterificada (DCFH₂-DA). Una vez dentro, las esterasas intracelulares la hidrolizan, convirtiéndola en DCFH₂, que es oxidada por los ROS intracelulares a la forma fluorescente DCF, de manera que la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad intracelular de ROS.

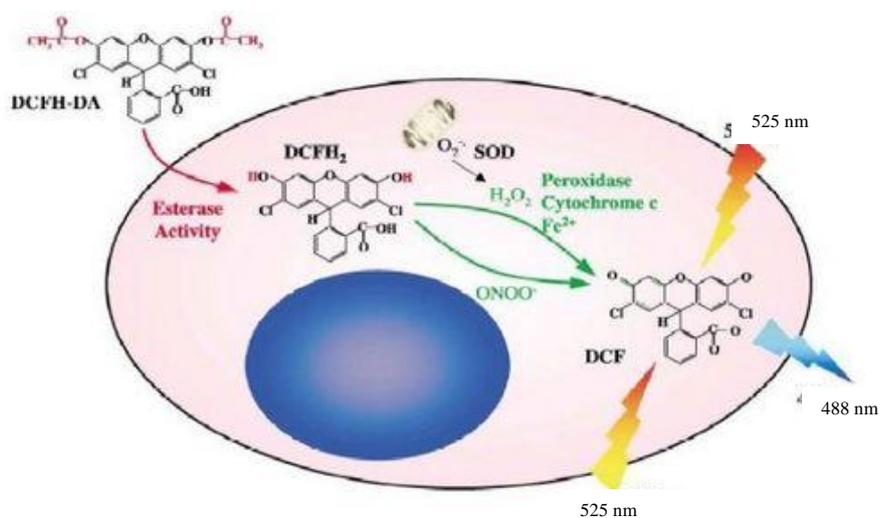


Figura 3. Esquema del proceso de marcaje con la sonda diclorofluoresceína (DCF). La sonda reducida y esterificada (DCFH₂-DA) atraviesa la membrana. Una vez dentro las esterasas la hidrolizan (DCFH₂) y los ROS intracelulares la oxidan para convertirla en DCF, que es la forma fluorescente.

Para detectar los niveles de ROS en primer lugar, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 150.000 células por pocillo en el caso de las líneas celulares A375, HepG2 y McA-RH7777 y de 200.000 células por pocillo en el caso de las líneas celulares HeLa, SK-HEP-1, Huh-7, PLC/PRF/5 y CHL y se mantuvieron en las condiciones descritas anteriormente. La viabilidad celular se



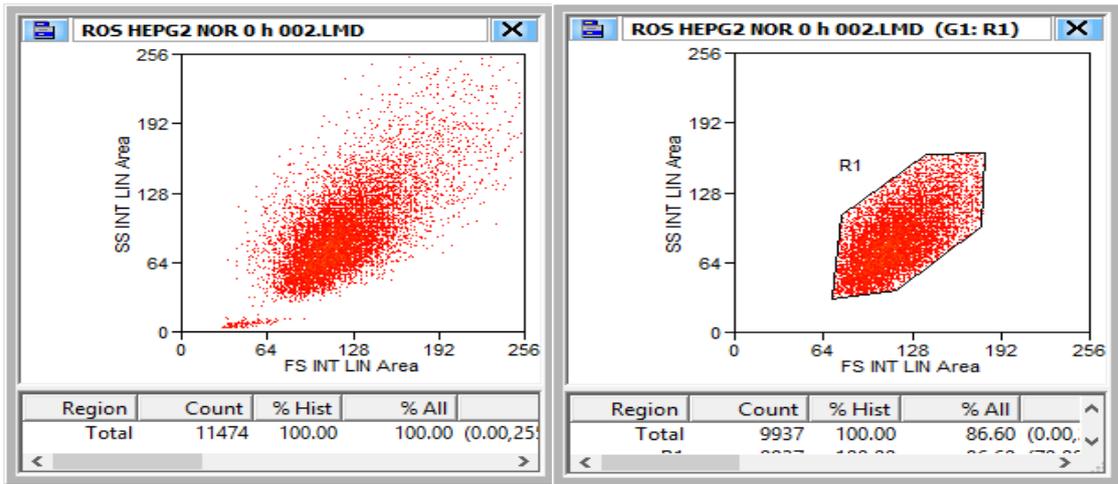
Figura 4. Placa de 6 pocillos

determinó mediante el test de exclusión del azul Tripán (Kwok y cols, 2004). Todos los medios se acondicionaron a cada presión parcial de O_2 antes de ser utilizados en el procedimiento. Cuando la confluencia de las células alcanzó el 70-75% se reemplazó el medio de cultivo por medio de cultivo fresco sin suero (1,5 ml por pocillo). De esta forma se evita que el suero del medio interfiera con la sonda que se agregará posteriormente. Una hora después se añadió la sonda DCFH₂-DA (20 μ M) y las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, las células se lavaron con PBS, se levantaron con tripsina y se recogieron en PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino. La suspensión celular se depositó en tubos del citómetro que contenían 0,05 μ g de DAPI. La fluorescencia se determinó por citometría de flujo (λ_{em} = 525 nm y λ_{ex} = 488 nm) en el Servicio de Investigación General de la UPV (<http://www.ikerkuntza.ehu.es/p273-sgikerhm/en/>). Para medir la fluorescencia basal de las células se utilizaron controles a los que no se les añadió la sonda.

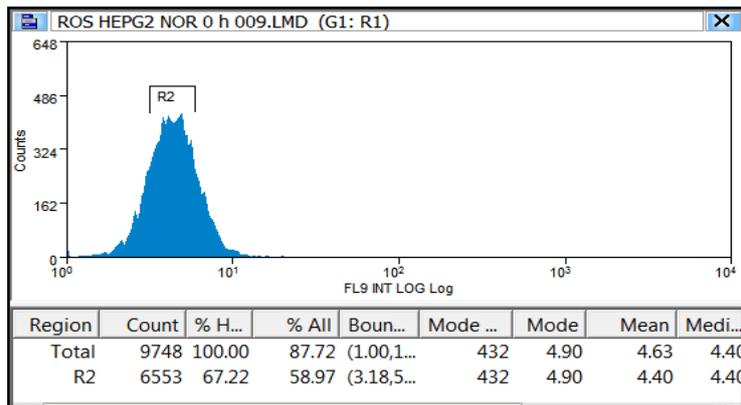
Los valores de ROS obtenidos en cada línea celular se normalizaron con los valores obtenidos en HepG2 (100%), línea celular que fue utilizada en cada experimento.

Para el análisis de los datos obtenidos mediante el citómetro se utilizó el programa Summit v4.3. Con este programa se analizó primeramente la rugosidad/complejidad de las células (eje y) frente al tamaño de las mismas (eje x) (Fig. 5A). La zona más poblada se señaló con un polígono para determinar únicamente la población celular a analizar. A continuación se excluyeron las células muertas. En la figura 5B se representa la población de células vivas que excluyeron el DAPI y mediante una barra se seleccionó la población celular a analizar. Finalmente se registró la fluorescencia media de la DCF de cada célula (Fig. 5C). El valor que se utilizó está representado como "mean".

A)



B)



C)

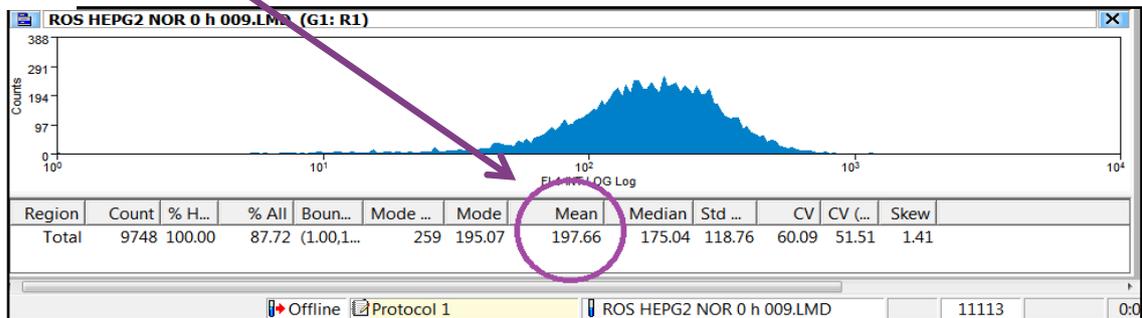


Figura 5. Gráficos obtenidos mediante el programa Summit v4.3 de citometría de flujo para HepG2.

Extracción y cuantificación de proteínas celulares

Las células se levantaron y se lisaron congelándolas en N_2 y descongelándolas (3 veces). Se centrifugaron 2 minutos a 200 g y a 4 °C. Se descartó el precipitado y se recogieron los sobrenadantes de distintos cultivos celulares hasta conseguir la cantidad suficiente para realizar los ensayos enzimáticos. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a 595 nm mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

Actividad SOD

La actividad SOD se determinó mediante el método indirecto del NBT (Fig. 6) (Zhou y cols, 2006). Este método utiliza el sistema xantina-xantina oxidasa para generar anión superóxido. El anión superóxido reduce el NBT convirtiéndolo en NBT-diformazán. Esta forma reducida presenta un color azul, registrándose la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro. A medida que la actividad SOD aumenta la formación de NBT-diformazán disminuye ya que en presencia de SOD el O_2^- se convierte en H_2O_2 y O_2 , en lugar de reducir al NBT.

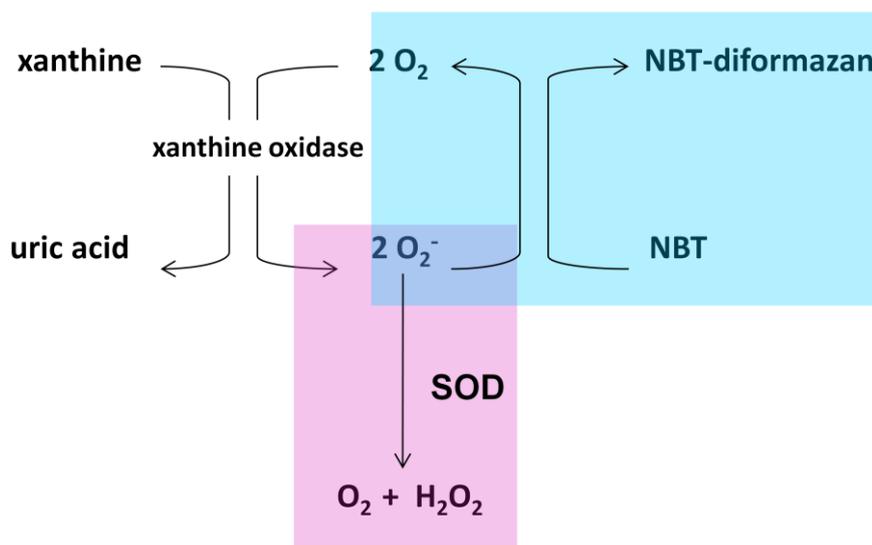


Figura 6. Esquema del método indirecto utilizado para determinar la actividad superóxido dismutasa (SOD). El sistema xantina-xantina oxidasa produce el anión superóxido (O_2^-) que reduce al NBT o se dismuta para dar O_2 y H_2O_2 .

El método se adaptó a placas de 96 pocillos. Se utilizaron cantidades crecientes de proteína celular y se determinó la absorbancia frente al tiempo de incubación. La reacción se inició al añadir el NBT (60 μ M) en un volumen final de 275 μ l. El aumento de absorbancia se determinó cada 60 segundos durante 15 minutos a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C. Se calculó la pendiente de la recta para cada concentración de proteína, determinándose el % de inhibición respecto a un control sin proteína. Para obtener el IC_{50} de la muestra (cantidad de proteína necesaria para inhibir un 50% la formación de NBT-diformazán) se representó el % de inhibición frente a la concentración de proteína y se ajustaron las gráficas a curvas semilogarítmicas, como se indica en la figura 7.

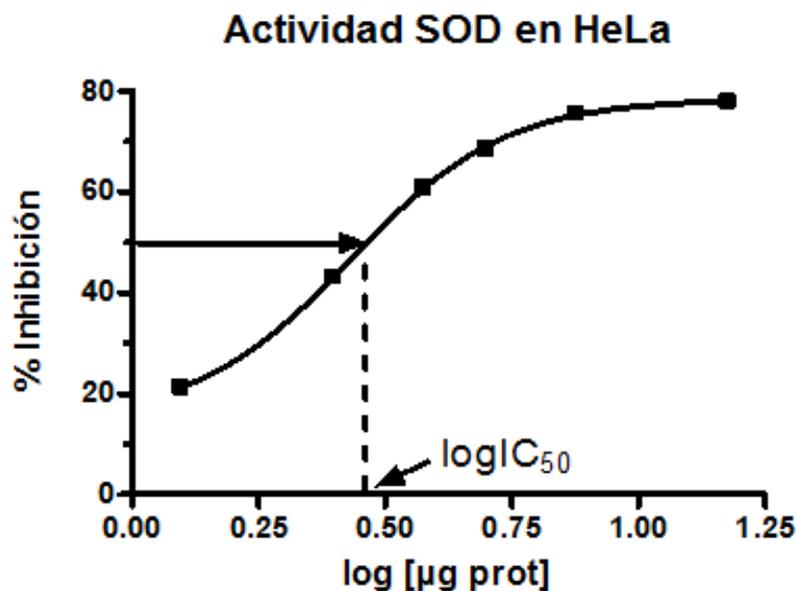


Figura 7. Curva dosis-respuesta de la actividad SOD en HeLa.

Se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de SOD comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Las representaciones se ajustaron a curvas semilogarítmicas, determinándose el IC_{50} para el patrón (unidades de SOD) (Fig. 8).

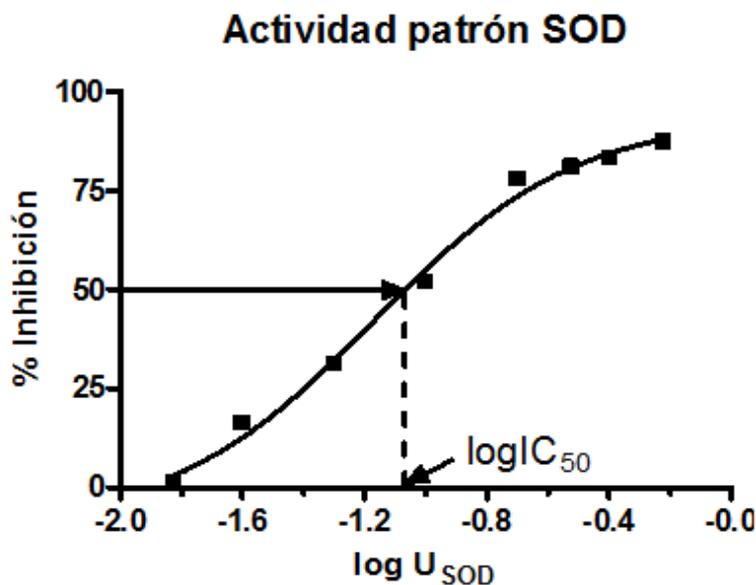


Figura 8. Curva dosis-respuesta de la actividad para el patrón de SOD.

A partir de los valores de IC_{50} de la muestra e interpolando éstos en la curva patrón, la actividad SOD de la muestra se expresó en unidades de SOD por mg de proteína celular.

Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media \pm error estándar (ES) de al menos 3 experimentos independientes. Para el análisis de las comparaciones de las variables en dos condiciones de pO_2 , se utilizó el test de la t de Student para muestras pareadas. Para la comparación de las variables entre las diferentes líneas celulares se utilizó el análisis de ANOVA de un factor y el test *post hoc* de Bonferroni. Ambos análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS 19.0. Los resultados se han considerado significativos para un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En la figura 9 se muestran los niveles intracelulares estacionarios de ROS para las diferentes líneas celulares determinados a la pO_2 del 21%. Se observan diferencias significativas que dependen de la línea celular. Así, la línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa presenta los valores basales de ROS más bajos, mientras que las líneas celulares de hepatocarcinoma humano SK-HEP-1 y PLC/PRF/5 muestran los niveles más altos; en el caso de PLC/PRF/5 la cantidad de ROS fue significativamente superior a la de la mayoría de las líneas celulares. Las líneas de hepatoma humano HepG2, Huh-7 y CHL tuvieron unos niveles estacionarios de ROS similares e intermedios. La línea de hepatoma de rata mostró unos niveles de ROS significativamente inferiores a los de HepG2, SK-HEP-1 y PLC/PRF/5.

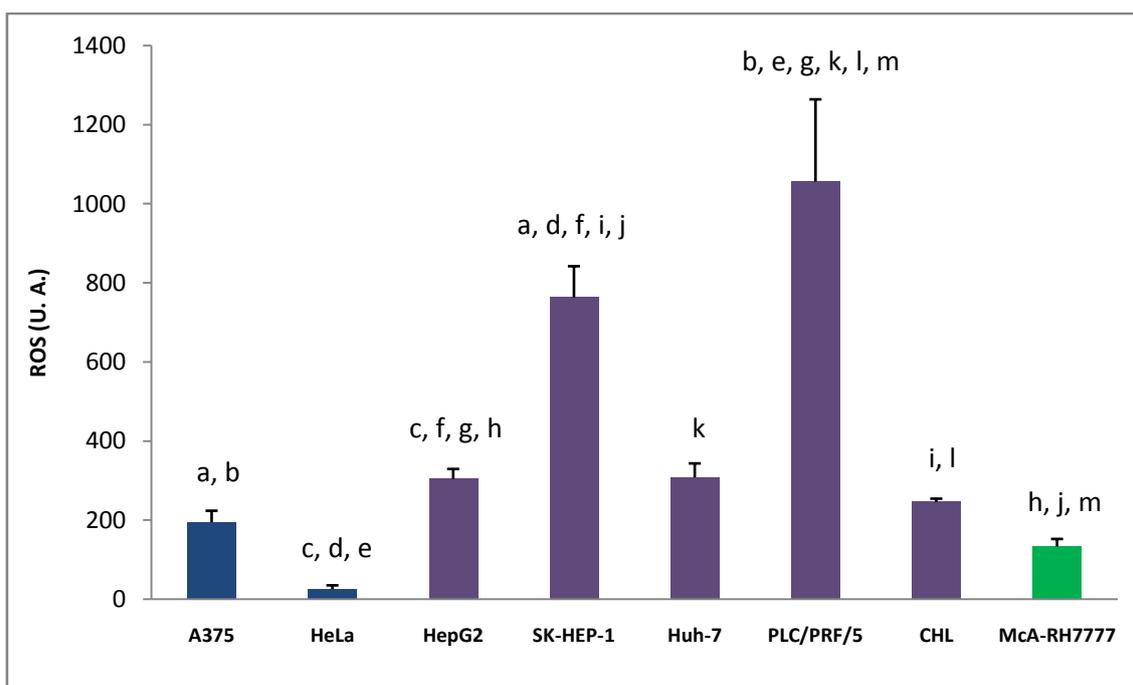


Figura 9. Niveles estacionarios de ROS en las distintas líneas celulares tumorales. Los niveles de ROS fueron determinados a una pO_2 del 21%. Los resultados se expresan como la media \pm ES de 4-7 experimentos independientes. Las líneas celulares que tienen la misma letra, presentan cambios estadísticamente significativos. ^{a, g, i} $p < 0,05$; ^{h, j, k} $p < 0,01$; ^{b, c, d, e, f, l, m} $p < 0,001$, por ANOVA de un factor y el test *post hoc* de Bonferroni. U. A. (unidades arbitrarias).

En la figura 10 se representa el efecto de la pO_2 sobre los niveles intracelulares de ROS en las diferentes líneas celulares. Se observa que A375, SK-HEP-1, Huh-7 y McA-RH7777 a la pO_2 del 8% tienen niveles estacionarios de ROS significativamente inferiores a los detectados a la pO_2 del 21%. La pO_2 no alteró los niveles de ROS en el resto de las líneas celulares estudiadas.

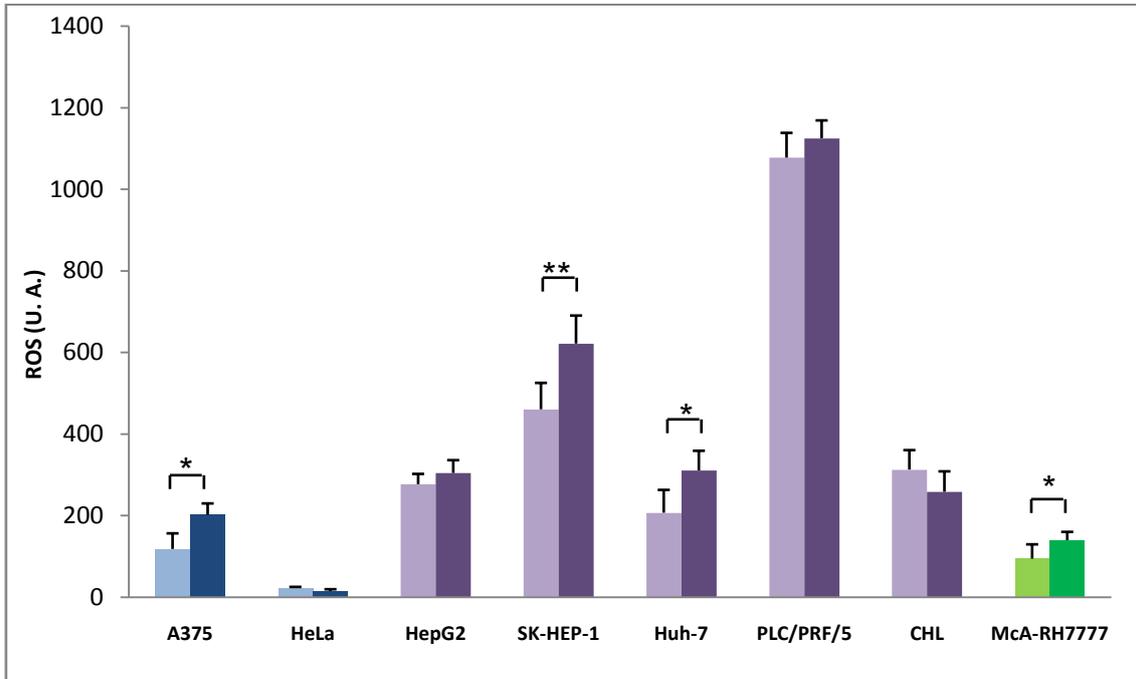


Figura 10. Efecto de la pO_2 sobre los niveles estacionarios de ROS en las distintas líneas celulares tumorales. Los niveles de ROS fueron determinados a una pO_2 del 8% (colores claros) y del 21% (colores oscuros). Los resultados se expresan como la media \pm ES de 4-7 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $P < 0,001$, por el test de la t de Student para datos pareados. U.A. (unidades arbitrarias).

En la figura 11 se muestra la actividad SOD basal en las diferentes líneas celulares obtenida a la pO_2 del 21%. La actividad varió dependiendo de la línea celular. Así, la actividad SOD en las líneas celulares de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5 y CHL fue significativamente mayor que la actividad detectada en HepG2, que presentó los valores mínimos.

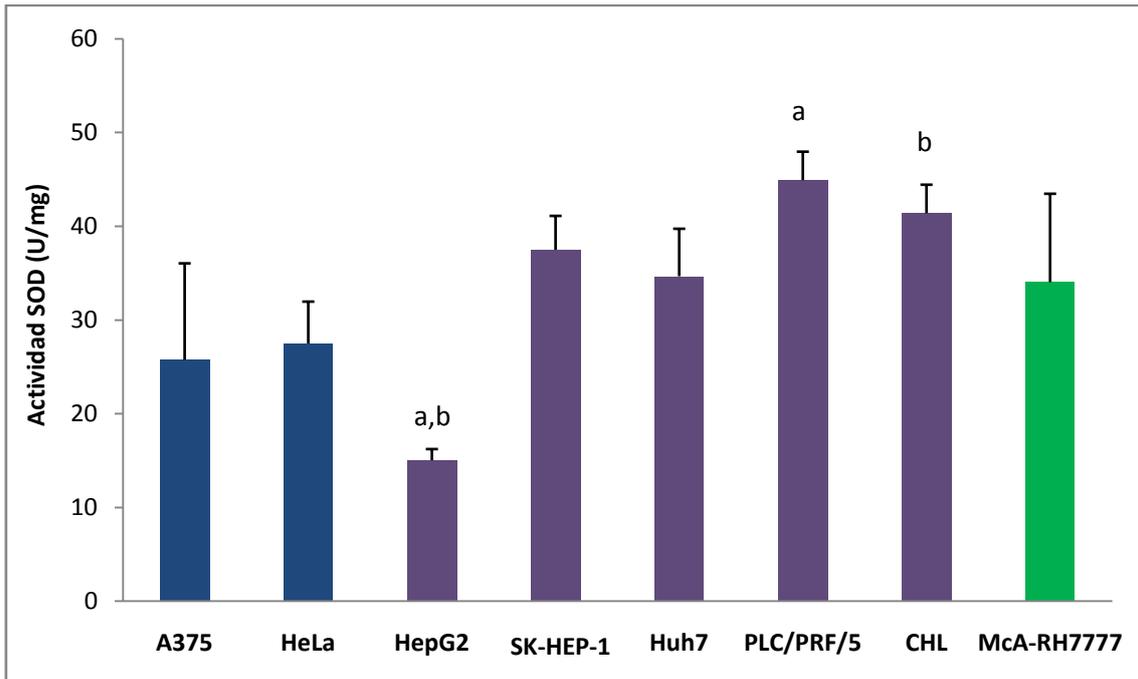


Figura 11. Actividad SOD en las distintas líneas celulares tumorales. La actividad de SOD fue determinada a una pO_2 del 21%. Los resultados se expresan como la media \pm ES de 4 experimentos independientes. Las líneas celulares con la misma letra presentan cambios estadísticamente significativos. ^{a,b} $p < 0,05$, por el test de la t de Student para datos pareados.

La presión parcial de oxígeno modificó la actividad SOD basal en función de la línea celular (Fig. 12). En las líneas celulares de hepatoma humano PLC/PRF/5 y CHL la actividad SOD a la pO_2 del 8% fue significativamente menor que la detectada en condiciones de pO_2 del 21%. Sin embargo, en HepG2 el comportamiento fue opuesto, ya que la actividad SOD fue significativamente mayor a la pO_2 del 8%. En el resto de las líneas tumorales la pO_2 no afectó a la actividad SOD.

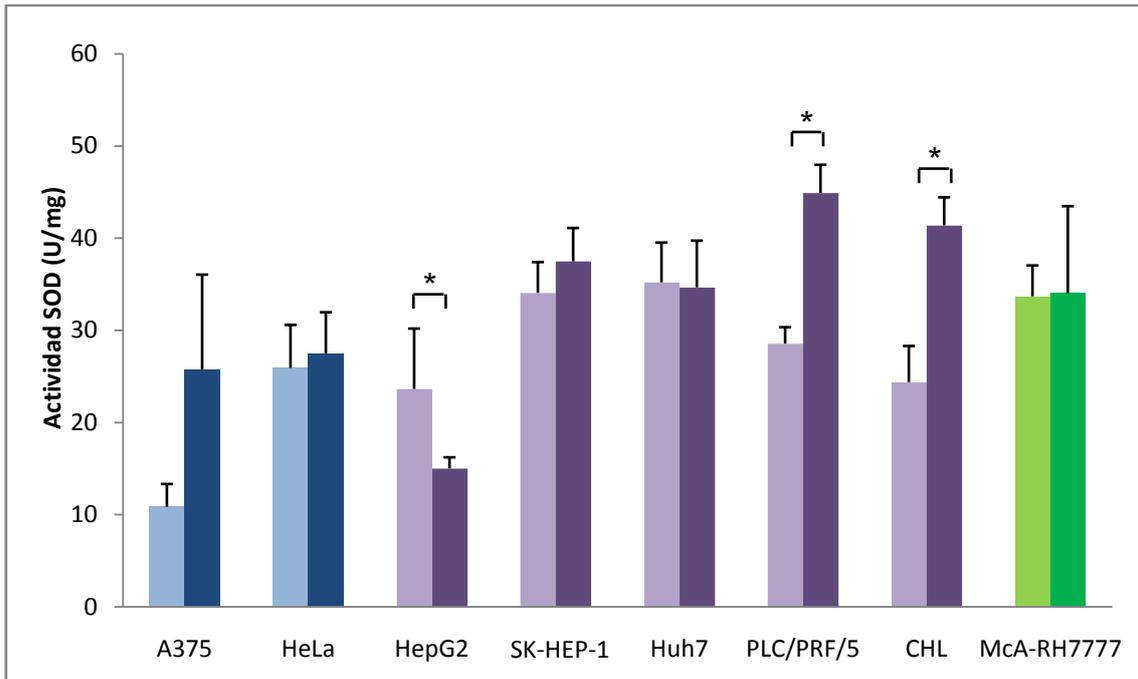


Figura 12. Efecto de la pO₂ sobre la actividad SOD en las distintas líneas celulares tumorales. La actividad SOD se determinó a una pO₂ del 8% (colores claros) y del 21% (colores oscuros). Los resultados se expresan como la media ± ES de 4 experimentos independientes. * p < 0,05, por el test de la *t* de Student para datos pareados.

DISCUSIÓN

Aunque los organismos se han adaptado a una pO_2 atmosférica del 21%, debido a su difusión limitada en los tejidos y al consumo de O_2 celular, la pO_2 intracelular podría ser próxima a un 2% e incluso menor en los tejidos metabólicamente activos (Ward, 2008). En este trabajo se han utilizado dos condiciones de pO_2 : 21% y 8%. Aunque las células se mantengan y crezcan en estas condiciones, es difícil estimar la concentración real intracelular de O_2 y no hemos encontrado en la bibliografía referencias a este respecto. Existen estudios con líneas celulares en los que se han utilizado condiciones de pO_2 bajas en el rango de 1% al 8% (Na y cols 2010; Simiantonaki y cols. 2008).

En este estudio hemos visto que la presión parcial de O_2 provoca cambios en la concentración basal de ROS y en la actividad SOD dependiendo de la línea celular. La respuesta diferenciada a la pO_2 podría deberse a las diferencias en el genotipo y en los perfiles de expresión génica entre las distintas células cancerosas, lo que origina la respuesta final. Así, hemos utilizado líneas celulares tumorales de tejidos diferentes: piel, cuello de útero e hígado. Cuando utilizamos células del mismo linaje (hígado) también observamos diferencias en los parámetros analizados. En estudios de proteómica se ha descrito que existen diferencias en las de proteínas específicas secretadas por HepG2, SK-HEP1 y Huh-7, líneas que hemos utilizado en este trabajo (Knowles y col. 2001; Sun y cols. 2008).

Respecto a los niveles intracelulares de ROS, en aquellas líneas celulares en las que se vieron diferencias significativas la pO_2 del 8% provocó un descenso en todos los casos. Este cambio puede deberse bien a una disminución de la producción de ROS o a un aumento de su eliminación.

En la formación de ROS están implicados varios sistemas enzimáticos, además de la cadena respiratoria mitocondrial, que es la principal fuente generadora de ROS. Así, un descenso en los niveles de O_2 podría disminuir la producción de O_2^- . Además, se ha descrito que las células tumorales muestran una velocidad de glucólisis muy alta, siendo esta ruta la que les aporta gran parte de la energía que necesitan para desarrollar sus funciones y proliferar (Chen y cols. 2007), por lo que el flujo de electrones por la cadena respiratoria estaría disminuido.

Los cambios en la actividad SOD que hemos observado al variar la concentración de O_2 no se correlacionan con los obtenidos para ROS. En la eliminación de ROS, además de la SOD, que transforma el O_2^- en H_2O_2 , intervienen otros enzimas antioxidantes que transforman el H_2O_2 en H_2O , como la catalasa y la glutatión peroxidasa. Desconocemos el efecto de la pO_2 sobre las

actividades de estas enzimas. Por ello, para comprender el efecto de la concentración de O_2 sobre los niveles intracelulares de ROS es necesario analizar las actividades de estas enzimas, además de determinar la concentración intracelular de GSH, que actúa como sustrato de la glutatión peroxidasa.

Por otra parte, desconocemos si los niveles de proteína SOD varían en aquellas líneas celulares en las que no hemos visto efecto de la pO_2 sobre la actividad enzimática. Podría ocurrir que estando disminuidos los niveles proteicos de SOD, la actividad estuviera aumentada.

CONCLUSIONES

- En el estado basal los niveles intracelulares de ROS varían dependiendo de la línea celular tumoral, siendo mínimos en la línea de cuello de útero humana HeLa y máximos en las líneas de hepatoma humano SK-HEP-1 y PLC/PRF/5.
- Un descenso de la presión parcial de oxígeno del 21% al 8% disminuye los niveles intracelulares de ROS en las líneas celulares A375, SK-HEP-1, Huh-7 y McA-RH7777, sin alterarlos en HeLa, HepG2, PLC/PRF/5 y CHL.
- La actividad SOD basal varía dependiendo de la línea celular tumoral, siendo mínima en HepG2 y máxima en PLC/PRF/5 y CHL, líneas procedentes de hepatomas humanos.
- La presión parcial de oxígeno afecta de manera diferente a la actividad SOD en función de la línea celular. Así, un descenso del 21% al 8% disminuye la actividad SOD en las líneas PLC/PRF/5 y CHL, la aumenta en HepG2 y no la modifica en A375, HeLa, SK-HEP-1, Huh-7 y McA-RH7777.
- De las conclusiones anteriores se sugiere que al disminuir la pO_2 del 21% al 8% los cambios que tienen lugar en la concentración de ROS en las distintas líneas celulares son independientes de los cambios en la actividad SOD.

IMPORTANCIA DEL TRABAJO Y FUTURAS INVESTIGACIONES

Como se ha indicado en los objetivos, los estudios realizados hasta el momento en esta línea de investigación del grupo se han llevado a cabo en condiciones de pO_2 del 21%. En este trabajo hemos utilizado una concentración de O_2 menor (8%) y hemos visto diferencias significativas en los parámetros analizados, dependientes del tipo y de la línea celular. La utilización de esta concentración de oxígeno supone una aproximación a unas condiciones de pO_2 más fisiológicas y abre un aspecto a tener en cuenta sobre la función reguladora que ejerce el O_2 sobre la homeostasis redox y posiblemente sobre el metabolismo y la señalización celular. Quedaría por comprobar si las células no tumorales del mismo linaje que las utilizadas en este trabajo responden de igual forma a la pO_2 o si tienen otros mecanismos reguladores de los niveles de ROS.

Para un mejor análisis del efecto que ejerce la pO_2 sobre los niveles basales de ROS, tanto en células tumorales como en células no transformadas, es necesario tener en cuenta los resultados relacionados con las actividades de enzimas antioxidantes, como catalasa y glutatión peroxidasa, que catalizan reacciones de eliminación del H_2O_2 , y con los niveles intracelulares de GSH. Parte de estos estudios los están llevando a cabo otros compañeros del grupo de investigación. Teniendo en cuenta estos resultados y utilizando concentraciones menores de oxígeno podrán extraerse conclusiones finales del estudio.

Por otra parte, el oxígeno podría regular la expresión de genes antioxidantes a distintos niveles (RNA, proteína y actividad). Durante este tiempo he extraído además RNA de las 8 líneas celulares utilizadas en las dos condiciones de pO_2 para posteriormente analizar, mediante RT-qPCR, la expresión génica de enzimas antioxidantes y poder relacionarla así con la cantidad de estos enzimas determinada mediante transferencia Western en nuestro laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A Rosaura Navarro y M^a Begoña Ruiz, mis directoras del trabajo, por ayudarme y aconsejarme en todo momento.

A José Ignacio Ruiz por haberme guiado en cada uno de los experimento realizados en el laboratorio.

A Jenifer Trepiana por haberme ayudado con dudas y problemas que me hayan surgido.

A Susana Meijide por haberme enseñado el método de determinación de SOD.

A Adrián Castillo por haber colaborado en el mantenimiento celular.

A Oihana Lopez de Vergara por haberme enseñado el método de extracción y cuantificación de RNA.

En general, a todos los participantes de mi grupo de investigación (y al resto del laboratorio) por haber hecho que la estancia estos meses haya sido muy amena y fructífera.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Gubory K, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1634-1650 (2010).
- Bradford Mn. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem*; 72:248-254 (1976).
- Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouysséhur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 85:1301-1307 (2007).
- Brown J.M. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanism and therapeutic strategies. *Mol Med Today*. 6:157-162 (2000).
- Brüne B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death and Differ*. 10:864-869 (2003).
- Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr*. 39:267-274 (2007).
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J* 17:1195-214 (2003).
- Giaccia A.J. Hypoxic stress proteins: survival of the fittest. *Semin Radiat Oncol* 6:46-58 (1996).
- Giordo R, Cossu A, Pasciu V, Hoa PT, Posadino AM, Pintus G. Different Redox Response Elicited by Naturally Occurring Antioxidants in Human Endothelial Cells. *BJM Open* 7:44-53 (2013).
- Guthrie H.D, Welch G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 84:2089-2100 (2006).
- Kietzmann T, Görlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Devel Biol* 16:474-486 (2005).
- Knowles B.B, Howe C.C, Aden D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209:497-499 (2001).
- Kwok A.K.H, Yeung C-K, Lai T.Y.Y, Chan K-P, Pang C.P. Effects of trypan blue on cell viability and gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 88:1590-1594 (2004).
- Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Izawa Y, Kanematsu Y. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol Sin* 25: 977-985 (2004).
- Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 674:137-147 (2009).

- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361-70 (2000).
- Moulder J.E, Rockwell S. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 5:313-341 (1987).
- Na N, Chandel N.S, Litvan J, Ridge K.M. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxia-induced degradation of keratin intermediate filaments. *FASEB J.* 24:799-809 (2010).
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 49:1603–1616 (2010).
- Riva C, Chauvin C, Pison C. Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis. *Anticancer Res* 18:4729-4736 (1998).
- Ryan H.E, Poloni M, McNulty W. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* 60:4010-4015 (2000).
- Simiantonaki N, Jayasinghe C, Michel-Schmidt R, Peters K, Hermanns M.I, Kirkpatrick C.J. Hypoxia-induced epithelial VEGF-C/VEGFR-3 upregulation in carcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 32:585-92 (2008).
- Sun Y, Mi W, Cai J, Ying W, Liu F, Lu H, Qiao Y, Jia W, Bi X, Lu N, Liu S, Qian X, Zhao X. Quantitative proteomic signature of liver cancer cells: tissue transglutaminase 2 could be a novel protein candidate of human hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 7:3847–3859 (2008).
- Taverne Y, Bogers Ad J. J., Duncker D, Merkus D. Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System. *Hindawi Publis Corp* (2013).
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40 (2006).
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49:6449-6465 (1989).
- Zangar R, Davydov D, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxico App Pharmaco* 199. 316-331 (2004).
- Zhou JY, Prognon P. Raw material enzymatic activity determination: a specific case for validation and comparison of analytical methods – the example of superoxide dismutase (SOD). *J Pharm Biomed Anal* 40:1143-8 (2006).