

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



"IMPLEMENTACION DE UN MODELO *In vitro* DE CANCER QUE
PERMITA EVALUAR SIMULTANEAMENTE EL EFECTO DE
ESTRES (hipoxia Y pH) Y EL SILENCIAMIENTO DE GENES"

P O R

M.C. GEOVANA CALVO ANGUIANO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

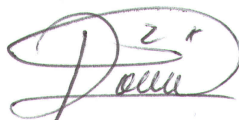
ENERO, 2018

"Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes"

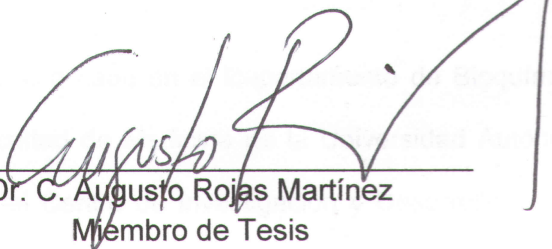
Aprobación de Tesis:



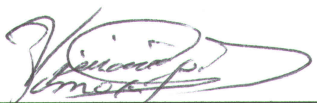
Dr. C. Alberto Camacho Morales
Director de Tesis



Dra. C. Rocío Ortiz López
Co-Directora de Tesis



Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Miembro de Tesis



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Miembro de Tesis



Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández
Miembro de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Este proyecto se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud en la Unidad de Genómica de esta misma Universidad.

Índice

	Página
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vi
Abreviaturas	viii
Resumen	x
Capítulo 1	
Introducción	1
Capítulo 2	
Antecedentes	2
2.1 Microambiente tumoral	2
2.2 Hipoxia	3
2.3 Genes blanco de <i>HIF1α</i>	5
2.4 Acidosis	11
2.5 Modelos de hipoxia	12
2.6 Modelos de acidez	17
2.7 Metabolismo celular tumoral	17
2.8 Mutaciones en genes de la Mitocondria	18
Capítulo 3	
Justificación	21
Capítulo 4	
Hipótesis	22
Capítulo 5	
Objetivos	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos específicos	23
Capítulo 6	
Material y Métodos	24
6.1 Estrategia general	24
6.2 Material	25
6.2.1 Reactivos	25
6.2.2 Material Biológico	27
6.2.3 Equipo	27
6.2.4 Programas computacionales	29
6.3 Métodos	
6.3.1 Cultivo celular	30
6.3.2 Conteo celular con Azul de Tripano y siembra en placa	30
6.3.3 Inducción de hipoxia	31
6.3.4 Determinar número de células y rendimiento de	32

extracción de RNA	
6.3.5 Ensayo de Acidosis	33
6.3.6 Extracción de RNA	34
6.3.7 Retrotranscripción	34
6.3.8 PCR Cuantitativa	35
5.3.9 Western Blot	35
6.3.10 Silenciamiento de oncogenes y genes supresores de tumor	38
6.3.11 Microarreglos de expresión génica	41
Capítulo 7	
Resultados	
7.1 Descripción general de la línea celular de cáncer de colon	42
7.2 Estandarización de oligonucleótidos para la evaluación de los modelos de estrés (hipoxia y acidosis)	42
7.3 Evaluación de la expresión de genes blanco de HIF1 α en los modelos de hipoxia	45
7.4 Efecto del pH en la expresión de genes en los modelos de inducción a hipoxia	46
7.5 Ensayos de viabilidad en ambos modelos de hipoxia	47
7.6 Evaluación de la apoptosis en los dos modelos de hipoxia	51
7.7 Evaluación de la viabilidad y apoptosis en el modelo de acidosis	52
7.8 Evaluación de la viabilidad y apoptosis en los modelos de estrés	54
7.9 <i>Western Blot</i>	56
7.10 Silenciamiento de oncogenes y genes supresores de tumor	57
7.11 Análisis de microarreglos de expresión génica	57
7.12 Análisis de filtrado con enriquecimiento estadístico	61
7.13 Búsqueda de función molecular y participación en procesos biológicos	63
7.14 Análisis ontológico	65
Capítulo 8	
Discusión	72
Capítulo 9	
Conclusiones	79
Capítulo 10	

Anexos	81
Anexo 1	81
Anexo 2	98
Capítulo 11	
Referencias	106

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Genes blanco de HIF	6
Tabla 2. Agentes miméticos de hipoxia	16
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la qPCR.	37
Tabla 4. Función molecular de genes de la firma génica obtenida por microarreglos de expresión.	56

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Esquema del mecanismo de la proteína HIF1 α	7
Figura 2. Esquema de progresión tumoral	8
Figura 3. Desregulación de la glucólisis y la regulación de pH	10
Figura 4. Esquema del efecto de pH en la célula tumoral	12
Figura 5. Cámara de hipoxia (foto tomada del laboratorio de UG-CIDICS)	15
Figura 6. Diagrama de la estrategia general	24
Figura 7. Mecanismo de CoCl ₂ .	32
Figura 8. Perfil genético de la línea celular CaCo-2	43
Figura 9. Estandarización de los oligonucleótidos empleados en qPCR (gen VEGF)	44
Figura 10. Cuantificación relativa a nivel transcripcional de genes blanco de <i>HIF1α</i> en los modelos de hipoxia.	48
Figura 11. Cuantificación relativa a nivel transcripcional de genes sensibles a hipoxia en el modelo de acidosis	49
Figura 12. Viabilidad celular en los modelos de inducción de hipoxia	50
Figura 13. Evaluación de apoptosis en los modelos de hipoxia	52
Figura 14. Evaluación de viabilidad y apoptosis en el ensayo de Acidosis.	53
Figura 15. Evaluación de viabilidad y apoptosis en los modelos de estrés (hipoxia y acidez)	55
Figura 16. <i>Western Blot</i>	56
Figura 17. Verificación de la calidad e integridad de las muestras de RNA	58
Figura 18. Análisis de expresión del silenciamiento génico dirigido contra los genes <i>KRAS</i> , <i>APC</i> , <i>Myc</i> y <i>P53</i>	59
Figura 19. Perfil de expresión génica diferencial	60

Figura 20. Perfil de expresión génica del modelo de estrés y silenciamiento	62
Figura 21. Procesos biológicos con participación de los genes diferencialmente expresados	64
Figura 22. Resultado de análisis de función molecular de los genes diferencialmente expresados	64
Figura 23. Diagrama de venn	66
Figura 24. Mapa de calor de la firma génica obtenida	67
Figura 25. Diagrama del análisis ontológico de genes con participación en diferentes vías metabólicas	70
Figura 26. Esquema de integración de resultados	71

Abreviaturas

ROS	Especies reactivas de oxígeno
HIF1α	Factor inducible por hipoxia
VHL	von Hippel-Lindau
FIH	Inhibidor del factor HIF
ARNT	Translocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburos Arilo
HRES	Elementos de respuesta a hipoxia
PHD	Dominio Prolil Hidroxilasa
CaCo-2	Adenocarcinoma Colorectal
EPO	Eritropoyetina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
LDH	Lactato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
Glut1	Transportador de glucosa 1
CA9	Anhidrasa carbónica
qPCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (
pH	Potencial de hidrogeno
Fe+2	Hierro
pHi	Potencial de hidrogeno intracelular
pHe	Potencial de hidrogeno extracelular
CoCl2	Cloruro de cobalto
RNAm	Acido Ribonucleico mensajero
mL	Mililitro
mM	milimolar
ng	Nanogramos
APC	Adenomatous polyposis coli
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
pM	Picomolar

mtDNA	Acido Desoxirribonucleico mitocondrial
AGCC	GeneChip Command Console Software
TAC	Transcriptome Analysis console
GORilla	Gene Ontology enRIchment anaLysis and visualizAtion tool
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
REVIGO	<u>re</u> duce + <u>vis</u> ualize <u>Gene</u> <u>ont</u> ology
NCBI	NAtional Center for Biotechnology Information
ATCC	American Type Culture Collection
SFB	suero fetal bovino
h	horas
MOPS	ácido 3-(<i>N</i> -morfolino) propanosulfónico
HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinoetanosulfónico
DEPC	Dietilpirocarbonato
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
RMA	Robust Multiarray Average
Hco	Hipoxia inducida con Cloruro de cobalto
Hca	Hipoxia inducida con cámara de gases

Resumen

MC. Geovana Calvo Anguiano

Fecha de Graduación: Enero, 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Medicina

Título del Estudio: "Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes"

Número de páginas: 117

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de Estudio: Cáncer

Introducción. El cáncer es una enfermedad que actualmente sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Sin embargo, se sabe que tanto los factores genéticos como el microambiente tienen un importante papel en el desarrollo o progresión del cáncer. La hipoxia y acidez son características importantes del microambiente, diversos estudios relacionados a hipoxia tumoral, utilizan modelos *in vitro*, de los cuales los más ampliamente descritos son dos: inducción mediante la disminución de oxígeno en la que se emplea una cámara sellada que contiene una mezcla de gases con niveles de oxígeno entre 1 y 2%, y otro es la utilización de agentes químicos como el cloruro de cobalto (CoCl₂). La utilización de modelos nos ayuda a elucidar los mecanismos de regulación de expresión de genes en las células tumorales, así como también para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. **Objetivo.** Identificar cambios en el metabolismo celular en respuesta al efecto combinado de estrés (hipoxia y acidez) y el silenciamiento de genes conductores de tumor, en un modelo *in vitro* de cáncer. **Material y Métodos.** Células CaCo-2 fueron incubadas en condiciones de normoxia e hipoxia (dos métodos inducción química e inducción por depleción de oxígeno) y modificando el pH del medio (pH 6.9, 6.7 y 6.5). Todos los ensayos se analizaron a diferentes tiempos (0,3, 6, 24, 48 y 72h). Se evaluó la expresión a nivel transcripcional de los genes *HIF1α*, *Glut 1*, *CA9*, *LDHA*, *EPO* y *VEGF* por qPCR comparando los niveles de expresión contra los de células en condiciones de normoxia y a nivel traduccional de las proteínas *HIF1α* y *Glut 1* por western blot. Se evaluó la proliferación celular y apoptosis en los modelos de hipoxia y acidez. Se realizaron ensayos de silenciamiento génico (*knockdown*) utilizando RNA de interferencia (iRNA) dirigido contra la los genes *KRAS*, *APC*, *Myc* y *P53* en condiciones normales y posteriormente inducidas a hipoxia. Se realizó un análisis de expresión génica global mediante la técnica de microarreglos de expresión en las diferentes condiciones. **Resultados.** Se implementaron dos modelos de estrés (hipoxia y acidez) evaluándose la expresión a nivel transcripcional de los genes *HIF1α*, *Glut 1*, *CA9*, *LDHA*, *EPO* y *VEGF* por qPCR. Además se realizó un análisis de expresión génica global mediante la técnica de microarreglos para determinar que genes son afectados al ser expuestos a la hipoxia y al cambio de pH. Se encontró un perfil génico de 16 genes altamente expresados que participan directa o indirectamente en vías de señalización como proliferación, supervivencia y apoptosis. Además de genes con actividad metabólica principalmente del metabolismo de lípidos, óxido reducción y procesos catabólicos. **Conclusión.** Los resultados sugieren que las células tumorales activan vías alternas (salvamento) para su supervivencia, principalmente la de metabolismo de lípidos.

Firma del director:


Dr. C. Alberto Camacho Morales

CAPÍTULO 1

Introducción

Cáncer es un término que se usa para definir enfermedades en las que las células se dividen anormalmente sin control y pueden invadir otros tejidos (Courtney et al., 2015).

Actualmente el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte, a pesar de los avances tecnológicos y los nuevos abordajes para identificar nuevos enfoques terapéuticos (Huber et al., 2010).

Estudios recientes demuestran que tanto los factores genéticos (mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumor) y factores del microambiente (hipoxia y acidosis) pueden regular el metabolismo glicolítico de las células cancerosas (Justus, Sanderlin, & Yang, 2015).

Las células cancerosas presentan una capacidad mejorada de la glucólisis en ausencia o incluso en presencia de oxígeno para apoyar el metabolismo mitocondrial. Este fenómeno fue descrito hace ya más de 80 años por Otto Warburg (Roland H. Wenger, 2005).

El cáncer es caracterizado por una alta heterogeneidad metabólica lo que ayuda a las células a sobrevivir y proliferar en condiciones del microambiente extremas, incluyendo hipoxia, una depleción progresiva de los recursos metabólicos y acidosis. A continuación describiremos las evidencias científicas que fundamentan el papel de la hipoxia y la acidosis en el desarrollo de cáncer.



CAPÍTULO 2

Antecedentes

2.1 Microambiente tumoral

Todos los organismos requieren el mantenimiento de la homeostasis fisiológica para sobrevivir (Iranon & Miller, 2012). En específico, durante el desarrollo del cáncer, se presenta un comportamiento maligno, lo que se ha asociado a la inestabilidad genómica, debido al gran número de mutaciones encontradas en las células tumorales, aunque las bases para la inestabilidad genética no se conocen con precisión (Bristow & Hill, 2008).

El crecimiento de los tumores sólidos no sólo es caracterizado por la proliferación descontrolada de las células, sino por los cambios en el microambiente tumoral. Una de las características del microambiente tumoral es la presencia de hipoxia, la cual ocurre por una insuficiencia de oxígeno en la vasculatura creciente del tumor (Supuran, 2011).

En los tumores sólidos las áreas con hipoxia generalmente tienen un pH bajo y niveles bajos de glucosa y de otros nutrientes, asociado a diversas alteraciones en el metabolismo de las células tumorales (Toni Y. Reynolds, 1996). De esta manera, el estrés fisiológico asociado a la hipoxia en el microambiente tumoral se correlaciona con acidosis e incrementa la presión del fluido intersticial (Denko, 2008).



2.2 Hipoxia

El oxígeno desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de los seres vivos, este es requerido para el metabolismo aeróbico y para mantener el equilibrio de energía intracelular (Simon, 2004). En la naturaleza, la concentración normal de oxígeno en la atmósfera es de 21% (normoxia) (Abaci, Truitt, Luong, Drazer, & Gerech, 2010). La hipoxia se define como la reducción de los niveles normales de oxígeno (<5%) en los tejidos (Simon, 2004); mientras que la anoxia se presenta cuando los niveles de oxígeno son menores de 0.01% (Lenihan & Taylor, 2013). La hipoxia puede presentarse en diversas patologías como por ejemplo: la enfermedad vascular aguda y crónica, en la enfermedad pulmonar y en el cáncer, importantemente en el crecimiento de tumores solidos (Harris, 2002).

En condiciones normales, el mecanismo por el cual las células responden a la reducción en los niveles de oxígeno es a través del factor inducible por hipoxia (*HIF1 α*) (Pouyssegur, Dayan, & Mazure, 2006) el cual representa el mecanismo celular de adaptación más ampliamente estudiado (Chiche, Brahimi-Horn, & Pouyssegur, 2010).

HIF1 α es un heterodímero compuesto de una subunidad alfa y una subunidad beta (Weidemann & Johnson, 2008). Funciona como un regulador maestro de la respuesta homeostática celular y sistémica a la hipoxia mediante la activación de la transcripción de muchos genes, incluyendo los implicados en el



metabolismo energético, angiogénesis, apoptosis y otros genes cuyos productos proteicos aumentan el suministro de oxígeno o facilita la adaptación metabólica a la hipoxia (Figura 1) (Masoud & Li, 2015).

La hipoxia contribuye a la pérdida de estabilidad genómica a través del incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wilson & Hay, 2011).

En condiciones de normoxia *HIF1 α* es expresado constitutivamente y degradado en un periodo corto de tiempo (~ 5 minutos) (Ke & Costa, 2006). Molecularmente la identificación de *HIF1 α* para su degradación se produce por la hidroxilación de enzimas hidroxilasas dependientes de oxígeno (PDHs) sobre dos residuos de prolina (Pro402 y Pro654) esta reacción es catalizada por Fe (II), oxígeno y/o 2-oxoglutarato (Messineo et al., 2016; U. R. Jewell, 2001). Los residuos de prolina hidroxilados permiten la captura de *HIF1 α* por la proteína von Hippel-Lindau (pVHL), dando lugar a la ubiquitinación y posterior degradación proteasomal (Weidemann & Johnson, 2008).

Por lo contrario, en condiciones de hipoxia la proteína *HIF1 α* es regulada mediante una enzima denominada inhibidor del factor HIF1 α (FIH). En ausencia de hidroxilación se evita el reclutamiento de cofactores (CBP/p300) debida a la hipoxia, *HIF1 α* se acumula, se transloca al núcleo, y heterodimeriza con el Translocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburos Aro (ARNT) y se une con elementos de respuesta a hipoxia (HRES), elementos de promotores de DNA o potenciadores de genes diana (Gisele Höpfl, 2004).



2.3 Genes blanco de *HIF1 α*

Como se describió previamente, la hipoxia es un mecanismo de adaptación celular, que ocurre como un proceso de regulación celular, es mediado por el gen *HIF1 α* . El gen *HIF1 α* es un factor de transcripción que regula diferentes procesos celulares mediante la activación de la transcripción de muchos genes. Debido a que las células necesitan adaptarse a los cambios en el suministro de oxígeno, no sorprende encontrar una variedad significativa de genes blanco de *HIF1 α* .

HIF1 α activa la expresión de estos genes uniéndose a un HRE situado en sus regiones potenciadoras y promotoras (Gregg L. Semenza, 1991; Ke & Costa, 2006); algunos de los principales blancos de *HIF1 α* son *Glut1*, *LDH*, *EPO*, *VEGF* y *CA9* descritos ampliamente en diferentes trabajos (Schulze & Harris, 2012), sin embargo, los genes antes mencionados no son los únicos genes activados por *HIF1 α* . Se ha descrito ampliamente que *HIF1 α* controla la expresión de cientos de genes dependiendo del tipo celular (Görlach, 2009), aunque algunos autores estiman que quizás aproximadamente del 1 al 5% del genoma es regulado por *HIF1 α* (Zuo et al., 2016).

En algunos trabajos recientemente publicados se han reportado nuevos genes blanco que son sensibles a hipoxia (Tabla 1) y que también son afectados por la influencia de la acidez del microambiente tumoral (Sorensen et al., 2015).



Tabla 1. Genes blanco de *HIF1α*

Gen	Función	Referencia
Eritropoyetina (EPO) Transferrina (Tf) Receptor de transferrina (Tfr) Ceruloplasmin	Eritropoyesis (transportador de oxígeno)	(Harris, 2002)
Adrenomedulina angiopoyetina-2 cyclooxygenasa-2 endothelina-1 y 2 Factor de crecimiento de fibroblastos Factor de crecimiento transformante (TGF) Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)-A Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF receptor-1)	Angiogénesis	(Gordan, Thompson, & Simon, 2007)
Aldolasa-A Enolasa-1 Transportador de glucosa 1 (GLUT1) Hexoquinasa-1 y 2 Lactato deshidrogenasa-A Piruvato quinasa	Glucolisis	(Chiche et al., 2010)
Acetoacetyl CoA Adenilato kinasa-3 Aminopeptidasa-A Anidrasa carbonica 9 Tirosina hidroxilasa	Regulación de pH/Metabolismo	(Masoud & Li, 2015)
BNIP3 BNIP3L Bax Bcl-2	Apoptosis	(Sorensen et al., 2015)



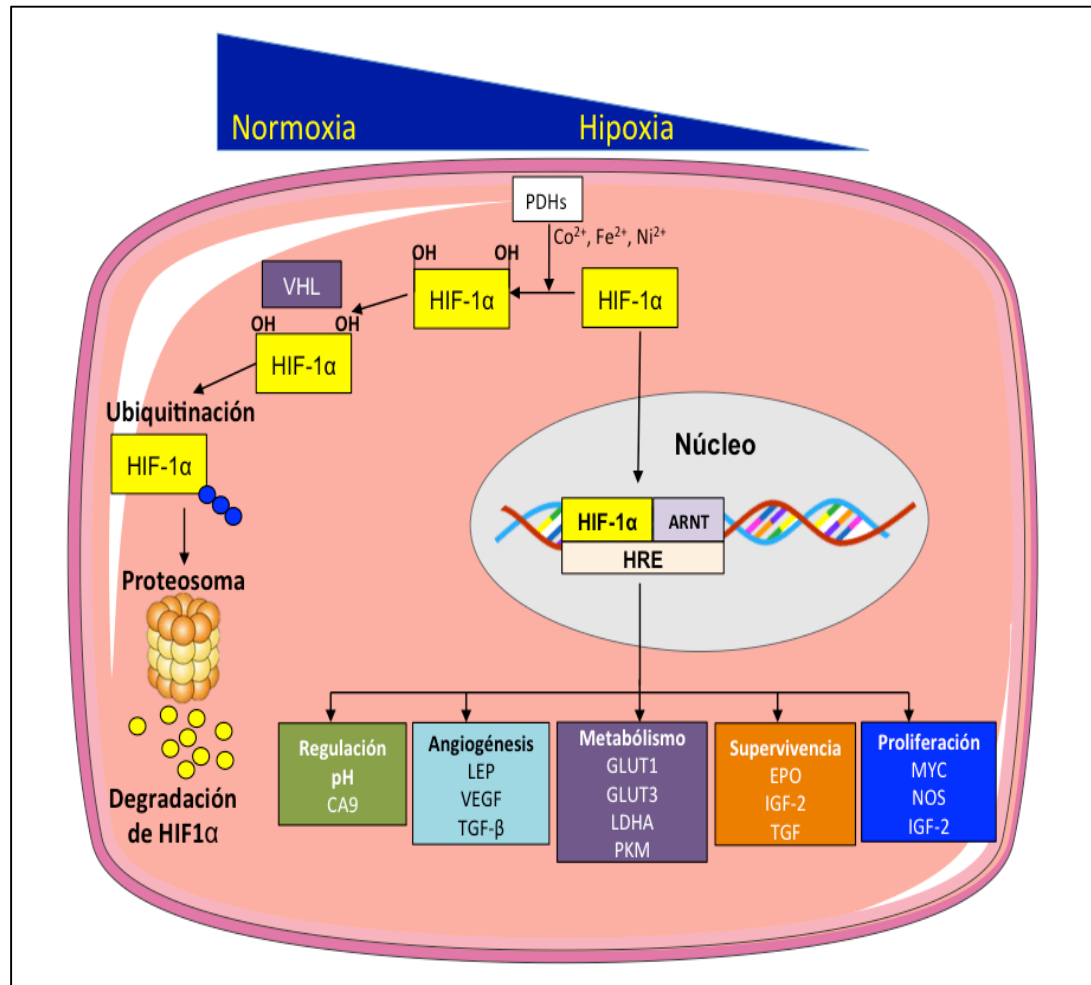


Figura 1. Esquema del mecanismo de la proteína *HIF1α*. El diagrama describe que en condiciones de normoxia (izquierda) *HIF1α* es hidroxilado en dos residuos de prolina mediante la prolil hidroxilasa (PDH) dependiente de oxígeno, 2-Oxoglutarato, y/o Fe^{+2} . Las proteínas hidroxiladas (*HIF1α*) se unen al complejo E3 ubiquitina ligasa y proteína von Hippel–Lindau (VHL), lo que conduce a su degradación por el proteasoma. Mientras que en el caso contrario (hipoxia), la actividad de los PHD se inhibe debido a la falta de oxígeno, por lo que no ocurre la hidroxilación y no hay unión con la proteína VHL, *HIF1α* se sobreexpresa, se estabiliza y se trasloca al núcleo, en donde actúa como un factor de transcripción capaz de activar diversos genes blanco relacionados con la supervivencia celular.

La hipoxia puede ser inducida o mediada por cambios en el proteoma del estroma celular y células neoplásicas o bien por el genoma de células neoplásicas inestables genéticamente lo que podría explicar el hecho de la desregulación de la oxigenación del tumor que esta asociado con la progresión tumoral (Michael Höckel, 2001).

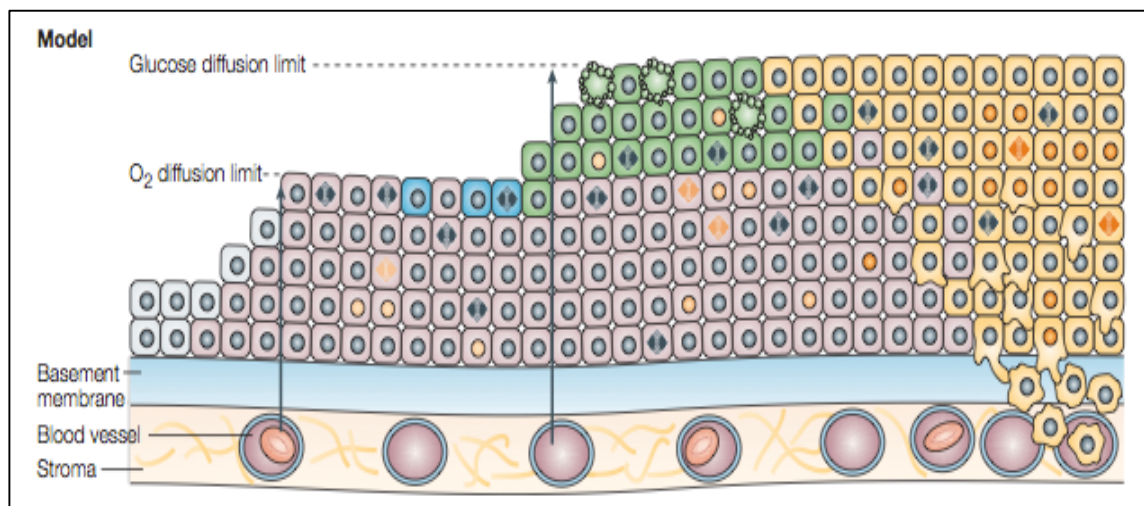


Figura 2. Esquema de progresión tumoral (Gillies, 2004). La hipoxia es una característica de los tumores sólidos que resulta de una disminución de los niveles de oxígeno y nutrientes (glucosa), ayuda a la generación de mutaciones dando como consecuencia un desarrollo tumoral y metástasis.

La hipoxia persistente o cíclica ejerce posteriormente presión de selección que conduce a una regulación positiva constitutiva de la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno (Schwab, 2009). Esta regulación positiva constitutiva puede ocurrir a través de mutaciones o cambios epigenéticos tales como la alteración en los patrones de metilación de los promotores.

Las consecuencias del aumento de la glucólisis requieren mayor adaptación a ambientes ácidos y bajas concentraciones de glucosa. Tratándose de una secuencia evolutiva crucial en el desarrollo de cáncer invasivo. En primer lugar, se traduce en un fenotipo con una poderosa ventaja proliferativa, ya que, a través de la glicolisis aeróbica persistente, es capaz de alterar el microambiente local de una manera que es inofensiva para sí mismo, pero fatal para las poblaciones competidoras. En segundo lugar, la acidificación del microambiente facilita la invasión tumoral tanto a través de la destrucción de poblaciones normales adyacentes como a través de la degradación inducida por ácido de la matriz extracelular y la promoción de la angiogénesis (Gatenby et al., 2007). Esto ha llevado a la hipótesis de que la adaptación de la hipoxia y la acidosis son pasos necesarios en la fase posterior de la secuencia de carcinogénesis (Figura 2).

Las alteraciones metabólicas se han observado en muchos tipos de cáncer, incluyendo tumores sólidos y neoplasias hematológicas (Pelicano et al., 2006). Las células de cáncer a diferencia de las células normales son capaces de vivir en el ambiente ácido que se desarrolla como una consecuencia de la producción de ácido láctico y muchas enzimas glicolíticas (*LDHA*, *PDK1*, etc.) son sensibles al pH (Figura 3) (Otto Warburg, 1926).



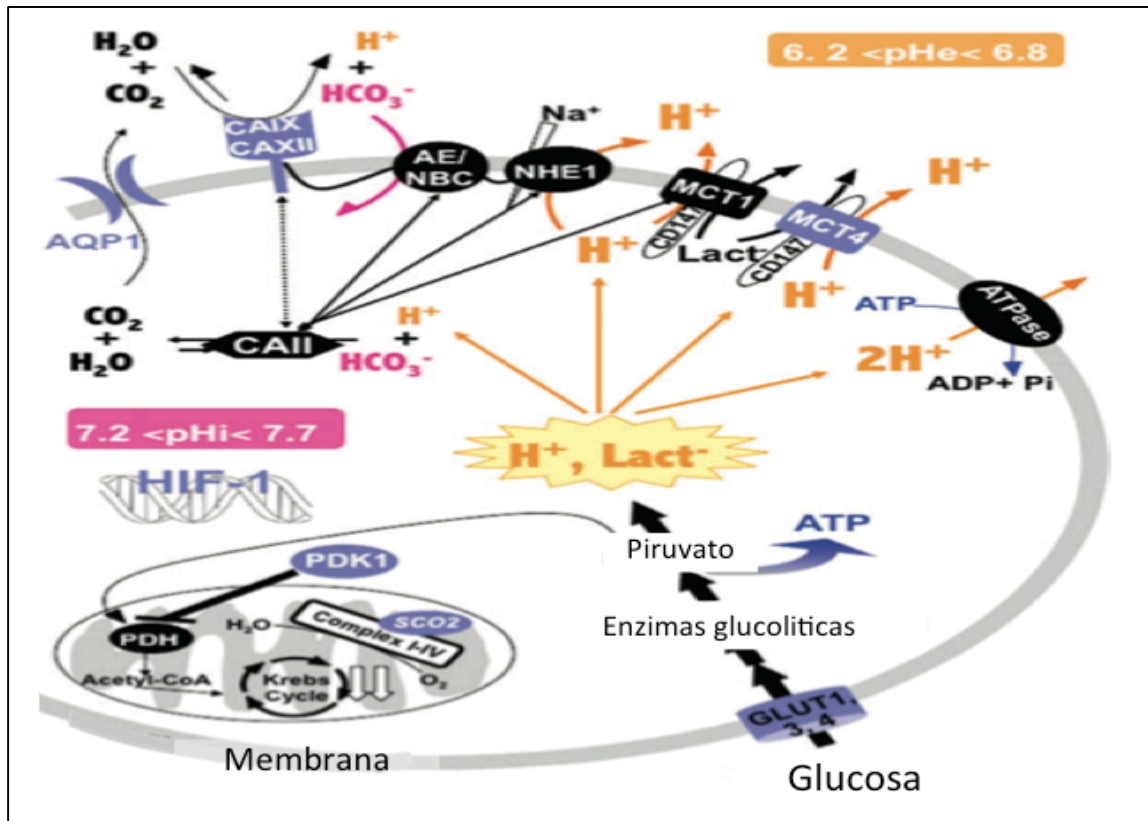


Figura 3. Desregulación de la glucólisis y la regulación de pH (Chiche et al., 2010). *HIF1 α* activa la glucólisis por la sobreexpresión de los transportadores de glucosa (*GLUT1*, *GLUT3*, *GLUT4*) y enzimas glucolíticas como *HK2*, *LDHA*, *PDK1*. La sobreexpresión de lactato (representado en naranja), ayuda a las células tumorales a mantener un pH_i compatible con la viabilidad celular por la expresión constitutiva de genes que participan en los sistemas de regulación ácido-base (símbolos negros) como por ejemplo: Na^+/H^+ , *NHE-1*, *AE/NBC*. Además de que *HIF1 α* induce la regulación de otros sistemas (símbolos en azul) como por ejemplo *MCT4*, *CAIX* y *CAXII*, *AQP1*.

2.4 Acidosis

El potencial de hidrogeno celular (pH) desempeña un papel muy importante en la regulación de diversos procesos como la regulación del ciclo celular, proliferación, migración de las células; dicha importancia radica en que la mayoría de las enzimas son sensibles a los cambios de pH, desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH optimo puede afectar drásticamente su actividad, como por ejemplo la progresión del la fase G1 del ciclo celular se estimula en un rango de pH de 7.1-7.2 (Chiche et al., 2010). Por lo tanto la regulación del pH tanto intra (pHi) como extracelular (pHe) de todas las células del cuerpo es crítica ya que todos los procesos celulares son sensibles a los cambios de pH (Figura 4) (Rosa A. Cardone, 2005; Supuran, 2011).

Los tumores crean un medio ambiente hostil incrementando la cantidad de H⁺ (incluyendo acido láctico y carbónico), las alteraciones en el pH afectan la estructura y actividad de casi cada enzima y afecta drásticamente la señalización y función metabólica (Scott K. Parks, 2013).



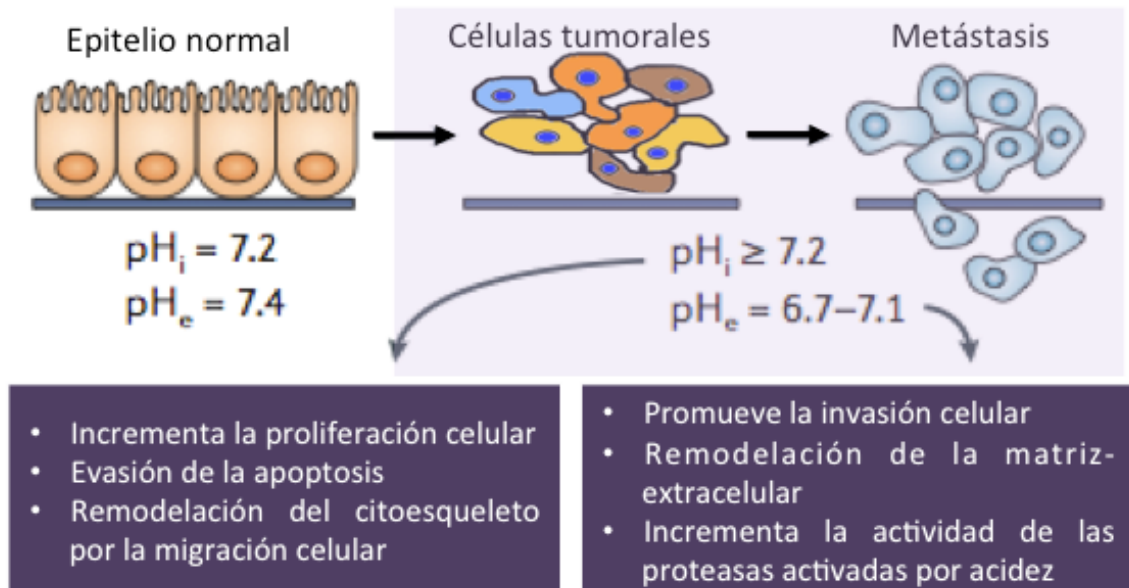


Figura 4. Esquema del efecto de pH en la célula tumoral. El pH_e en las células normales (representadas en naranja) se mantiene en un rango de 7.2 ± 2 , cuando este pH es modificado (bloque en morado), diversos procesos celulares se afectan promoviendo la proliferación celular, evasión de la apoptosis, invasión celular, etc.

2.5 Modelos de hipoxia

En la literatura existen diversos reportes ampliamente descritos del modelo de inducción de hipoxia tanto químico como de depleción de oxígeno; para el modelo químico se utiliza generalmente el $CoCl_2$ como inductor de hipoxia, se emplea a diferentes concentraciones dependiendo la línea celular que se utilice (Jean-Pascal Piret, 2002; Wu & Yotnda, 2011; Zeng et al., 2011).

La concentración mayormente reportada es de 100 μ M determinada a partir de un ensayo dosis-respuesta (Fukuda et al., 2007), y se han utilizado líneas celulares de diferentes tipos de cáncer (Lee et al., 2015; Zeng et al., 2011). En particular, la inducción de hipoxia mediante la depleción de oxígeno se realiza utilizando una cámara sellada con una mezcla de gases (nitrógeno, dióxido de carbono y oxígeno) en diferentes proporciones (Figura 5). El nivel de oxígeno para generar hipoxia es menor del 5%, diferentes trabajos evalúan diferentes concentraciones de oxígeno simultáneamente en un rango de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5% de oxígeno (Ruoxiang Wang, 2014; Sorensen et al., 2005; Wu & Yotnda, 2011), o una sola concentración la más empleada es del 1% (Benita et al., 2009). Para la validación de estos modelos se emplea típicamente la evaluación de la sobreexpresión del marcador de hipoxia el gen *HIF1 α* mediante técnicas de qPCR midiendo el RNA mensajero (Chiche et al., 2009), o la sobreexpresión de la proteína *HIF1 α* mediante la técnica de western blot (U. R. Jewell, 2001).

Los dos diferentes modelos de hipoxia se han utilizado en la búsqueda de diferentes enfoques de varios tipos de patologías como por ejemplo: nuevas terapias de cáncer (Wilson & Hay, 2011), búsqueda de mecanismos relacionados a la transición epitelial mesenquimal (Zuo et al., 2016) e inclusive en la obesidad (Messineo et al., 2016). Importantemente una gran cantidad de trabajos están enfocados en el contexto del cáncer, relacionados a búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, mecanismos de progresión que involucran el microambiente tumoral (Joyce & Pollard, 2009), así como la participación de hipoxia en mecanismos de migración y metástasis (Chan & Giaccia, 2007;



Chen, 2012).

Por otro lado y como lo hemos descrito anteriormente, otro aspecto que afecta el microambiente tumoral es la acidez (Bradley A. Webb, 2011). Algunos autores mencionan que el tumor genera acidez a través de un incremento en la cantidad de protones (Tannock, 1992a), y otros mencionan que la hipoxia genera directamente acidez (Sorensen et al., 2005), sin embargo aún no están claras ambas propuestas. Lo que sí se conoce es que un microambiente ácido, favorece la activación de mecanismos de migración y metástasis (Rosa A. Cardone, 2005), por lo que el estudio de los mecanismos moleculares del desarrollo de acidez en modelos de hipoxia es de interés para muchos investigadores (Sorensen, Alsner, Overgaard, & Horsman, 2007).

La actividad de los PHDs y la subsecuentes estabilización de *HIF1 α* es afectada por agentes químicos (agente mimético de hipoxia) como por ejemplo hierro, deferoxamina quelante, flavonoides como por ejemplo quercetina, inhibidor del 2 oxoglutarato dependiente de oxigenasa y metales de transición como por ejemplo cobalto (Tabla 2) (Befani et al., 2013).





Figura 5. Cámara de hipoxia (foto tomada del laboratorio UG-CIDICS). En la figura se observa la cámara sellada unida a un regulador de presión y al tanque de la mezcla de gases (94% nitrógeno, 5% dióxido de carbono y 1% oxígeno).

Tabla 2. Agentes miméticos de la hipoxia

Regulador	Función/vía involucrada	Consecuencia	Referencia
Níquel	<ul style="list-style-type: none"> Disminuye los niveles de Fe Inhibe PHDs Desregula la expresión de FIH-1 y ARD1 PI3K/Akt 	Incrementa expresión de <i>HIF1α</i>	(Davidson T, 2005) (Ke Q, 2005) (Li J, 2004)
Cobalto	<ul style="list-style-type: none"> Reemplaza Fe Desregula la expresión de FIH-1 y ARD1 PI3K 	Incrementa expresión de <i>HIF1α</i>	(Yuan Y, 2003) (Ke Q, 2005)
Arsenito	ROS P38 MAPK	Incrementa expresión de <i>HIF1α</i>	(Duyndam MC, 2003)
Cromo	ROS P38 MAPK PI3K/Akt	Incrementa expresión de <i>HIF1α</i>	(Gao N, 2002)
Desferrioxamina (DFO)	Quelador de Fe	Incrementa expresión de <i>HIF1α</i>	(Wang GL, 1993)
TGF- α	ROS	Incrementa la translocación y actividad de <i>HIF1α</i> Incrementa la unión al DNA	(SC, 2001)



2.6 Modelo de acidez

Pocos trabajos describen el uso de un modelo de acidez; principalmente hay reportes de modelos *in vitro*, en los cuales para simular un medioambiente ácido se realiza con la modificación del pH del medio de cultivo empleado (Hulikova, Harris, Vaughan-Jones, & Swietach, 2013; Raul Martinez-Zaguilán, 1996). El gradiente de pH empleado en la mayoría de los trabajos va desde 6.9-6.2; ya que en la literatura se reporta que la modificación del pH de 0.1 es vital para la regulación de diversos procesos celulares (Madshus, 1988; Supuran, 2011). Este tipo de modelos se han utilizado para la búsqueda de mecanismos de regulación celular tumoral (Balaji Krishnamachary, 2003; Tannock, 1992b); mas recientemente empezó a utilizarse en conjunto con modelos de hipoxia para observar el efecto en la combinación de estos factores (Balaji Krishnamachary, 2003; Sorensen et al., 2005).

2.7. Metabolismo celular tumoral

El interés en la regulación del metabolismo celular del cáncer a aumentado en la ultima década, la cual ha tenido tanta importancia que se ha considerado un “hallmarks of cáncer”(Hanahan & Weinberg, 2011). Un aspecto que ha llamado la atención en el contexto del cáncer es que además de la actividad de numerosos canales de iones y transportadores que son altamente sensible a cambios de pH intra y/o extracelular así como también en la hipoxia y otras



características del microambiente tumoral (Neri & Supuran, 2011), hay oncogenes y genes supresores de tumor que cumplen con una función celular normal en diferentes procesos de la célula.

En el 2014 Iurlaro et al., describe que diversos genes catalogados como oncogenes o genes supresores de tumor, como por ejemplo el gen *Myc* y *p53*, son reguladores importantes de procesos metabólicos involucrados en proliferación celular y en el ciclo celular, por lo cual es de importancia estudiarlos en el contexto de la regulación del metabolismo celular.

2.8 Mutaciones en genes de la Mitocondria

Hace mas de 70 años Warburg hipotetizo que el cáncer era causado por una disfunción en la mitocondria, los tumores producían un exceso de lactato en presencia de oxígeno, este proceso es conocido como “efecto Warburg”, (Wallace, 2005). Las mutaciones en el DNA mitocondrial son frecuentemente asociadas a cáncer, se han reportado diversas mutaciones somáticas y germinales en la mitocondria asociadas a diversos tipos de cancer como por ejemplo: cáncer de colon, adenocarcinoma renal, cáncer de cuello y cabeza, tumores de mama, tumores de ovario, cáncer de próstata y vejiga, etc. (William C. Copeland & Penta, 2002).

Se piensa que defectos en el DNA mitocondrial puede conducir a la carcinogénesis. La reprogramación inducida por hipoxia en la regulación mitocondrial puede ser mediante la vía de la succinato deshidrogenasa, que es



una vía energéticamente más eficiente en condiciones de hipoxia (Lukyanova, 2013).

Después de casi 50 años se demostró que las mutaciones en genes de la mitocondria como por ejemplo: mutaciones en las subunidades B, C y D de la succinato deshidrogenasa representan la gran mayoría de los paragangliomas hereditarios mutaciones en *SDHA*, y del núcleo catalítico de Complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, conduce al síndrome de Leigh, una condición neurodegenerativa. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de Warburg y demuestran que las alteraciones mitocondriales pueden estar involucradas en dos extremos del espectro de la enfermedad: las condiciones degenerativas causadas por la muerte celular y las condiciones neoplásicas aparentemente causadas por un bloqueo de la muerte celular (Maximo, Lima, Soares, & Sobrinho-Simoes, 2009).

Los mecanismos por los cuales el mtDNA y las mutaciones del ADN nuclear y las proteínas mitocondriales defectuosas resultantes implicadas en el ciclo de OXPHOS y/o Krebs pueden conducir o promover tumorigenesis no se entienden completamente. Se ha avanzado en que los mecanismos de la glicólisis afectados por la hipoxia mejoran la supervivencia celular en microambientes hipóxicos y ácidos.

También hay evidencia emergente que sugiere que la disfunción mitocondrial puede conducir a la activación de HIF-1 α , desencadenando así la vía de hipoxia en el proceso tumoral (Maximo et al., 2009).



Ya se han encontrado diversas mutaciones mitocondriales en diferentes tipos de cáncer (Dang, 2012).

Alteraciones genéticas en el genoma nuclear de la mitocondria de las células son relacionadas a alteraciones en el metabolismo de células tumorales, se cree que estos cambios son producidos por el microambiente de las células de cáncer, que son caracterizadas por hipoxia y limitaciones en los nutrientes (Wallace, 2005).



CAPÍTULO 3

Justificación

La hipoxia activa un transcriptoma complejo que incluye las vías de genes de respuesta a hipoxia (*HIF1 α*), normalmente no expresados en células en condiciones sin estrés (oxígeno y acidosis). La capacidad de adaptarse, sobrevivir y proliferar bajo esas condiciones, son unas de las diferencias fisiológicas fundamentales entre las células tumorales y las células normales.

Las células cancerosas que portan mutaciones en genes conductores de tumor, tienen mejor capacidad para adaptarse a microambientes de hipoxia y pH ácido. Sin embargo, los mecanismos precisos que censan y regulan esta adaptación aún no se conocen.

En el presente trabajo se implemento un modelo *in vitro* de estrés (hipoxia y acidez), para evaluar tanto mutaciones en genes conductores de tumor como cambios que se producen en la célula cuando esta bajo estrés, esto permitió identificar la expresión diferencial de genes afectados por dichos cambios.



CAPÍTULO 4

Hipótesis

Diferentes rutas de señalización metabólica se activan cuando la célula se somete simultáneamente a estrés (pH bajo e hipoxia) y al silenciamiento de genes asociados a cáncer.



CAPÍTULO 5

Objetivos

5.1 Objetivo general

Identificar cambios en el metabolismo celular en respuesta al efecto combinado de: estrés (hipoxia y pH ácido) y el silenciamiento de genes conductores de tumor, en un modelo *in vitro* de cáncer.

5.2 Objetivos específicos

1. Implementar un modelo *in vitro* de hipoxia y acidez.
2. Estandarizar las condiciones del silenciamiento de genes conductores de tumor en un modelo *in vitro* de estrés.
3. Realizar el análisis de expresión génica global mediante microarreglos de expresión e identificar genes diferencialmente expresados en el modelo de estrés (hipoxia y acidez) y silenciamiento.
4. Correlación de los resultados para identificar genes con participación en vías metabólicas afectadas por las condiciones de estrés (hipoxia y acidez) y silenciamiento.



CAPÍTULO 6

Material y Métodos

6.1 Estrategia general

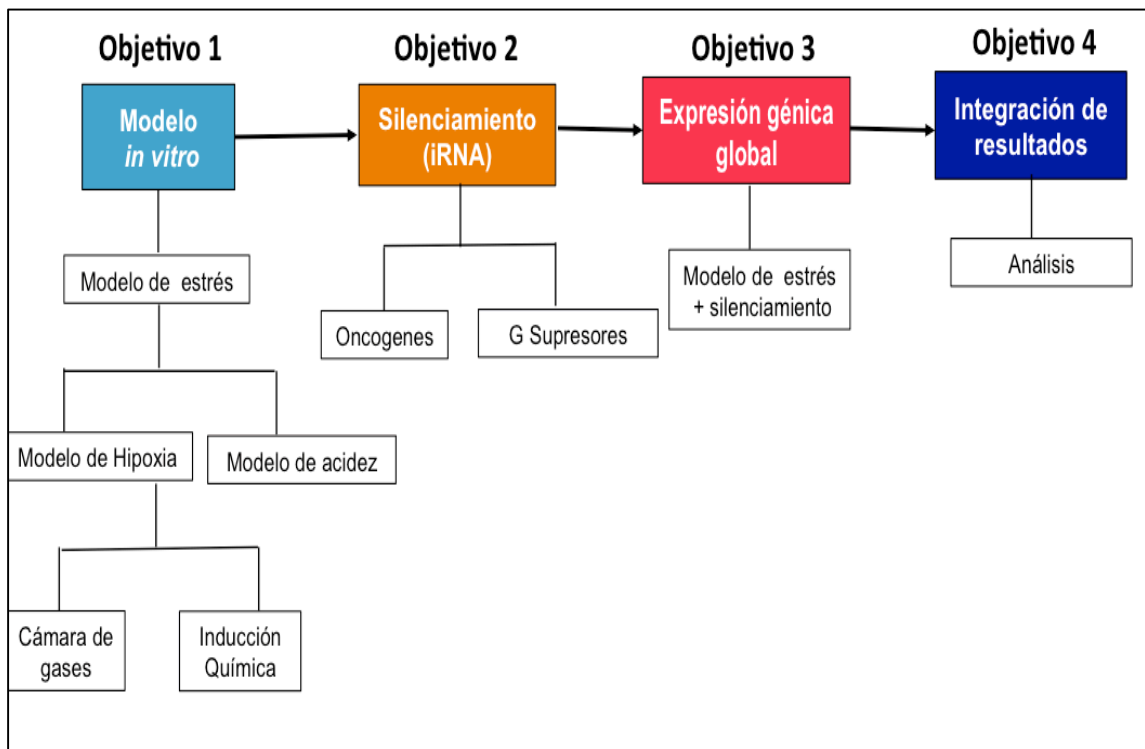


Figura 6. Diagrama de la estrategia general. A partir de la implementación del modelo de estrés (hipoxia y acidez) y el silenciamiento de los oncogenes y genes supresores de tumor (Objetivo 1 y 2), se realizó la expresión génica global (Objetivo 3), con todos los datos obtenidos se realizó un análisis bioinformático (Objetivo 4).

6.2 Material

6.2.1 Reactivos

Reactivos requeridos para la extracción de ácidos nucleicos: Trizol de Invitrogen (Carlsbad, CA), Cloroformo, Isopropanol, Etanol (Sigma Aldrich, EUA) y Agua grado biología molecular (Sigma Aldrich, EUA).

Reactivos requeridos para análisis PCR en Tiempo Real: Se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) para la síntesis de cDNA. Para la PCR en tiempo real se utilizó el reactivo SyBr Master Mix (Roche, Alemania), primers para los genes de interés (*Glut-1*, *HIF1 α* , *VEGF*, *EPO*, *CA9*, *KRAS*, *APC*, *Myc*, *P53* y *GAPDH*).

Reactivos requeridos para microarreglos: GeneChip 3'IVT Express Kit y GeneChip Hybridation, Wash and Stain kit de Affymetrix (Santa Clara, CA), Experion RNA Analysis Kits de Bio-Rad (Hercules, CA) y etanol de J.T. Baker (USA).

Reactivos requeridos para cultivo celular: Para el mantenimiento de la línea celular se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM. GIBCO, Invitrogen, EUA), suero bovino fetal (SBF, 10X), antibiótico penicilina-estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G sódica y 100 ug/mL de sulfato de



estreptomycin). Para realizar los subcultivos se utilizó Tripsina-EDTA 1X (GIBCO, Invitrogen, EUA). Se empleó material de plástico como, puntas plásticas desechables, tubos eppendorf de 0.2, 0.6, 1 y 2 mL, tubos falcon de 15 y 50 mL (Corning, EUA) botellas de cultivo de 25 y 75 cm²(Corning, EUA), placas de cultivo de 6 y 96 pocillos, raspadores plásticos estériles (Corning, EUA) y pipetas serológicas de 5 y 10 mL (Corning, EUA). Para el recuento celular se utilizó el colorante azul de tripano al 0.4 % (Gibco, Invitrogen, EUA). Para la inducción de hipoxia química se utilizó Cloruro de cobalto (Sigma Aldrich). Para el ensayo de acidosis se utilizó Hidróxido de sodio 1N, Acido clorhídrico 1N, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) 25 mM y ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 25 mM.

Reactivos requeridos para extracción de proteínas y Western Blot: En la extracción de proteínas totales se empleó inhibidor de proteasas (Roche, Alemania). La curva estándar de calibración se hizo con albúmina sérica bovina grado reactivo (Amresco, EUA). Para los geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida (Invitrogen, EUA) y *N*-*N*'-metilbisacrilamida (Invitrogen, EUA) proporción 29:1, SDS 10X (ICN Biomedicals, EUA), Tris-HCl pH 8.8 y pH 6.8, los catalizadores TEMED (Bio- Rad, EUA) y persulfato de amonio (Sigma, EUA) grado reactivo. El buffer de corrida se preparó con Tris-base (Sigma, EUA) glicina (Sigma, EUA) y SDS (ICN Biomedicals, EUA). Se utilizó un marcador de peso molecular Precision Plus Protein All Blue (Biorad).



Para el western blot se utilizó el buffer de transferencia que fue preparado con Tris Base, Glicina, SDS y agua destilada. La cuantificación de proteínas se realizó con el reactivo de Bradford, y en microplaca de 96 pozos, se utilizó un lector de Elisa.

Reactivos para el ensayo de viabilidad y apoptosis (quimioluminiscencia):

Para el ensayo de viabilidad celular se utilizó el Kit CellTiter-Glo (Promega), Para el ensayo de apoptosis se utilizó el kit Caspase 3/7 (Promega), placas blancas y placas negras de 96 pozos (Corning) y el equipo Glomax (Promega).

6.2.2 Material Biológico

Línea celular CaCo-2 y ácidos nucleicos: RNA total (RNA), DNA complementario (cDNA) y lisado de proteínas totales.

6.2.3 Equipo

Equipo utilizado para cultivo celular: El cultivo celular se realizó en una campana de flujo laminar clase II (GSCO) y en una incubadora con 5% de CO₂, y 37°C de temperatura (ThermoFisher). Se empleó un microscopio invertido (Olympus) para la observación de las células en cultivo, la centrifugación se hizo en una centrifuga refrigerada 5810 R (Eppendorf, Alemania). La viabilidad celular y los extractos proteicos se cuantificaron en un lector de Elisa (iMark,



BioRad). Para las lecturas de fluorescencia se utilizó un lector de placas Glomax (Promega).

Equipo utilizado para la extracción de ácidos nucleicos: Centrifuga tubos 2 mL, Thermomixer de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York), Bioanalyzer™ Automated Electrophoresis Station, cámara electroforesis, transiluminador GelDoc XR fuente poder PowerPac HC de Bio-Rad (Hercules, CA), Qubit fluorometer de Life Technologies (Carlsbad, CA), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York) y Nanodrop de Thermo Scientific (Willminton, DE).

Equipo utilizado para análisis de PCR en Tiempo Real (qPCR): Light Cycler 480 (Roche), Termociclador veriti y ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System de Life Technologies (Carlsbad, CA), Campana de PCR de UVP (Upland, CA), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York) y centrífuga minispin de Labnet (Edison, NJ).

Equipo utilizado para microarreglos: Termociclador GenAmp de Pelkin Elmer (Waltham, Massachusetts), thermomixer de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Nanodrop de Thermo Scientific (Willminton, DE), Experion™ Automated Electrophoresis Station de Bio-Rad (Hercules, CA), GeneChip Hybridation Oven 645, GeneChip Fluidics Station 450 y GeneChip Scanner 3000 7G de Affymetrix



(Santa Clara, CA), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York) y minispin de Labnet (Edison, NJ).

Equipo utilizado para Western Blot: Cámaras de electroforesis vertical, fuente de poder, Kit de transferencia (Bio Rad), thermomixer de Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

6.2.4 Programas computacionales

- oligo dt
- Amplify
- GeneChip Command Console Software (AGCC)
- Transcriptome Analysis console (TAC)
- Paquete R.
- Panther
- GOrilla (Gene Ontology enRiChment anaLysis and visualiZation tool)
- REVIGO (reduce + visualize Gene ontology)
- Genecards
- NCBI



6.3 Métodos

6.3.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular CaCo-2 (HTB-37) Adenocarcinoma colorectal humana obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection), las células fueron cultivadas en medio DMEM (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Media, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina). En una atmósfera húmeda a 37 °C con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 3 días hasta alcanzar una confluencia del 80% para la realización de los diferentes ensayos.

6.3.2 Conteo Celular con Azul de Tripano y Siembra en Placa

Una vez alcanzada la confluencia de 90-85 %, se les adicionó tripsina (0.25 %) a las células para despegarlas de la superficie de la botella, por un tiempo de 5-10 min, a 37 °C, a continuación se inactivó la tripsina con el mismo volumen de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino. Se recuperó la suspensión celular en un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó por 5 min a 1000 rpm para obtener un botón de células, el cual se resuspendió en el volumen de medio apropiado descartando el sobrenadante de la centrifugación. De la suspensión celular se preparó una dilución (1:10) con medio de cultivo y azul de tripano, para contar las células en la cámara de Neubauer. Se sembraron las células según el experimento a realizar.



6.3.3 Inducción de hipoxia

El ensayo de hipoxia se realizó mediante dos metodologías una con inducción química y otra mediante la disminución de la concentración de oxígeno, como se describe a continuación:

- A) La inducción química se realizó empleando el CoCl_2 (Sigma) que es un compuesto químico que mimetiza la hipoxia (Figura 7) (Ke & Costa, 2006). Se probó un rango de concentraciones (50, 100 y 150 μM) del compuesto para definir la dosis a que se induce la hipoxia, basándonos en reportes previos que utilizan CoCl_2 para la inducción de hipoxia química (Befani et al., 2013; Jean-Pascal Piret, 2002; Talita Antunes Guimarães, 2016).
- B) La disminución de la concentración de oxígeno se realizó mediante el uso de una cámara de hipoxia (Stem cell, Technologies), a la que se conecta una mezcla de gases con las siguientes concentraciones 1% Oxígeno, 5% de Dióxido de carbono y 94% de Nitrógeno (Praxair, México), durante unos minutos, posteriormente se sella y se introduce a una incubadora el tiempo necesario para cada ensayo.



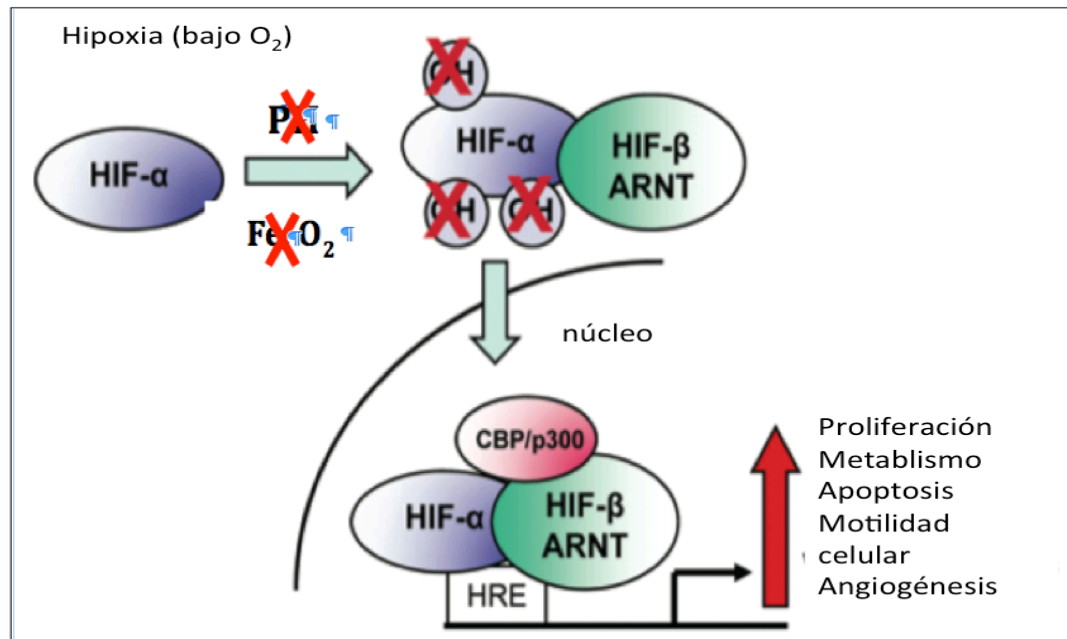


Figura 7. Mecanismo del CoCl_2 . El cloruro de cobalto es un agente mimético de hipoxia, actúa secuestrando temporalmente a iones como Fe^+ , O^2 , lo que provoca la estabilización de $\text{HIF}1\alpha$, $\text{HIF}1\alpha$. se trasloca al núcleo y activa genes implicados en proliferación, inhibición de apoptosis, angiogénesis.

6.3.4 Determinación de número de células y evaluación del rendimiento de extracción de RNA

Se realizó un ensayo previo para determinar el número de células necesarias para realizar los ensayos posteriores en dos formatos de placa 96 pozos y 6 pozos (Corning), además de evaluar el rendimiento de extracción de RNA de cada formato de placa, también se realizó un ensayo inicial para determinar la concentración de CoCl_2 que se empleó en los ensayos posteriores de inducción de hipoxia química.

En forma general los ensayos se realizaron como se describe a continuación:

Se sembraron 15 000 y 150 000 células por pozo en placas de 96 y 6 pozos respectivamente de la línea celular CaCo-2, se incubaron 24 h previas a los ensayos para permitir que se adhieran a la placa, pasado este tiempo se hizo cambio de medio y fueron incubadas en presencia o ausencia de CoCl_2 100 μM durante 0, 3, 6, 24, 48 y 72 h, y/o en la cámara de hipoxia.

Cada condición se realizó por triplicado. Este ensayo se evaluó midiendo la expresión a nivel transcripcional de los genes los genes sensibles a hipoxia (*HIF1 α* , *EPO*, *VEGF*, *CA9*, *GLUT1* y *LDH*).

6.3.5 Ensayo de acidosis

Las células CaCo-2 fueron sembradas (15,000 células por pozo) en placas de 96 pozos, 24 h después se realizó el cambio de medio a diferentes pH 6.5, 6.7 y 6.9. La modificación del pH del medio se realizó adicionando ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES 25 mM) o ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfónico (MOPS 25 mM) y al final medir el pH y ajustarlo con HCl 1M. Se utilizó un control de medio sin cambio de pH, durante 0, 3, 6, 24, 48 y 72 h, cada condición se realizó por triplicado.



6.3.6 Extracción de RNA total

Para este ensayo se sembraron 1.5×10^5 células en placas de 6 pozos y 1.5×10^4 células en placas de 96 pozos a las cuales se les proporcionó el tratamiento descrito previamente (acidosis y/o inducción de hipoxia por ambos métodos). El RNA total se extrajo a las 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas utilizando el reactivo Trizol (marca Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) posteriormente se agrego cloroformo (marca Fischer Scientific, New Jersey, USA), Etanol (marca Merck, Darmstadt, Alemania), isopropanol (marca Fischer Scientific, New Jersey, USA) e inhibidor de RNAsas 'RNA out' de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) acuerdo con las especificaciones del fabricante. El RNA fue precipitado, lavado y resuspendido en 30 μ L de agua DEPC libre de RNAsas, se cuantificó y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

6.3.7 Retrotranscripción

La síntesis del DNA complementario se realizó a partir de 1 μ g de ARN total utilizando oligo DT de acuerdo con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de la compañía Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) e inhibidor de RNAsas 'RNA out' de la compañía invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. El cDNA obtenido fue cuantificado utilizando un Nanodrop y se almaceno a -20°C hasta su uso.



6.3.8 PCR cuantitativa

Se realizó la cuantificación relativa a nivel transcripcional de los genes sensibles a hipoxia (*HIF1 α* , *EPO*, *VEGF*, *CA9*, *GLUT1* y *LDH*), además de tres genes endógenos utilizados para la normalización (*GPI*, *EMC7* y *GAPDH*) el análisis de expresión relativa se realizó con el método de cuantificación $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001; Sorensen et al., 2015), cada condición se realizó por triplicado.

El ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó usando el reactivo SYBR Green master mix (Roche), los iniciadores para cada gen fueron diseñados con el programa Oligo dt y Amplify (Tabla 3).

La normalización de los datos se realizó definiendo como gen endógeno la proteína de membrana de la subunidad del RE del Complejo 7, la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa y la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*EMC7*, *GPI* y *GAPDH* respectivamente).

6.3.9 Western Blot

Para este ensayo se sembraron 1.5×10^5 células en placas de 6 pozos, se les expuso al tratamiento mencionado previamente (acidosis y/o inducción de hipoxia por ambos métodos). La extracción de proteínas totales se realizó a las 0, 3, 6, 24, 48 y 72 h post-tratamiento, las células se rasparon con ayuda de un gendarme de goma, se utilizó PBS 1X (Corning) frío para lavar las células,



posteriormente se centrifugaron 15 segundos a máxima velocidad, se removió el PBS, las células se lisaron con el buffer de lisis conteniendo 10mM de Tris-HCl pH 7.5, 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 1% de Tritón-X-100, 1mM de DDT, 1mM de PSMF y un stock de inhibidores de proteasas(Complete, Roche).

Después, el lisado celular se incubó por 20 min en hielo, se centrifugó, y se colectó el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total por el método de Bradford y se almacenó a -80 °C hasta su uso. El método de Bradford se realizó en microplaca, se utilizó 1 uL del extracto proteico, diluido en proporción 1:5 con agua mili-Q y 40 uL de reactivo de Bradford (Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad, EUA), mezclando y dejando reposar por 5 min. a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de color de la reacción. La absorbancia se leyó a 600 nm de longitud de onda usando un lector de placas de Elisa (iMark, BioRad). La cantidad de proteína fue estimada interpolando el valor de absorbancia de cada muestra en la curva estándar de referencia construida previamente con albúmina sérica bovina en un rango de 0.5 a 3 ug/mL. Los extractos cuantificados se conservaron a -80°C hasta su uso. El corrimiento electroforético Para el ensayo de western blot se utilizaron 30 µg de proteína total por pozo en el gel de poliacrilamida en gradiente de 4-12% (SDS-PAGE), en condiciones reductoras, el gel se corrió a 120V por 2.5 h, la transferencia es realizó a una membrana de PVDF (Merck Millipore, MA, USA) a 30 V por 16 h en frio, la membrana se bloqueo durante 2 h con una solución de leche al 5%, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario toda la noche (HIF1 α 1:1000 1% BSA, secundario Ant rabbit HRP 1:10000/1.5% BSA,



Glut 1 1:2000 5% BSA, secundario Ant rabbit HRP 1:10000/1.5% BSA y B-Actina 1:3000 /1.6 % BSA, secundario Ant rabbit HRP 1:10000/1.5% BSA), se realizaron 3 lavados de 10 min c/u con TBS-T 1x y se incubó con el anticuerpo secundario por 60 minutos con solución de bloqueo (BSA 0.5%). La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia (ImmunoCruz western blotting luminol reagent, Santa Cruz, EUA). Para la captura de imagen se utilizó el equipo Chemidoc XRS™ (Bio-Rad, CA, USA).

Se utilizaron los anticuerpos primarios: anti-HIF1α (Abcam, EUA), anti-Glut 1 (Abcam, EUA), anti-Biotina (Abcam, EUA) y el anticuerpo secundario anti-conejo HRP (Abcam, EUA).

EVALUACIÓN DE ESTRÉS	
GENE	SECUENCIA
HIF1A-F	ATCCATGTGACCATGAGGAAATG
HIF1A-R	TCGGCTAGTTAGGGTACACTTC
EPO-F	GGAGGCCGAGAATATCACGAC
EPO-R	CCCTGCCAGACTTCTACGG
CA9-F	GGATCTACCTACTGTTGAGGCT
CA9-R	CATAGCGCCAATGACTCTGGT
VEFGA-F	AGGGCAGAATCATCACGAAGT
VEFGA-R	AGGGTCTCGATTGGATGGCA
GLUT 1-F	TCTGGCATCAACGCTGTCTTC
GLUT 1-R	CGATACCGGAGCCAATGGT
LDHA-F	ATGGCAACTCTAAAGGATCAGC
LDHA-R	CCAACCCCAACAACACTGTAATCT
GENES ENDÓGENOS	
GENE	SECUENCIA
EMC7-F	TCAGAGGTTGTCAGACTGCC
EMC7-R	GCCCCACGATTCCCTTTTAATA
GPI-F	GGAGACCATCACGAATGCAGA
GPI-R	TAGACAGGGCAACAAAGTGCT
GAPDH F	ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG
GAPDH R	GCCATCACGCCACAGTTTC

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la qPCR



6.3.10 Silenciamiento de oncogenes y genes supresores de tumor

El ensayo de silenciamiento génico (*knockdown*) se realizó utilizando ARN de interferencia (iRNA) dirigido contra los genes *KRAS*, *APC*, *Myc* y *P53* en células en condiciones normales y posteriormente inducidas a hipoxia utilizando el kit de transfección silencer de la marca Ambion (Austin, TX, USA).

En forma general el ensayo se realizó como se describe a continuación:

Se sembraron 15 000 células por pozo de la línea celular CaCo-2 en placas de 96 pozos con medio OptiMEM (Gibco, EUA). En un tubo de 2 mL se preparó el complejo de transfección (OptiMEM + Agente transfectante + iRNA de cada gen), se añadieron 100 μ L de la mezcla a cada pozo y se incubaron por 0, 24, 48 y 72 h, como control negativo se utilizó un iRNA non-sense (Ambion) y como control positivo a GAPDH (Ambion), se realizó la extracción de ARN total la qPCR se realizó con Sybr Green master mix. El cambio relativo en la expresión génica se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando la expresión de GAPDH para la normalización (Bustin, 2004; Josh Haimes, 2014).

6.3.11 Microarreglos de expresión génica global

Los perfiles de expresión génica fueron definidos con el uso de microarreglos utilizando el protocolo de Affymetrix GeneChip 3'IVT Express Kit como se describe en forma general a continuación (ver descripción completa del protocolo en la sección de anexos): A partir de 16 condiciones de cultivos



seleccionados, se partió de una concentración de 100 ng de ARN total de cada muestra, con una calidad y pureza entre un rango de 1.8-2 (valores determinados por espectrofotometría), se realizó la preparación del control de poli A. Se agregó el ARN y se procedió a la síntesis de la primera y segunda cadena de cDNA, a partir del cDNA realizar la transcripción *in vitro* (IVT) y generar aRNA (RNA amplificado) marcado; posteriormente se marcó con biotina y se incubó durante 16 h a 40 °C.

El aRNA marcado fue purificado usando perlas magnéticas, las cuales se unieron en primera instancia al aRNA y usando un magneto fueron retenidas mientras fueron lavadas con etanol y soluciones de lavado, y finalmente se eluyeron en una solución de elución donde obtuvimos aRNA marcado purificado. El aRNA marcado y purificado fue evaluado por NanoDrop ND8000 para saber si se obtuvo suficiente cantidad para proseguir con la fragmentación (mínimo 15 ug). La fragmentación fue realizada usando un buffer de fragmentación, la fragmentación fue analizada mediante un gel de agarosa. Posteriormente la hibridación fue realizada, colocando la muestra en una mezcla de hibridación dentro de un cartucho o chip Affymetrix HU-U133 Plus 2.0 GeneChip, y dejando hibridar en el horno de hibridación por 16 horas a 45°C a una velocidad de rotación de 60 rpm usando el GeneChip Hybridation, wash and stain kit. Cuando la hibridación fue terminada, la muestra y la mezcla de hibridación fue retirada del cartucho, este fue rellenado con solución Holding buffer y fue lavado en la estación de fluidos 450 de la plataforma de Affymetrix, el programa para el tipo de cartucho indicado fue seleccionado y en este



proceso incluyó lavados con buffers de lavado incluidos en el kit, así como el uso de soluciones de tinción para poder ser detectada la señal en el escáner. Al finalizar la estación de fluidos, el cartucho fue llenado con holding buffer y evitando que se hubieran generado burbujas, se coloca en el escáner de Affymetrix donde fue escaneado y fue generado tanto la imagen como los archivos necesarios para su posterior análisis usando el software Affymetrix Microarray Suite versión 5.0.0.032.

Después de obtener la imagen escaneada se realizó un análisis bioinformático utilizando el software R para realizar la normalización (análisis RMA) el cual nos sirve para eliminar el ruido de fondo y para asegurarnos que las muestras son comparables.

Se realizaron diferentes comparaciones para realizar el análisis por ejemplo Normal vs Hipoxia, Normal vs combinación pH/Hipoxia, Normal vs combinación pH/Hipoxia + Myc silenciado, etc.

Se utilizaron diferentes programas bioinformáticos para los análisis de vías de señalización (panther), análisis ontológico (GORilla, REVIGO) y diversas bases de datos para la identificación y función de genes (GENECARDS, NCBI Y PANTHER).



6.3.12 Análisis estadístico

Los experimentos se realizarán por triplicado y las variables fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido por un análisis de Dunnett, previamente se determinó la normalidad de las variables con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, el análisis se realizó utilizando el software estadístico SPSS (versión 20.0) y las gráficas se realizaron en el software GraphPad Prism v6.0. Los resultados se presentan como medias + desviación estándar (SD). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p \leq 0.05$.



CAPÍTULO 7

Resultados

7.1 Descripción general de la línea celular de cáncer de colon

Para la selección de la línea celular CaCo-2 como modelo de experimentación, se realizó una revisión del catálogo de la American Type Culture Collection (ATCC). Analizando cada una de las líneas celulares disponibles que se adaptará a las necesidades para nuestro modelo *in vitro* esta línea celular se seleccionó porque no tiene mutaciones en los 4 genes de interés (*P53*, *KRAS*, *Myc* y *APC*) que se silenciaron para realizar el posterior análisis de expresión génica global (Figura 8).

7.2 Estandarización de oligonucleótidos para la evaluación de los modelos de estrés (hipoxia y acidosis)

Posterior a la selección de nuestro modelo *in vitro*, se realizó la selección de genes que se utilizaran para la evaluación de los modelos de estrés (*HIF1 α* , *VEGF*, *CA9*, *EPO*, *GLUT 1*, *LDH*) y silenciamiento (*KRAS*; *P53*, *APC*, *Myc*); Se diseñaron y estandarizaron 11 pares de oligonucleótidos para la evaluación de los modelos de estrés y silenciamiento. Se comenzó con un gradiente de temperatura en PCR punto final para cada par de primers (58, 60 y 62 °C), todos los oligonucleótidos amplificaron en las tres temperaturas evaluadas, se seleccionó la temperatura de 60 °C para su uso en PCR tiempo real.



<p>Descripción línea celular Caco-2 Organismo: Homo sapiens Tejido: Colon Enfermedad: Adenocarcinoma Colorectal Tipo celular: Células epiteliales Edad: 72 años Género: Masculino Morfología: Tipo epitelial Propiedades de crecimiento: Adherentes Perfil de DNA: Amelogenina: X CSFqPO: 11 D13S317: 11, 13, 14 D16S539: 12, 13 D5S818: 12, 13 D7S820: 11, 12 THO1: 6 TPOX: 9,11 vWA: 16, 18 Análisis citogenético: El número de cromosomas modales de la línea madre es 96, ocurriendo en 16% con poliploidia en 3.2%. Se detectaron diez marcadores comunes, por ejemplo, t(1q;?), 10q-, t(11q17q) y otros 7. El t(1q17q) y M11 se encontraron en solo una porción de células. Los ins(2), 10q- y t(15q;?) fueron generalmente pareados, y t(11q;17q) y t (21q;?) fueron en su mayoría tres copias. N9 normal estaba ausente, y N21 se perdió en algunas células. Se detectaron de uno a cuatro cromosomas pequeños acrocéntricos. No se detectó cromosoma Y con banda q distal.</p>

Figura 8. Perfil genético de la línea celular CaCo-2. En la imagen se describen los cambios genéticos de la línea celular CaCo-2. Destacando que no se observan cambios en los genes de interés (*P53*, *KRAS*, *Myc* y *APC*) para este trabajo.

Posteriormente se realizaron 11 curvas de eficiencia, curvas estándar y curvas de fusión (curva de desnaturalización del DNA) (Figura 9), para determinar la concentración de trabajo y eficiencia de reacción de cada par de oligonucleótido, las eficiencias obtenidas fueron en un rango de 1.8-2 (valores aceptables), la concentración de trabajo seleccionada fue de 100 ng/ μ L.



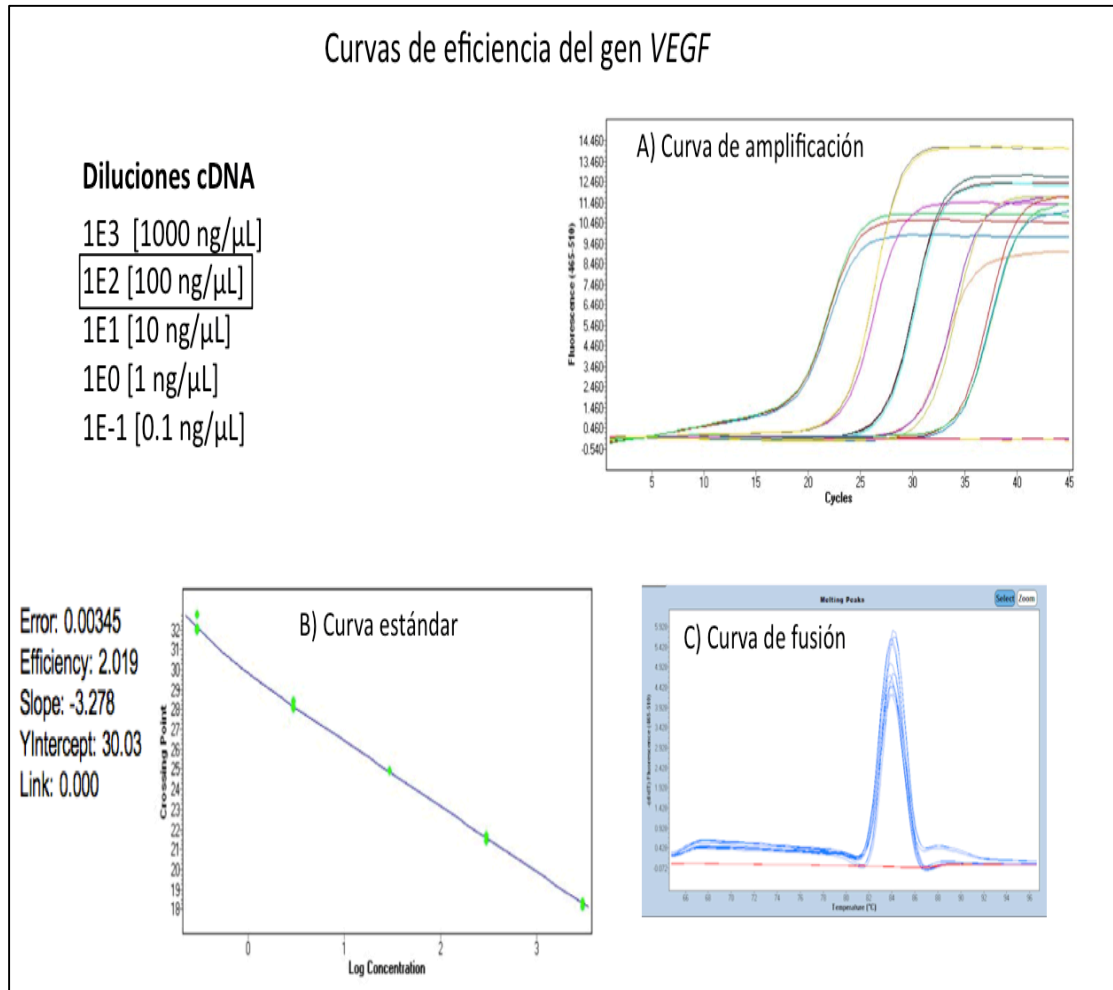


Figura 9. Estandarización de los oligonucleótidos empleados en qPCR (gen VEGF). En el esquema se presentan las curvas de amplificación, estándar y fusión. A) curva de amplificación se realizaron diluciones seriadas a partir de 1000 ng/μL (1E3) de cDNA. B) Curva estándar se realizó para determinar la eficiencia de reacción de los oligonucleótidos empleados, calculándose una eficiencia de 2. C) Curva de fusión se realizó para determinar la especificidad de cada par de primers y la concentración de trabajo a utilizar (recuadro negro).

7.3 Evaluación de la expresión de genes blanco de HIF1 α en los dos modelos de hipoxia

La cuantificación relativa a nivel transcripcional de los 6 genes evaluados (*HIF1 α* , *VEGF*, *CA9*, *EPO*, *GLUT 1*, *LDH*) fue muy variable en los dos modelos; Nuestro gen de referencia es *HIF1 α* , basándonos en la literatura esperábamos que la expresión relativa de este gen aumentara ambos modelos para determinar que se estaba llevando el proceso de hipoxia.

En el modelo químico (CoCl_2) se observó una sobre expresión de *HIF1 α* a las 3, 6 y 24 h respecto al tiempo 0 h y una disminución de dicha expresión a las 48 y 72 h. El resto de los genes tuvo un comportamiento similar entre ellos, por ejemplo: Se observó una menor expresión de *VEGF*, *CA9*, *EPO* y *GLUT 1* a las 3 h y posterior aumento de la expresión a las 6 y 24 h esta expresión disminuyó a las 48 y 72 h. Mientras que *LDH* tuvo un comportamiento distinto, se observó una sobre expresión a las 3, 6 y 24 h que fue disminuyendo a las 48 y 72 h. En forma general se puede decir que la expresión de dichos genes en el modelo de hipoxia química tuvo un efecto agudo a las 6 h con una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) comparada con la expresión de los genes a las 48 y 72 h. El modelo de hipoxia inducido con la cámara de gases se observó una sobre expresión menor y lenta en los primeros tiempos evaluados (3, 6 h) que fue aumentando gradualmente a las 24, 48 y 72 h. El resto de los genes tuvo un comportamiento similar a *HIF1 α* observándose una sobreexpresión menor y lenta en los primeros tiempos evaluados que aumentó a las 48 y 72 h, excepto *CA9* que desde tiempos tempranos mantuvo una sobreexpresión alta. En forma



general podemos mencionar que no se presentó un efecto agudo de la expresión de los genes evaluados como se observó en el modelo químico (CoCl_2), al contrario fue una sobreexpresión menor dependiente de tiempo y este efecto se mantuvo hasta las 72 h. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos factores, no se encontró diferencia estadística entre el uso de la inducción de hipoxia en ambos modelos pero sí respecto al tiempo (significancia estadística con un valor de $p < 0.001$) (Figura 10). En este ensayo se seleccionó el método de inducción de hipoxia con la cámara de gases, debido a que el efecto sobre la expresión de los genes es mantenida en el tiempo máximo evaluado, estos resultados nos sugieren que el efecto de hipoxia no se ha revertido al menos en las 72 h evaluadas a diferencia de el modelo químico que posterior a las 24 horas ya no se observa un efecto de hipoxia.

7.4 Efecto del pH en la expresión de genes en los modelos de inducción a hipoxia

Se evaluó el efecto del pH en el mismo grupo de genes de respuesta a hipoxia (*HIF 1 α* , *EPO*, *VEGF*, *CA9*, *GLUT 1* y *LDH*). La expresión de los 6 genes fue similar en dos de los tres valores de pH (6.7 y 6.9) y a lo largo del tiempo evaluado, con una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.01$) para los tiempos 48 y 72 h respecto al tiempo 0, la única diferencia observada entre ambos tratamientos fue la disminución de la expresión del gen *HIF 1 α* a las 72 h en el pH 6.9 contrario al pH 6.7 la sobreexpresión de *HIF 1 α* se mantuvo.



Para el caso del pH 6.5 la sobreexpresión de los genes de interés se mantuvo a las 3, 6 y 24 h, observándose una disminución de la expresión a las 48 y 72 h (Figura 11). La selección del pH se basó primero que el gen *HIF 1 α* tuviera una sobreexpresión todos los tiempos y posteriormente la sobreexpresión del resto de los genes de interés a lo largo del tiempo evaluado (3, 6, 24, 48 y 72 h) respecto al tiempo 0 h, estas condiciones se cumplen en el pH 6.7, por lo cual fue seleccionado.

7.5 Ensayos de viabilidad celular en ambos modelos de hipoxia

Con la finalidad de evaluar la viabilidad de las células al ser expuestas a dos diferentes métodos de inducción de hipoxia y a diferentes tiempos de exposición 0, 24, 48 y 72 h, se realizó el ensayo de viabilidad celular, utilizando el kit CellTiter-Glo en las células tratadas con CoCl_2 y las que se mantuvieron en la cámara de gases; este kit está basado en la cuantificación de ATP presente que señala la presencia de células metabólicamente activas. Los resultados muestran que en las células tratadas con CoCl_2 (modelo químico) la viabilidad celular se mantiene estable hasta las 48 h pos tratamiento, sin embargo, a las 72 h se observó una disminución aproximadamente del 20 % en la viabilidad comparado con el control incubado en condiciones normales de concentración de oxígeno. En las células mantenidas en la cámara de gases se observó un efecto contrario, hubo un aumento de la actividad metabólica desde el tiempo de 24 h que siguió aumentando hasta las 72 h. En el análisis estadístico se encontró diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre el tiempo y tratamientos (Hipoxia CoCl_2 e hipoxia con cámara de gases), se



observó un efecto actividad metabólica mayor al que se observa en el control en condiciones normales de concentración de oxígeno respecto a la cámara de gases (Figura 12).

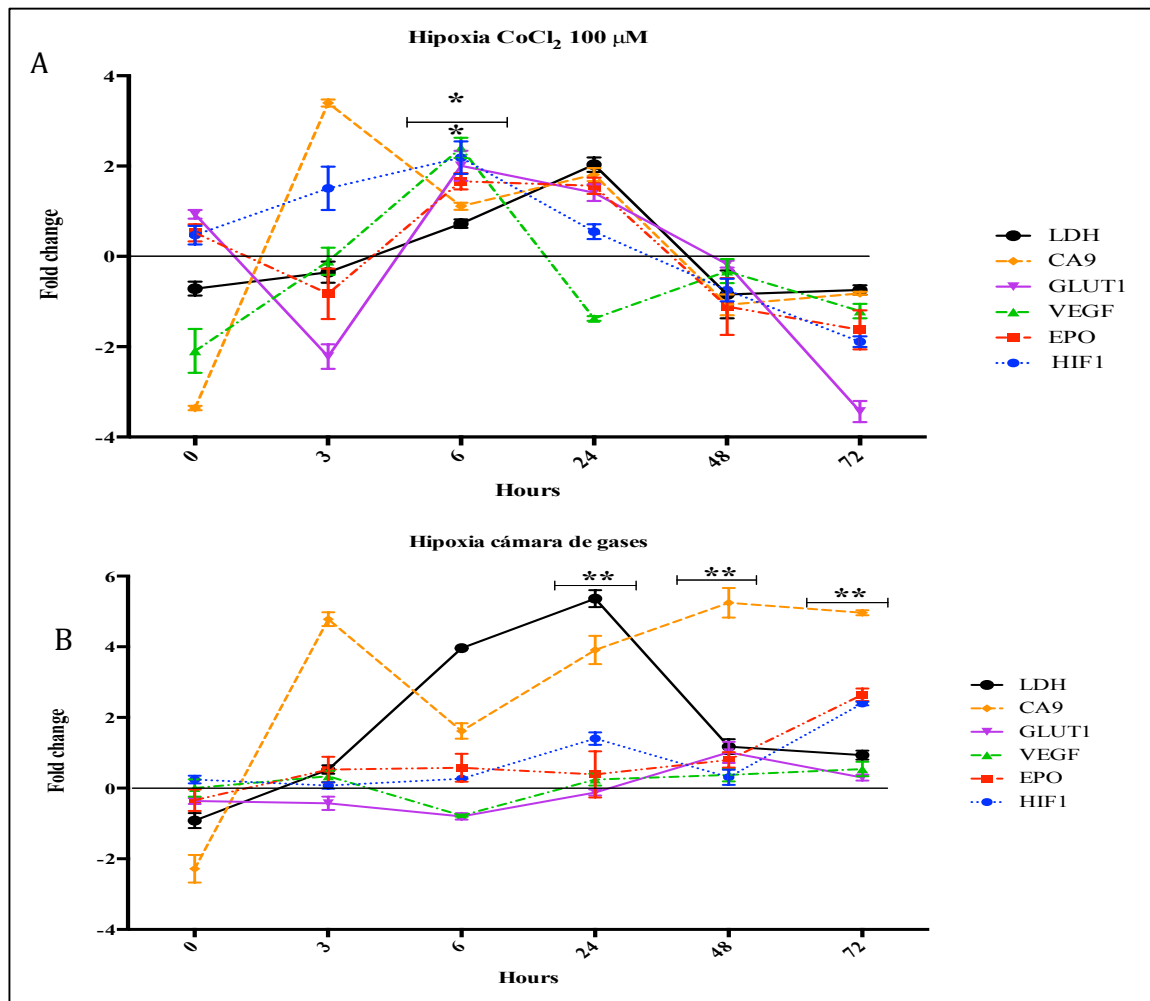


Figura 10. Cuantificación relativa a nivel transcripcional de genes blanco de *HIF1α* en los modelos de hipoxia. El análisis estadístico mostro diferencias significativas ($p < 0.01$) en los tiempos 6 y 24 h para el modelo químico y 24, 48 y 72 h para el modelo de hipoxia con cámara de gases. A) Modelo químico se observa una expresión aguda de todos los genes evaluados a las 6 y 24 h de pos exposición respecto al tiempo 0 h. B) Modelo de inducción de hipoxia con la cámara de gases se observa una expresión crónica con una diferencia significativa ($p < 0.01$) en los tiempos 24, 48 y 72 h.



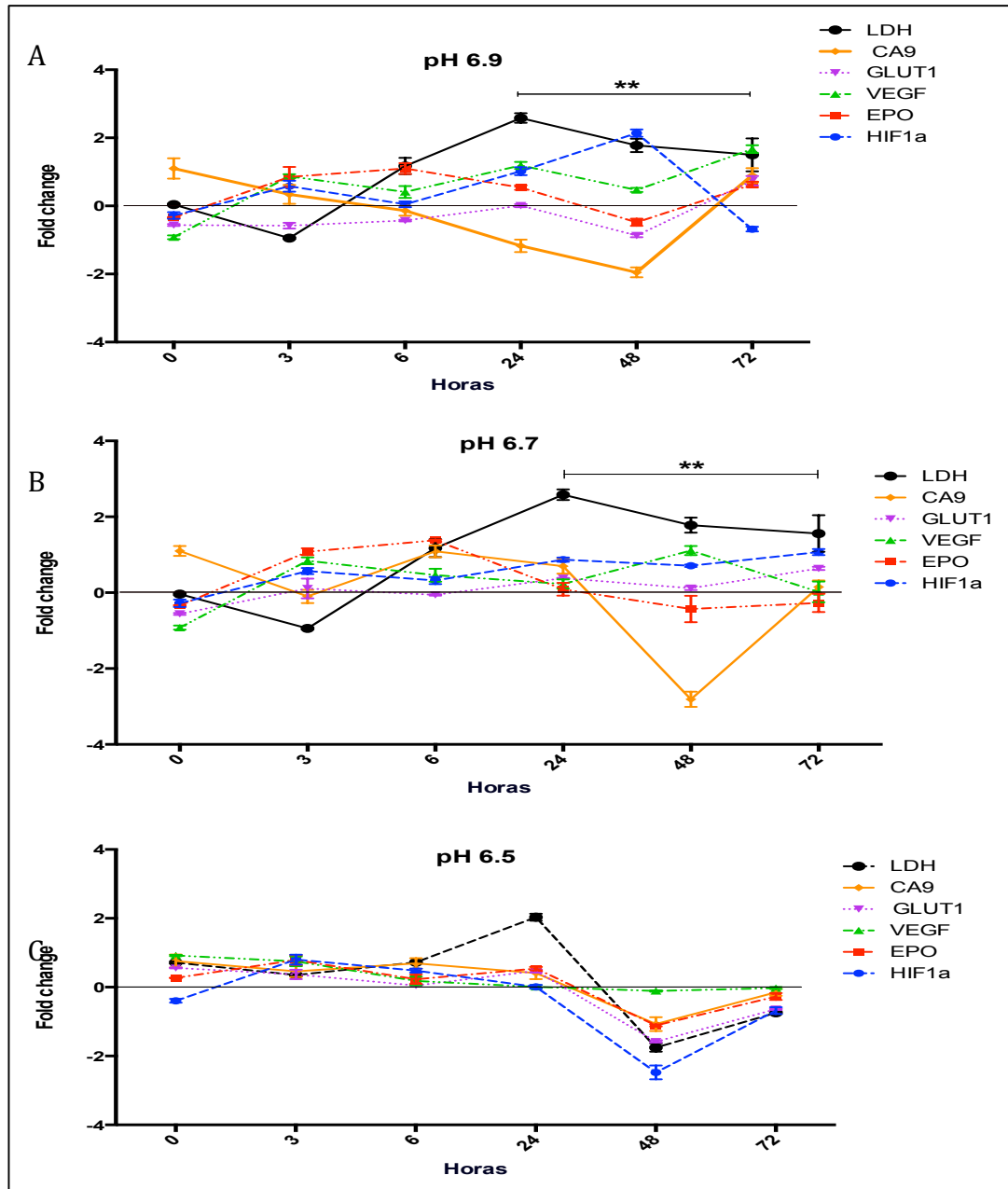


Figura 11. Cuantificación relativa a nivel transcripcional de genes sensibles a hipoxia en el modelo de acidosis. A y B) Ensayo de acidosis, dos de los tres valores de pH evaluados (pH 6.9 y 6.7) mostraron una expresión similar en los seis genes, observándose una sobre expresión a las 48 y 72 h. C) El ensayo de acidosis a pH 6.5 mostró la mayor expresión de los genes de interés a las 24 h y una disminución de la expresión de todos los genes a los tiempos de 48 y 72 h, esto con significancia estadística ($p < 0.01$).

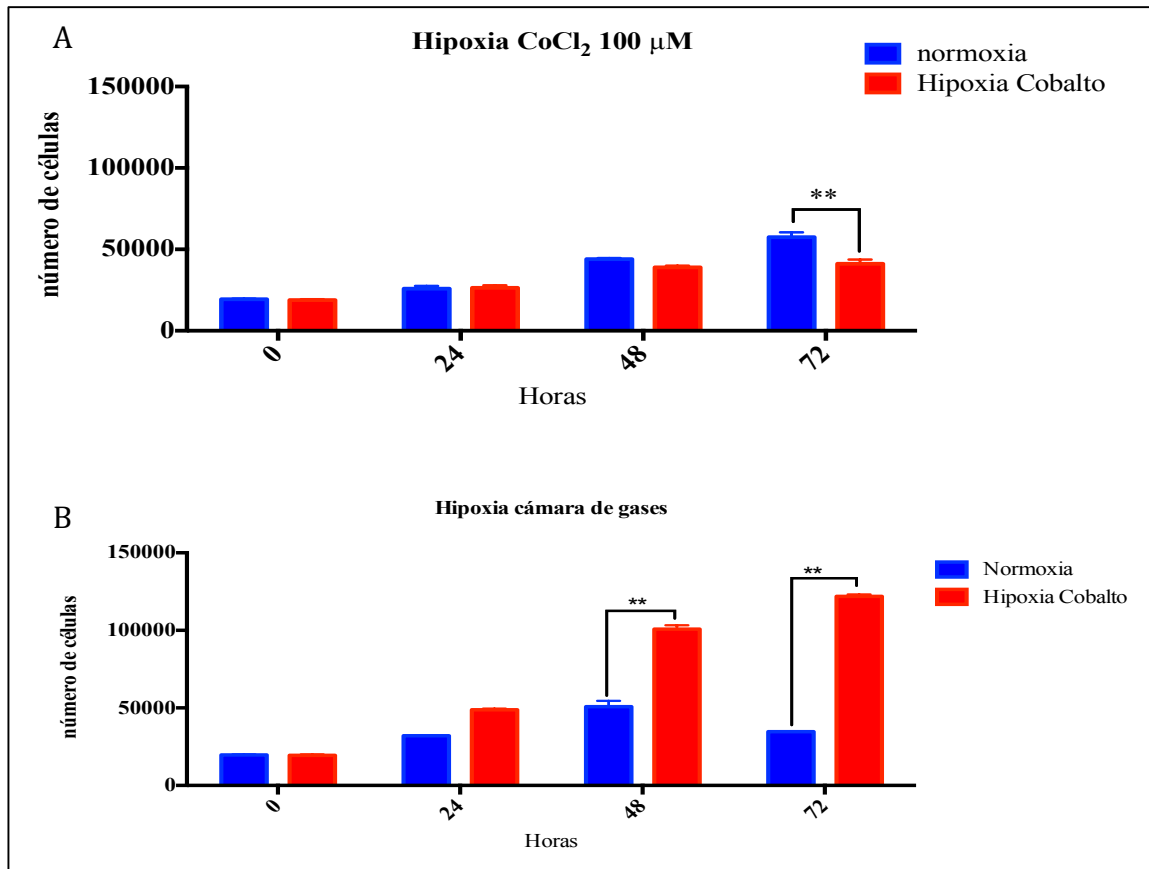


Figura 12. Viabilidad celular en los modelos de inducción de hipoxia. A) Viabilidad en el modelo de hipoxia química, se observa una disminución en la proliferación celular a las 48 y 72 h ($p < 0.01$). B) modelo de inducción de hipoxia con cámara de gases, se observa un aumento en la proliferación celular a los tiempos de 48 y 72 h ($p < 0.001$). (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

7.6 Evaluación de la apoptosis en los dos modelos de hipoxia

Con la finalidad de evaluar la respuesta a la apoptosis al ser expuestas las células a dos diferentes métodos de inducción de hipoxia y a diferentes tiempos de exposición 0, 24, 48 y 72 h, se realizó el ensayo de apoptosis, utilizando el kit Caspase Glo 3/7, el cual mide la relación de la actividad de las caspasas 3 y 7 y la señal de luminiscencia es proporcional a la cantidad de actividad de caspasas presente. Los resultados sugieren que la apoptosis en el modelo químico es semejante al control, no se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los tiempos evaluados comparado contra el control incubado en condiciones normales de concentración de oxígeno (Figura 13). Sin embargo, en el modelo de inducción de hipoxia con cámara de gases se observó una disminución en la actividad de las caspasas 3 y 7 con respecto al control normal a las 48 h, observándose una disminución de la apoptosis a las 72 h de más del 50% en comparación con el control, estos datos sugieren que la depleción de oxígeno mediante el uso de la cámara de gases favorece la replicación y con el uso de inducción química no se observa este efecto, esto puede explicarse que el efecto del CoCl_2 sobre los cultivos, es un efecto agudo presentándose en tiempos cortos y para las 24 h esta inducción ya no es evidente.



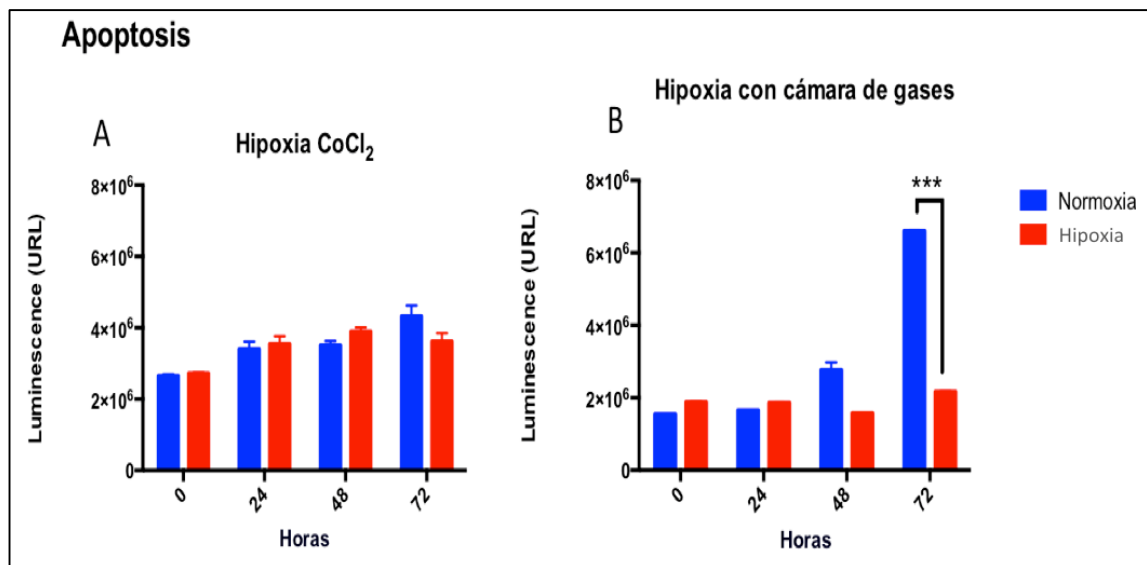


Figura 13. Evaluación de apoptosis en los modelos de hipoxia. A) No se observó diferencias en la actividad de las caspasas en el ensayo de inducción química respecto al control normal. B) se observó una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) de la apoptosis en el modelo de inducción de hipoxia con la cámara de gases respecto al control normal.

7.7 Evaluación de la viabilidad y apoptosis en el modelo de acidosis

Se analizó el efecto del microambiente ácido sobre la viabilidad celular, modificando el pH del medio (pH 6.5, 6.7 y 6.9). La viabilidad celular no se vio afectada a ninguno de los tres pH evaluados a las 24 h pos tratamiento, a las 48 y 72 h cuando las células se exponían a pH 6.7 y 6.9, se observó un incremento en la viabilidad celular (ver Figura 14) con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Por otro lado, la viabilidad celular se vio disminuida cuando las células fueron expuestas al pH más ácido (6.5) tanto a las 48 como

a las 72 horas.

Posteriormente se evaluó la apoptosis midiendo la actividad de las caspasas. Los resultados en este ensayo no mostraron cambios significativos, es decir, no se observó un aumento o disminución de la apoptosis en ninguna de las tres condiciones de acidez en ninguno de los tiempos evaluados, estos datos sugieren que la actividad de las caspasas no se afecta en las condiciones de nuestro ensayo, por lo menos en este rango de pH (6.5-6.9).

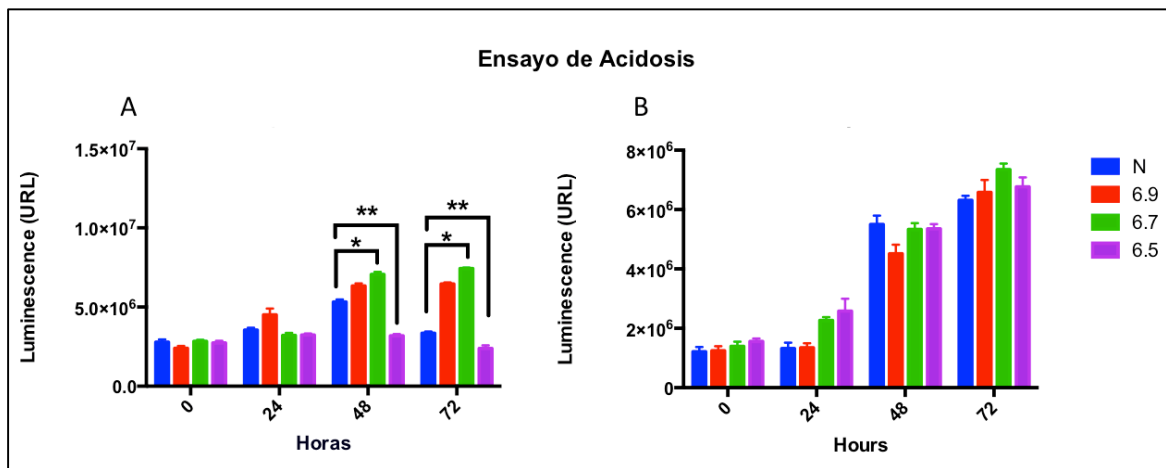


Figura 14. Evaluación de la viabilidad y apoptosis en el ensayo de acidosis. A) Ensayo de viabilidad celular en el modelo de acidosis, se observó un aumento de la proliferación celular a los pH de 6.9 y 6.7 ($p < 0.001$), a pH 6.5 se observó una disminución de la proliferación celular ($p < 0.01$). B) Ensayo de apoptosis en el modelo de acidosis, no se observaron cambios estadísticamente en la actividad de las caspasas con respecto al control normal.

7.8 Evaluación de la viabilidad y apoptosis en los modelos de estrés

Se evaluó la viabilidad cuando se indujo el efecto combinado de diferentes niveles de acidez (pH 6.9, 6.7 y 6.5) en dos modelos de inducción de hipoxia. Como podemos observar en la Figura 15, la combinación de estos dos factores no altera la viabilidad celular en ninguno de los tiempos medidos en el modelo de hipoxia química, no se observa un efecto sinérgico en la combinación de hipoxia química y acidez en la viabilidad celular. Sin embargo, cuando se utilizó el modelo de cámara de gases, se presentó un aumento en la proliferación celular en las combinaciones de pH a 6.9 y 6.7 en el tiempo de 48 h ($p < 0.01$) y a 72 h en la combinación de pH 6.7, posteriormente se observó una disminución de la proliferación en la combinación de hipoxia y pH 6.9 y 6.5 a las 72 h. Estos resultados son semejantes a los que se observaron en las mediciones independientes de hipoxia y/o acidez. La combinación de hipoxia química y pH 6.7 y 6.9 la apoptosis se mantuvo semejante al control incubado en condiciones normales a las 24, 48 y 72 h. Mientras que la combinación de hipoxia química y pH 6.5 se observó una disminución de la actividad de las caspasas a las 48 h, manteniéndose esta disminución hasta las 72 h. La combinación de hipoxia con cámara de gases y pH 6.9 mostro un aumento de la apoptosis a las 72 h, contrario a lo que se observo en el resto de las combinaciones (hipoxia cámara y pH 6.5 y 6.7 que se mantuvo semejante al control normal en todos los tiempos evaluados.



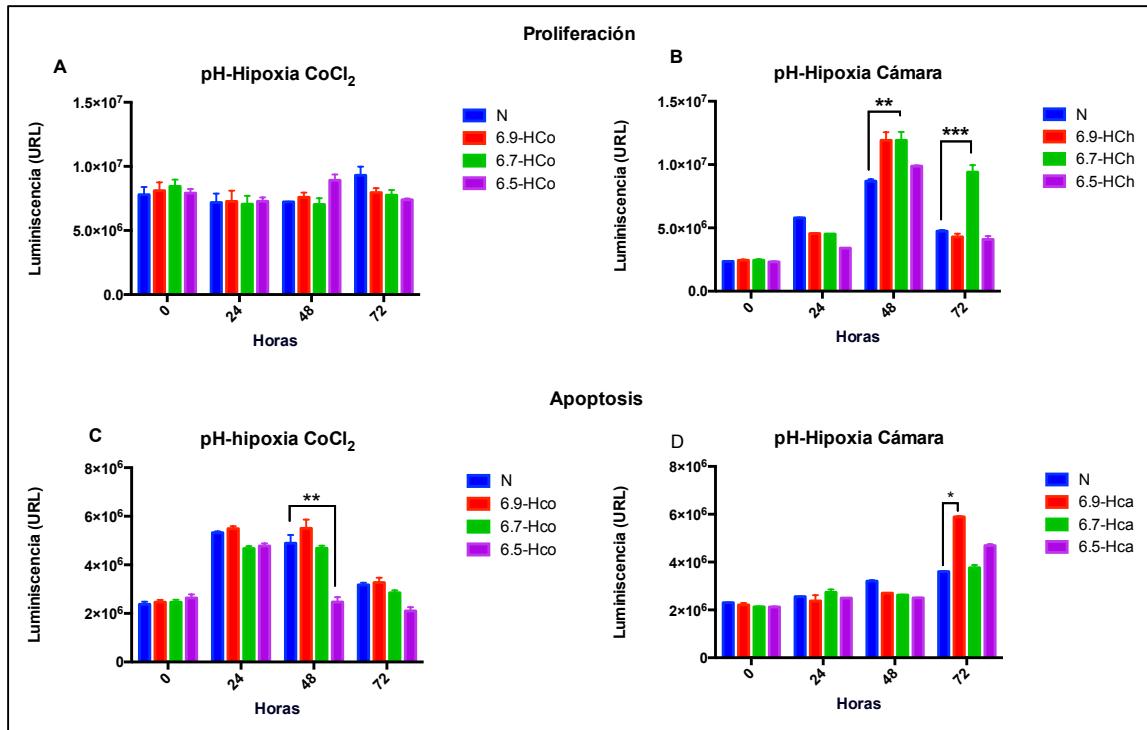


Figura 15. Evaluación de viabilidad y apoptosis en los modelos de estrés (hipoxia y acidez). Se evaluó la viabilidad y apoptosis del efecto combinado de hipoxia y acidez A) Ensayo de proliferación en la combinación de hipoxia química y acidez, no se observa una diferencia entre la combinación de los pH analizados. B) Ensayo de proliferación en la combinación de hipoxia con cámara de gases y acidez, se observó un aumento en la proliferación celular en la combinación de hipoxia con pH de 6.7 y 6.9 ($p < 0.01$) a las 48 h y manteniéndose hasta las 72 h solo para el pH 6.7, mientras que para la combinación de hipoxia con pH 6.5 no se observó una diferencia significativa respecto al control normal. C) Ensayo de apoptosis en la combinación de hipoxia química y acidez, se observó una disminución de la actividad de las caspasas en la combinación de hipoxia y pH 6.5 esto con una diferencia significativa ($p < 0.01$) a las 48 h. D) Ensayo de apoptosis en la combinación de hipoxia con cámara de gases y acidez, no se observaron diferencias significativas al tiempo 0, 24 y 48 h, a las 72 h se observó un incremento en la actividad de las caspasas en la combinación de hipoxia y pH 6.9, esto con una diferencia estadísticamente significativa. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

7.9 Western Blot

Para evaluar la respuesta a la exposición de hipoxia a nivel traduccional se extrajeron lisados de proteínas totales a las 0, 24, 48 y 72 h pos tratamiento se cuantificó la proteína utilizando el método de Bradford y para ello se construyó una curva de estándares. Una vez cuantificada la proteína se utilizaron 30 μ g para correr el gel de poliacrilamida al 12% (gel separador). Posteriormente se realizó la transferencia del gel a la membrana de PVDF y se procedió con el *Western Blot*, el resultado de la reacción de quimioluminiscencia se muestra en la figura 16. Los niveles de expresión de las proteínas HIF1 α y GLUT1 fueron analizadas en el modelo de hipoxia con cámara de gases a las 24 h.

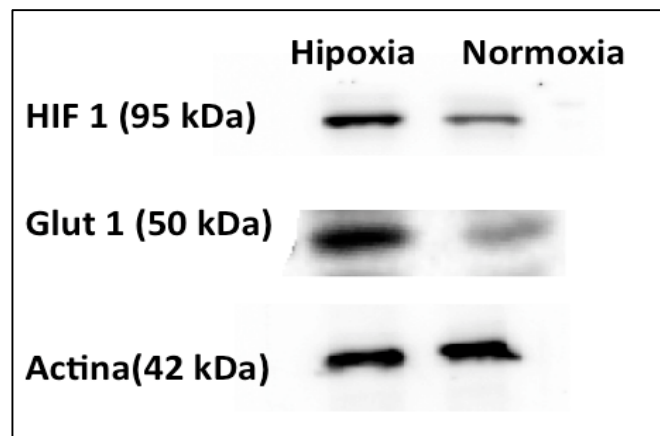


Figura 16. *Western Blot*. En la imagen se observa las proteínas de interés HIF1 α y GLUT1 y como control endógeno β -actina, se observó una mayor expresión de las proteínas de interés cuando eran expuestas a hipoxia con la cámara de gases (carril izquierdo), esto respecto al control normal (carril derecho).

7.10 Silenciamiento de oncogenes y genes supresores de tumor

Posterior a la estandarización del ensayo de silenciamiento génico (knockdown) se realizó un ensayo final en formato de placa de 6 pozos para cada uno de los genes silenciados, se realizó la extracción de RNA total en células Caco-2 que fueron tratadas con RNA de interferencia (iRNA) para bloquear la expresión de los genes *KRAS*, *APC*, *Myc* y *P53* en cultivos de células incubadas en condiciones normales y de hipoxia. Se logró la disminución en la expresión de las proteínas APC y TP53 a las 48 h (66 y 87%) y para las proteínas Myc y KRAS a las 72 h (73 y 95%). El rango de Knockdown para los 4 genes silenciados fue de 66-95% (Figura 18). (Shan, 2010)

7.11 Análisis de los microarreglos de expresión génica

Se analizaron por microarreglos 16 muestras de cultivos celulares incubada a diferentes condiciones (4x control (células sin tratamiento), 2x Combinación pH/Hipoxia+*KRAS* silenciado, 2x Combinación pH/Hipoxia+*APC* silenciado, 2x Combinación pH/Hipoxia+*Myc* silenciado, 2x Combinación pH/Hipoxia+*p53* silenciado, 2x Células con hipoxia cámara de gases y 2x Combinación pH/Hipoxia). Después de la estandarización del modelo de estrés (hipoxia y acidez) y selección de los tiempos de silenciamiento para cada uno de los genes evaluados, se realizó un ensayo de expresión génica global mediante la técnica de microarreglos de expresión, previo a la realización de los microarreglos de expresión se verificó la calidad e integridad de todas las



muestras de RNA, utilizando un RNA LabChip de Agilent, todas las muestras tuvieron un valor de RNA Integrity Number (RIN) ≥ 8 (Figura 17). Después de realizarse la normalización correspondiente mediante el método RMA (Roboust Multi-array Average), los datos obtenidos por microarreglos se usaron para obtener un perfil de expresión génica diferencial entre el conjunto de muestras (sin tratamiento) y el conjunto de muestras (con tratamiento), esto utilizando los datos del conjunto de sondas con una media de expresión mayor a 12 (fold change) y que además fueran estadísticamente significativos (prueba t student y de Kolmogorov con una $p < 0.05$). Se obtuvo un perfil de aproximadamente 2298 genes diferencialmente expresados (Figura 19), este resultado con esta gran cantidad de genes identificados nos sugiere que existe una gran similitud entre las muestras analizadas, por eso no hay grandes cambios en el primer análisis.

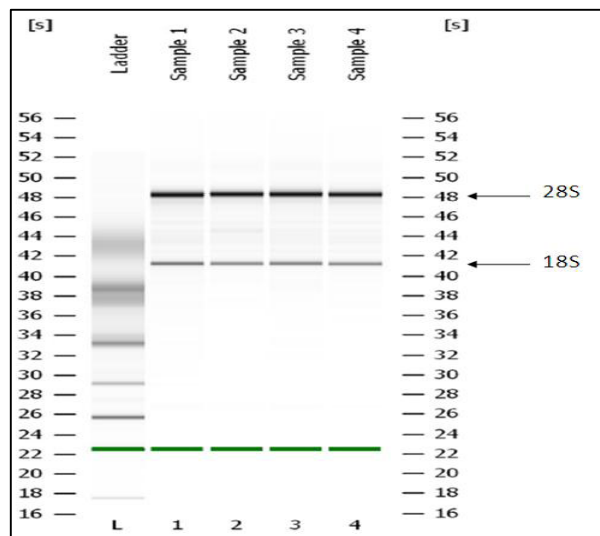


Figura 17. Verificación de la calidad e integridad de las muestras de RNA. Gel virtual de muestras ejemplo de RNA integro observándose las bandas correspondientes a 28s y 18s.

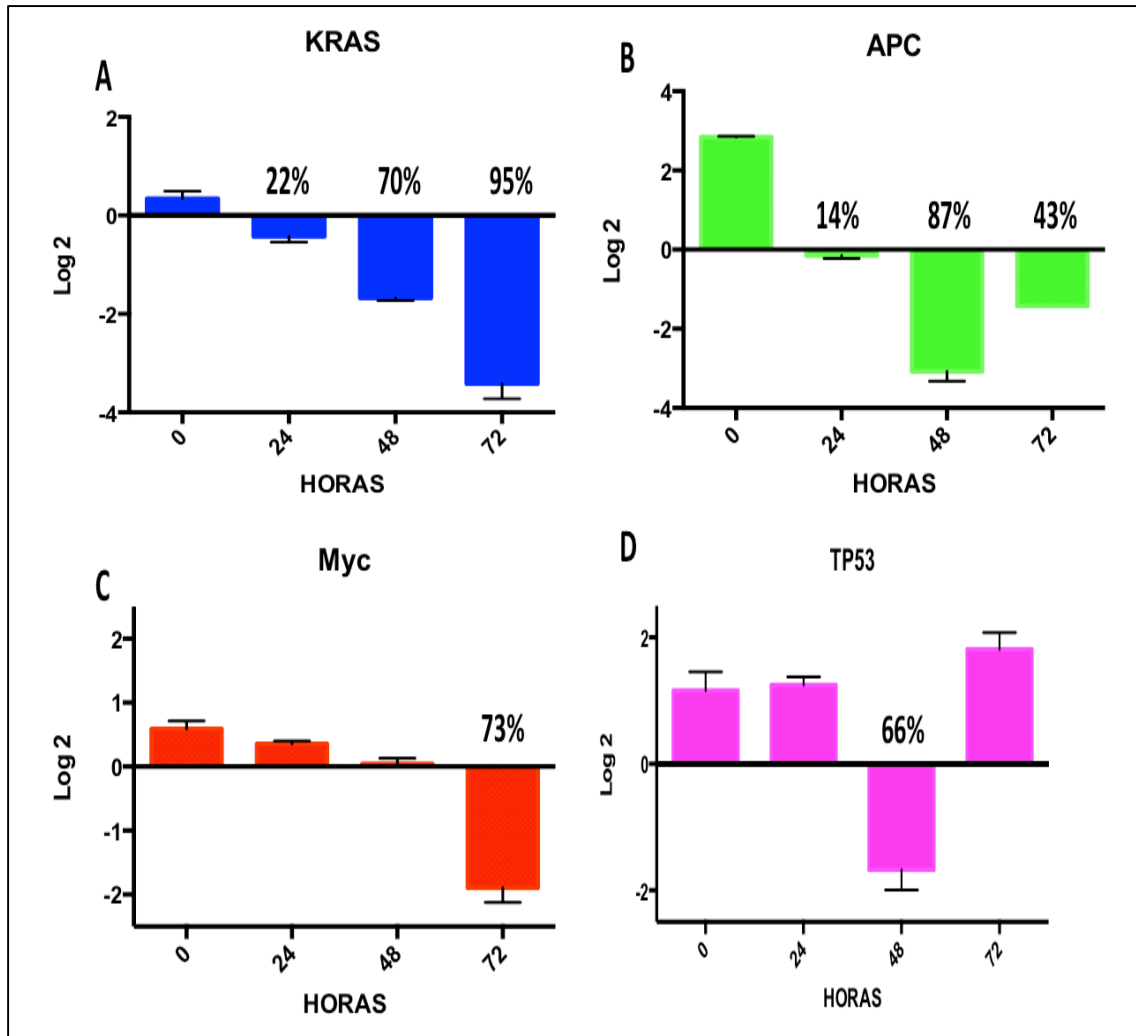


Figura 18. Análisis de expresión del silenciamiento génico dirigido contra los genes *KRAS*, *APC*, *Myc* y *P53*. A) Se observa el mayor porcentaje de knockdown (95%) a la 72 h para la proteína *KRAS*. B) Se observa el mayor porcentaje de knockdown (87%) a la 48 h para la proteína *APC*. C) Se observa el mayor porcentaje de knockdown (73%) a la 72 h para la proteína *Myc*. D) Se observa el mayor porcentaje de knockdown (66%) a la 48 h para la proteína *TP53*.

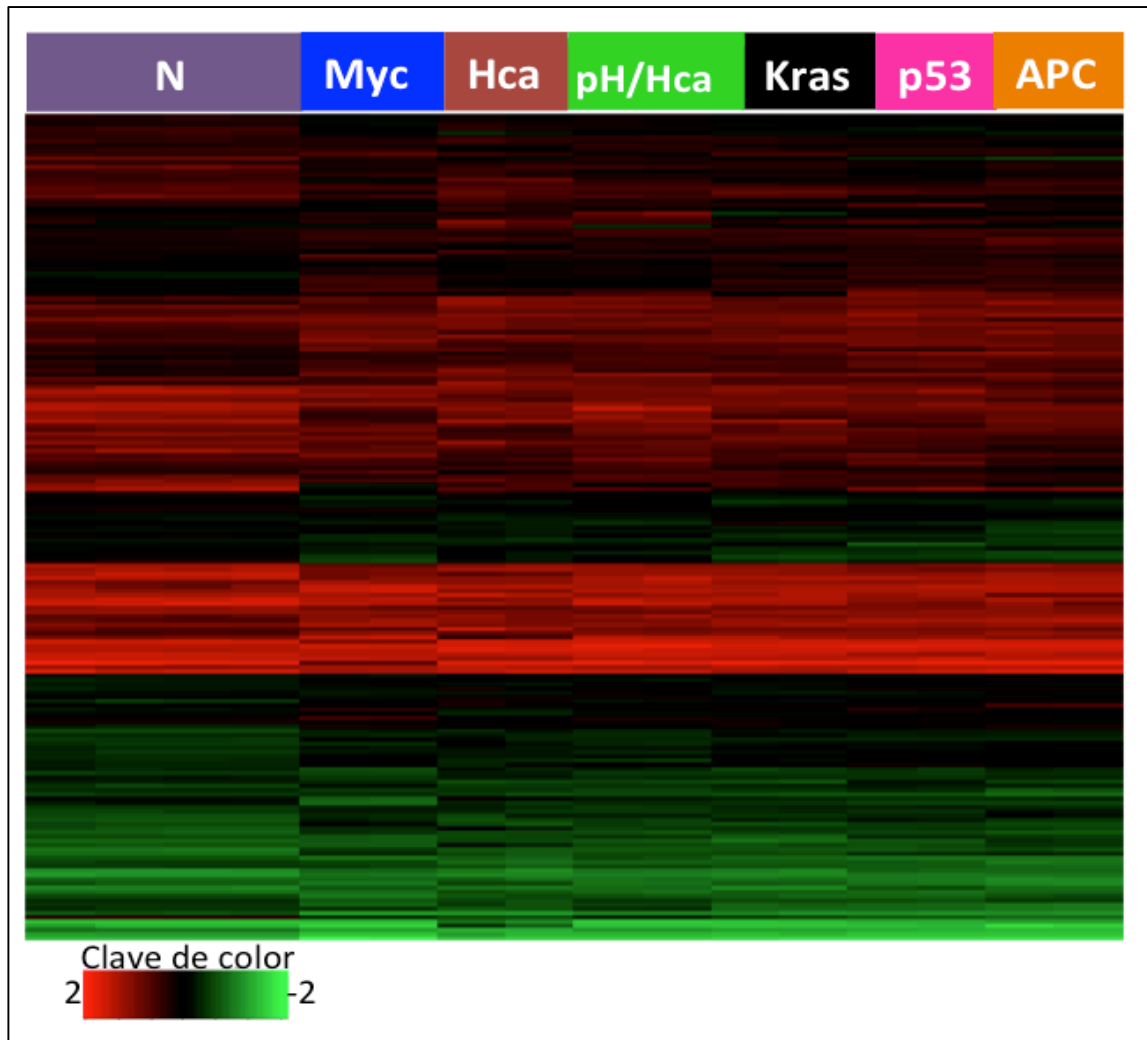


Figura 19. Perfil de expresión génica diferencial. El mapa de calor representa los resultados del perfil de expresión genética diferencial obtenido del análisis de expresión del conjunto de muestras sin tratamiento y después del tratamiento (**N**=Células sin tratamiento, **Myc**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases+Myc silenciado, **Hca**=Hipoxia cámara de gases, **pH/Hca**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases, **KRAS**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases+**KRAS** silenciado, **p53**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases+**p53** silenciado **APC**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases+**APC** silenciado), cada columna debajo de los subtítulos significan el número de replicas realizadas, es decir, 4 replicas para el control Normal y 2 replicas para cada uno de los tratamientos. Los colores representan la sobreexpresión (rojo) y sub expresión (verde).

7.12 Análisis de filtrado con enriquecimiento estadístico

Posteriormente se realizó un segundo análisis realizando un filtrado usando los datos del conjunto de sondas con una media de expresión mayor a 2 (fold change) y además aumentando la significancia estadística (prueba t student y de Kolmogorov con una $p < 0.5 \times 10^{-9}$), esto para reducir el mayor número de genes y determinar solo los genes altamente diferenciados. El resultado en este nuevo análisis arrojó un perfil génico de 557 genes altamente diferenciados sumados en todos los tratamientos evaluados (Figura 20). Se encontraron 125 genes en el silenciamiento de *APC* (92 sobre y 33 subexpresados), 166 genes en el silenciamiento de *P53* (151 sobre y 14 subexpresados), 153 genes en el silenciamiento de *Myc* (137 sobre y 16 subexpresado), 35 genes en el silenciamiento de *KRAS* (32 sobre y 3 subexpresados), pH/Hca 21 genes (20 sobre y 1 subexpresados), Hca 57 genes (54 sobre y 3 subexpresados). Estos genes tienen participación en una amplia gama de diferentes vías de señalización (integrinas, interleucinas, cadherinas, MAPK, *p53*, receptor de *EGFR* y *PI3K*) y en vías metabólicas (biosíntesis de alanina, andrógenos/estrógenos/progesterona, asparagina y aspartato y la glicolisis).



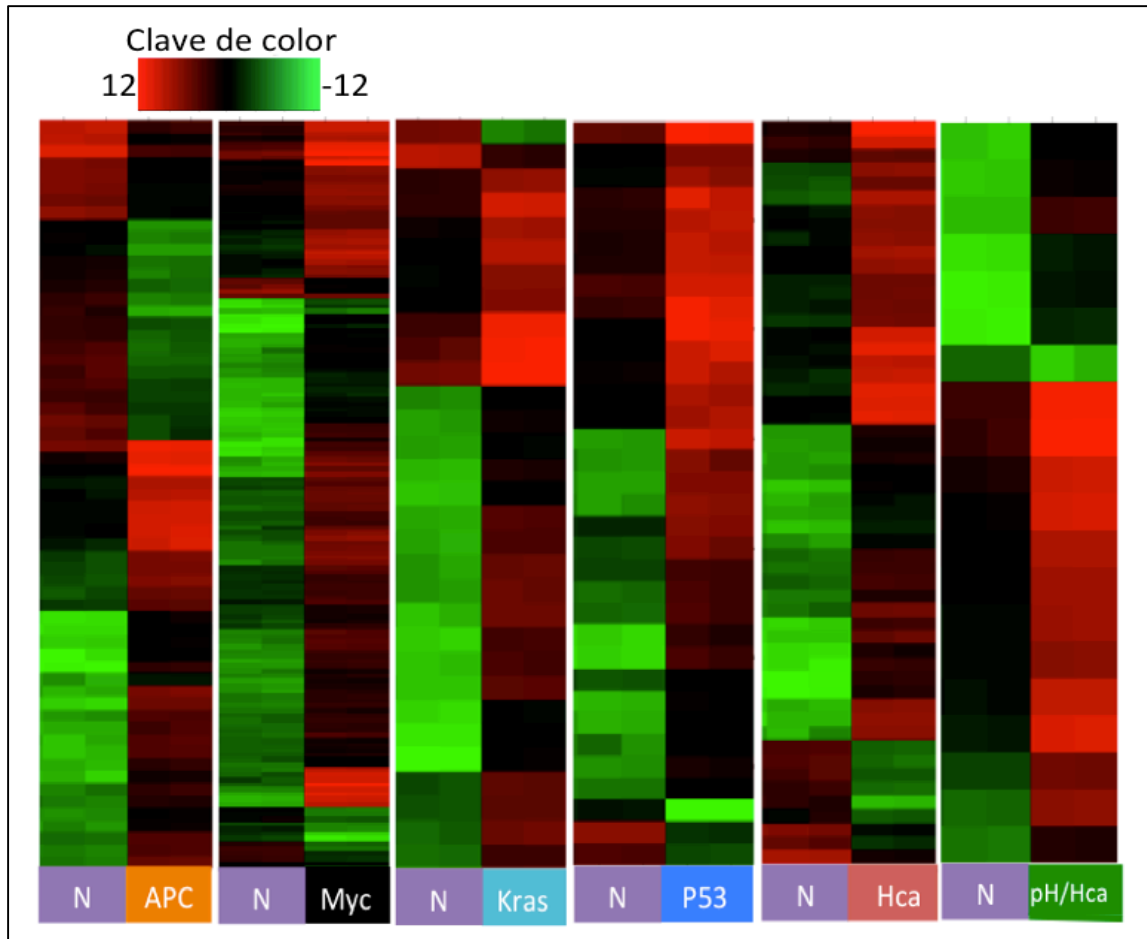


Figura 20. Perfil de expresión génica del modelo de estrés y silenciamiento. El mapa de calor es una representación grafica del análisis bioinformático de cada uno de los experimentos analizados comparados contra el normal (células sin tratamiento), donde se puede observar una gran similitud de los resultados, debido a que hay una gran homogeneidad en los tratamientos. (**N**=Células sin tratamiento, **Myc**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases +Myc silenciado, **Hca**=Hipoxia cámara de gases, **pH/Hca**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases, **KRAS**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases +KRAS silenciado, **TP53**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases +p53 silenciado **APC**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases +APC silenciado). Cada columna sobre los subtítulos significan el número de replicas analizadas, es decir, 2 replicas para cada uno de los tratamientos. Los colores representan la sobreexpresión (rojo) y subexpresión (verde).

7.13 Búsqueda de función molecular y participación en procesos biológicos

Con los datos de los microarreglos y con la ayuda del programa Panther pathways, se realizó un análisis de procesos biológicos y función molecular de los 557 genes altamente diferenciados. Los resultados de este análisis destacan la participación de 220 genes en procesos celulares (Ver figura 21 y 22), conformando interesantemente cinco vías de señalización principales: vías de señalización de *VEGF*, *RAS*, *PDGF* y *CCKR* y la vía de angiogénesis. Se encontraron 200 genes con participación en procesos metabólicos principalmente: biosíntesis del grupo Hemo, degradación de ornitina, biosíntesis de alanina, biosíntesis de andrógenos/estrógenos/progesterona, replicación de ADN, degradación de 5-hidroxitriptamina, biosíntesis de pirimidinas de novo, metabolismo del piruvato, biosíntesis de purinas de novo, biosíntesis de 2-araquidonoilglicerol, biosíntesis de isoleucina y Glicólisis. Además 160-170 genes con función molecular principalmente de unión que participan en vías de señalización como: la vía de señalización del receptor *EGF*, regulación del citoesqueleto, cadherinas e integrinas y de actividad catalítica principalmente con participación en vías de señalización tales como: receptores de unión a proteínas G y vía de las MAPK cinasas.



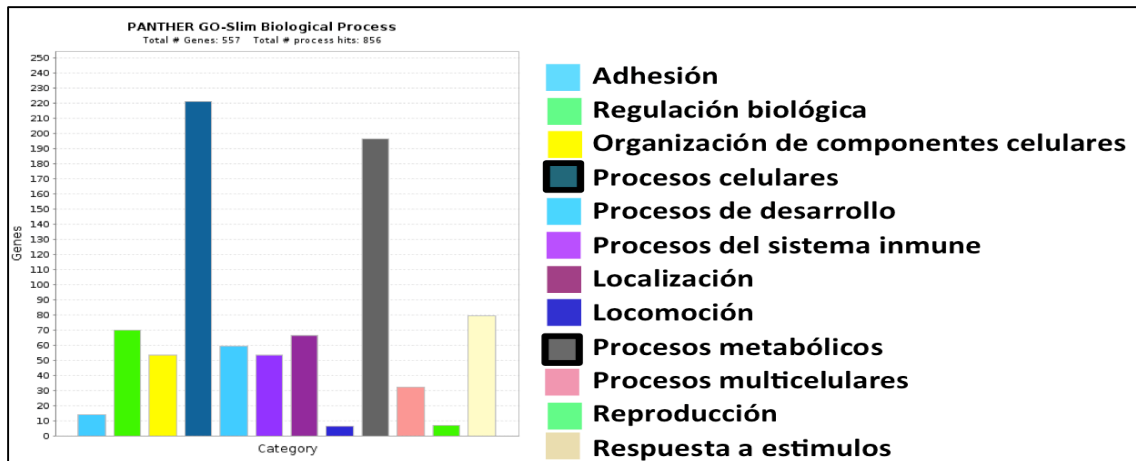


Figura 21. Procesos biológicos con participación de los genes diferencialmente expresados. Los procesos biológicos encontrados en el análisis realizado en panther a los 557 genes arrojó participación principalmente en vías celulares y procesos metabólicos (recuadros negros), con una participación de mas de 200 genes.

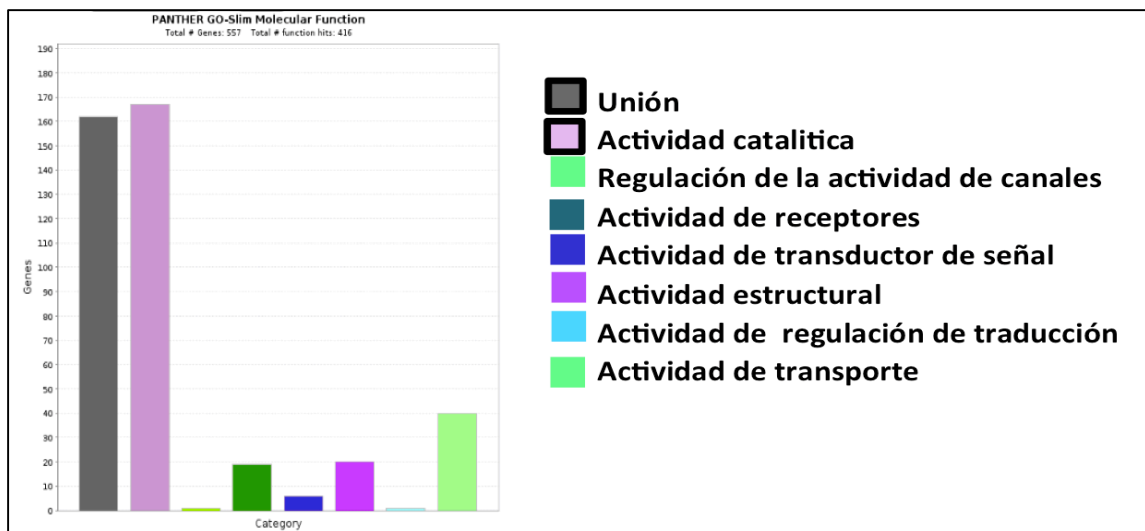


Figura 22. Resultado de análisis de función molecular de los genes diferencialmente expresados. Se encontró en el análisis de función génica realizado a los 557 genes una participación principalmente de genes de unión y con actividad catalítica.

A partir de los 557 genes identificados en el segundo filtrado del análisis anterior, se realizó un diagrama de Venn para determinar los genes en común en todos los tratamientos evaluados, este análisis redujo a un menor número de genes, identificándose 16 genes en los 5 tratamientos evaluados (Figura 23).

De los 16 genes que se encontraron 14 genes están sobreexpresados y 2 subexpresados, se realizó un heatmap (Figura 24) y una búsqueda de función de cada gen encontrado (Tabla 4).

7.14 Análisis Ontológico

Se realizó también un análisis ontológico a partir de los 557 genes diferencialmente expresados identificados en el filtrado con ayuda de diferentes programas tales como: GOrilla (Gene Ontology enRichment anaLysis and visualiZation tool) y REVIGO (reduce + visualize Gene ontology), para la búsqueda de la participación de los genes en vías metabólicas afectadas.



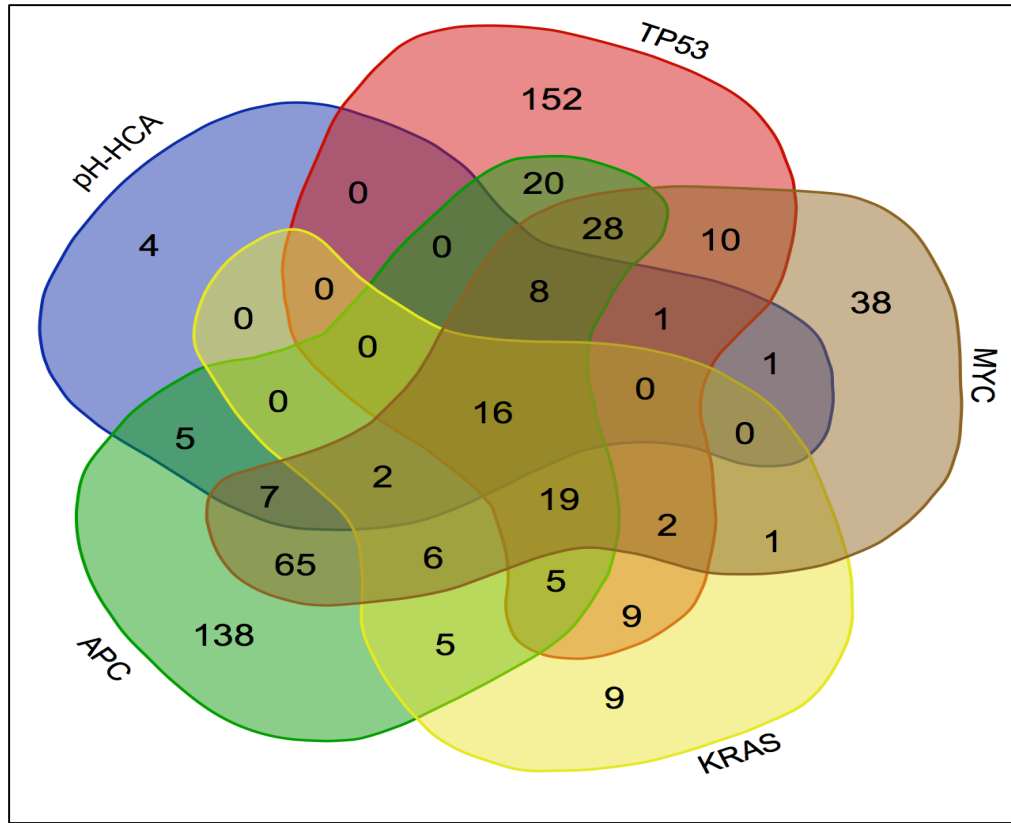


Figura 23. Diagrama de venn. En el diagrama de venn se destaca 16 genes que se encuentran presentes en todas las muestras analizadas en los diferentes tratamientos (**Myc**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases +Myc silenciado, **pH/Hca**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases, **KRAS**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases +KRAS silenciado, **p53**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases +p53 silenciado **APC**=Combinación pH/Hipoxia cámara de gases +APC silenciado).

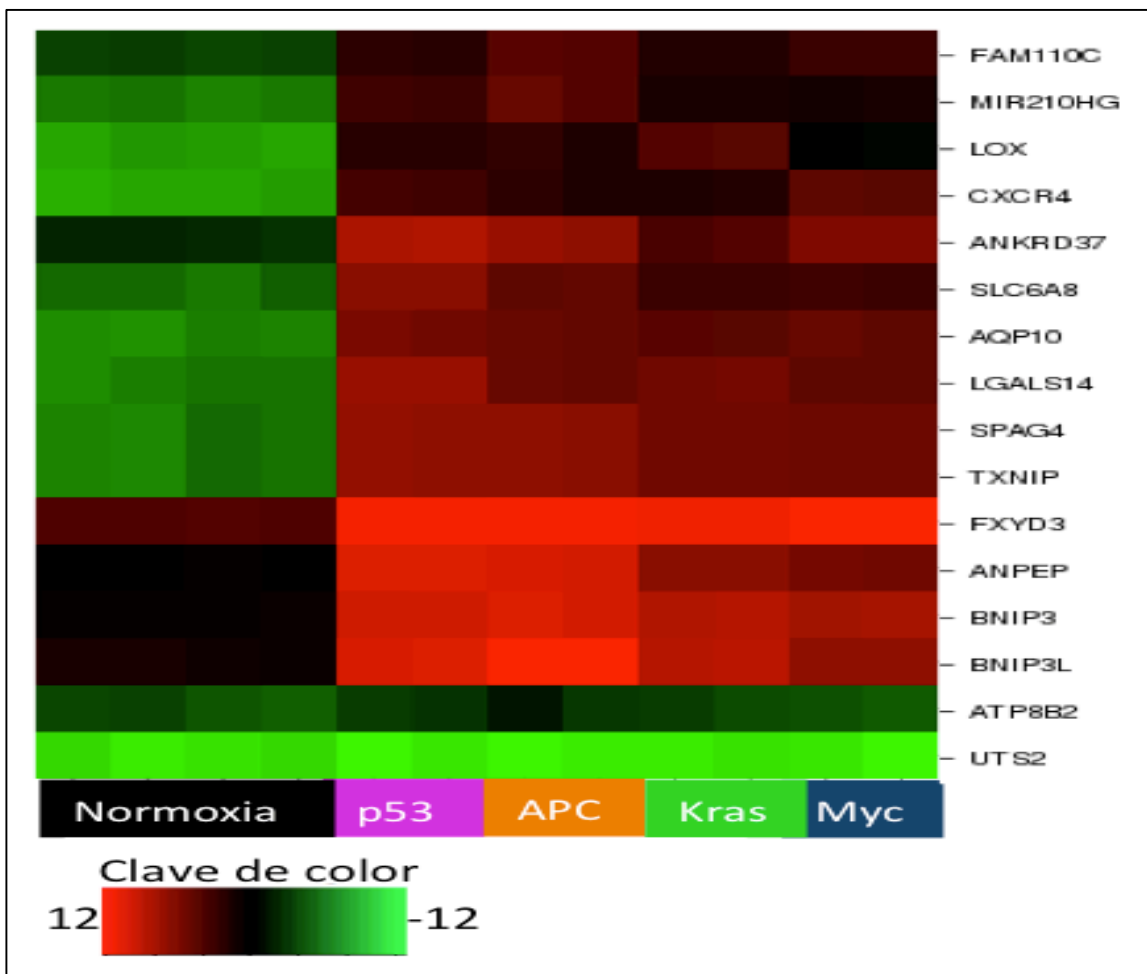


Figura 24. Mapa de calor de la firma génica obtenida. El mapa de calor representa los 16 genes identificados en el análisis de expresión génica realizado en el modelo de estrés (hipoxia y acidez) y silenciamiento de genes.

GEN	Función
FAM110C	Unión de alfa tubulina
MIR210HG	Regulación de expresión génica
LOX	Unión de iones cobre
CXCR4	Receptor de quimiocinas
ANKRD37	Migración e invasión
SLC6A8	Transportador dependiente de glucosa
AQP10	Proteína de membrana facilita el transporte de agua
LGALS14	Señalización de moléculas
SPG4	Transporte
TXNIP	Regulador del metabolismo celular
FXYD3	Actividad de canal iónico y unión
ANPEP	Relacionado a vías del sistema inmune
BNIP3L	Homodimerización de proteínas
BNIP3	Señalización
ATP8B2	Actividad ATPasa
UTS2	Vasoconstrictor

Tabla 4. Función molecular de los genes de la firma génica obtenida por microarreglos de expresión.

En el análisis ontológico se encontró genes que participan principalmente en procesos biológicos relacionados a regulación biológica, procesos metabólicos, respuesta a estímulos, procesos del sistema inmune, dentro de los procesos metabólicos se encontró principalmente genes participando en metabolismo de lípidos, procesos de oxido reducción, procesos catabólicos, procesos relacionados a metabolismo glicolítico, además se encontró genes que participan en respuesta a hipoxia (Figura 25).

Finalmente y en forma de correlación de los resultados anteriormente descritos, se encontró un perfil de expresión de 16 genes inducibles por estrés (hipoxia y acidez) y afectados por el silenciamiento de genes conductores de tumor, seis de estos genes coinciden con lo reportado por Sorensen en el 2015. De este perfil de 16 genes se destaca principalmente al gen *TXNIP*, ya que no ha sido reportado como un gen sensible a hipoxia, algunos de los otros genes ya empiezan a ser reportados como genes inducibles por hipoxia (*MIR210HG*).

En el análisis ontológico realizado a partir de 557 genes diferencialmente expresados se encontró principalmente la sobreexpresión de genes con una importante participación en el metabolismo celular. Se encontró genes involucrados en metabolismo de lípidos (síntesis y degradación), metabolismo glicolítico (Figura 26).

Estos hallazgos son sobresalientes ya que en los trabajos mas recientes solo se enfocan a reportar genes blanco de hipoxia sin relacionarlos a la función que cumplen dentro de los procesos celulares normales.



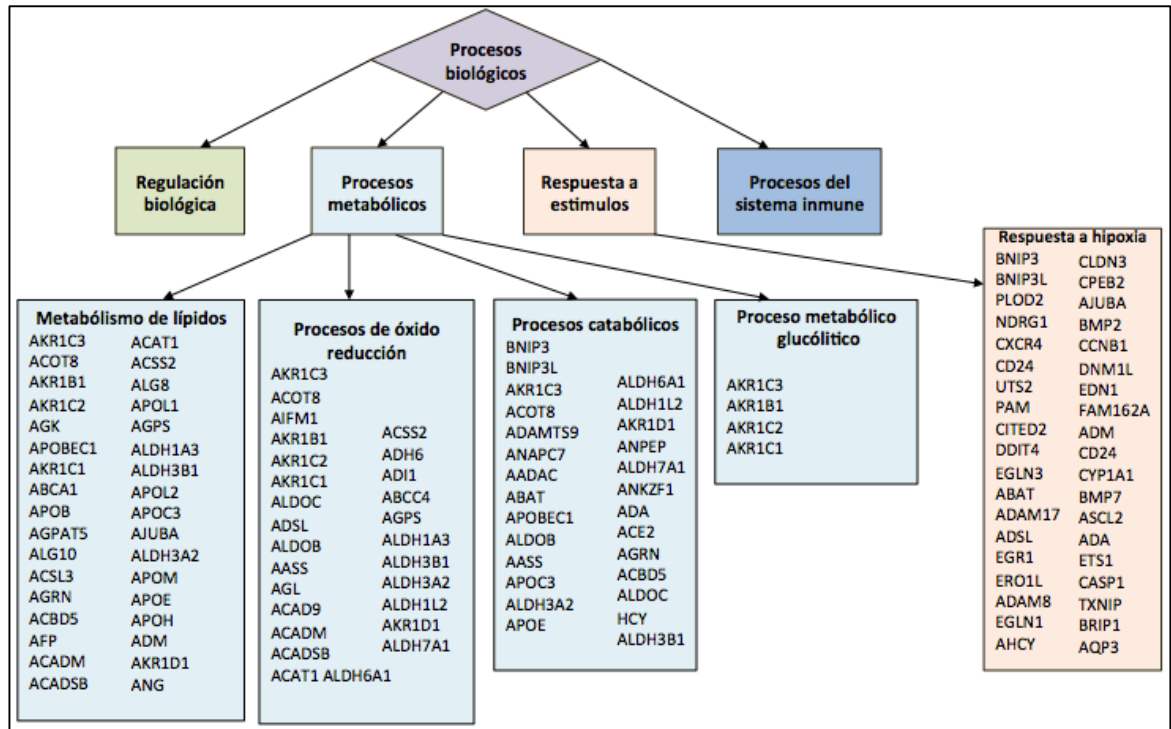


Figura 25. Diagrama del análisis ontológico de genes con participación en diferentes vías metabólicas. Mediante el análisis ontológico realizado en GOrilla se encontraron cuatro procesos biológicos importantes en los cuales participan la gran mayoría de los genes analizados (cuadros de color verde, celeste, rosa y azul), se resaltan la partición de genes en procesos metabólicos (cuadros celestes) dentro de los procesos metabólicos en los cuales participan los genes se encuentran metabolismo de lípidos, procesos de oxido-reducción, procesos catabólicos y del metabolismo glucolítico, en seguida se enlistan los genes con mayor participación.

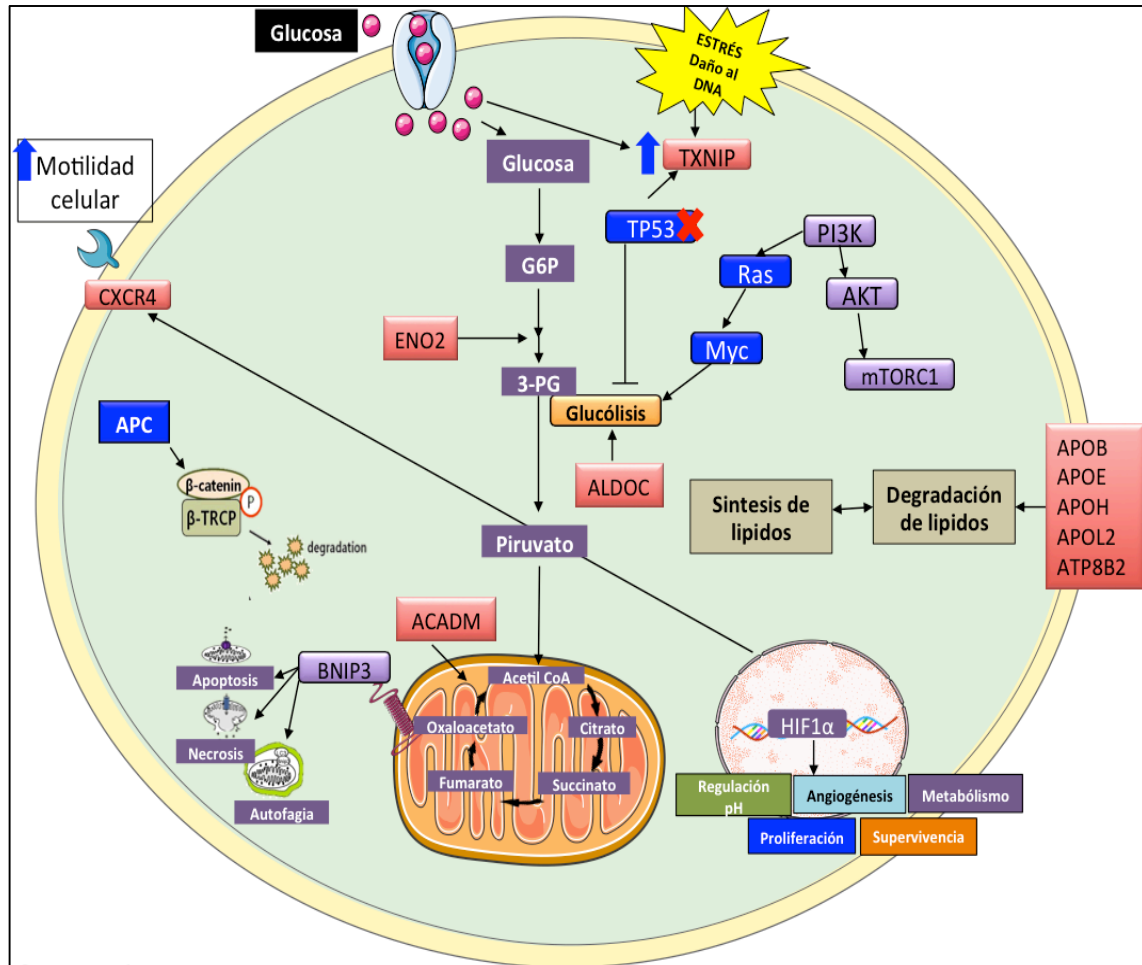


Figura 26. Esquema de integración de resultados. En el esquema se observa en recuadros rojos los principales genes encontrados que tienen una importante participación en el metabolismo de la célula tumoral, mayoritariamente en la síntesis o degradación de lípidos y en los procesos de glucólisis; la glucosa tiene un importante papel en el metabolismo, porque es requerida para todos los procesos celulares.

CAPÍTULO 8

Discusión

Existen diversas investigaciones en las que utiliza la inducción de hipoxia *in vitro* con uno o ambos de los métodos anteriormente descritos (inducción química y depleción de oxígeno). Y por lo general, la forma de verificar el modelo de hipoxia es a través de la elevación de la expresión de *HIF1 α* , sin embargo, en muy pocas ocasiones se hace el análisis de otros genes sensores de hipoxia y no analizan el efecto metabólico que se genera (Messineo et al., 2016; Zuo et al., 2016) (Talita Antunes Guimarães, 2016).

En general observamos que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el uso de ambos modelos evaluados, sin embargo, si encontramos diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$) entre los tiempos evaluados, los niveles del gen *HIF1 α* se elevan en ambos modelos, como respuesta a la hipoxia. Sin embargo, cuando se analiza la expresión del resto de los genes se observa una expresión variable en los diferentes tiempos evaluados, por ejemplo a las 6 h en el modelo de CoCl_2 , se observa la mayor expresión de todos los genes evaluados, dicha expresión disminuye y tiende a la normalización en los tiempos mas prolongados (48 y 72 h).



Contrastando con el modelo de la cámara de gases en donde el aumento de la expresión es gradual y mantenida hasta las 72 h. Esto indica que, en el modelo químico, las células normalizan el sistema rápidamente (3 a 6 h) y el efecto del CoCl_2 es rápidamente eliminado. Mientras que en el modelo de cámara de gases las células se van adaptando lentamente al cambio observándose un efecto dependiente del tiempo y el efecto metabólico en respuesta a hipoxia es mantenido. Nuestros resultados demuestran un patrón de expresión consistente en la expresión génica inducida por hipoxia en la cámara de gases en el modelo *in vitro*.

Estas observaciones deben considerarse cuando se va a seleccionar alguno de estos modelos y considerar si el efecto que se desea cuantificar se analizará en las primeras horas (3 a 6 h) o a tiempo mas prolongado (Zeng et al., 2011). Existen muchos reportes en la literatura en los que han utilizado el modelo químico y la evaluación de la expresión de genes de interés la realizaron a las 72 h. Es altamente probable que las observaciones que se obtuvieron no son válidas ya que las mediciones se realizaron cuando el efecto de hipoxia no existía.

El análisis estadístico realizado comparando los tratamientos (hipoxia química e hipoxia con disminución de los niveles de oxígeno) no mostro diferencia significativa entre los modelos evaluados, sin embargo, si hubo diferencia significativa entre los tiempos (0, 3,6,24,48 y 72 h); debido a esto es muy



importante la selección del tiempo para asegurarnos de obtener los mismos efectos en la inducción de hipoxia.

Existe un trabajo reportado por Danli Wu en el 2011 donde se describen ambos métodos y como validarlos, pero solo menciona la cuantificación de *HIF1 α* como marcador de hipoxia (Wu & Yotnda, 2011). Esta es la primera vez que ambos modelos se comparan en diferentes condiciones además de evaluar un mayor número de genes la expresión inducida por *HIF1 α* , encontrando que el efecto de inducción de hipoxia es sensible al tiempo y este es diferente en los modelos evaluados.

En un estudio *in vitro* se demostró que CA9 es hasta 100 veces regulada positivamente bajo hipoxia en células FaDu (Sorensen et al., 2007). Esta diferencia podría deberse a la alta heterogeneidad en el tumor, con áreas no solo caracterizadas por bajo nivel de oxígeno sino también por bajo pH. Estos datos son similares con nuestros resultados, CA9 fue el gen que mayor sobreexpresión mostro en los ensayos de inducción de hipoxia (ver figura 10).

Zeng en el 2011 reportó resultados de viabilidad y apoptosis similares a lo encontrado en el presente trabajo.

HIF1 α regula genes blanco en diversas vías biológicas, principalmente y bien caracterizados están involucrados genes en la regulación del suministro de oxígeno y su utilización a través de la angiogénesis. Con el fin de coordinar el uso más eficiente del oxígeno por la célula, *HIF1 α* activa genes importantes de



reprogramación metabólica que cambia la dependencia energética de la alta demanda de oxígeno y la glucólisis. Los genes que codifican esencialmente todas las enzimas glicolíticas están directamente regulados por *HIF1 α* (Benita et al., 2009, Semenza, 2012). *HIF1 α* también regulan genes blanco que aumentan la distribución del suministro de oxígeno disponible, tales como *EPO*, *VEGF* y sus receptores *FLT1* y *FLK1*, así como *END1* y *ANGPT1* (Takeda et al., 2004).

Además de las vías importantes para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno, Además, *HIF1 α* regula genes implicados en la autofagia, la apoptosis, la homeostasis redox, la inflamación, respuesta inmune, autorenovación, metástasis e invasión (Wenger et al, 2010).

En este estudio, se evaluó la expresión génica global de la líneas celular de Adenocarcinoma colorectal humana (Caco-2) expuesta a una concentración de oxígeno (1%) y a un pH de 6.7 y silenciando 4 genes individualmente se analizó mediante microarreglos para identificar genes regulados positivamente por hipoxia.

Se utilizaron los datos de expresión de genes de microarreglos Affymetrix (U133 Plus v2.0), para identificar una firma de 16 genes sensibles a hipoxia. Se utilizó un enfoque de análisis con diferentes criterios, que permitió distinguir genes de cada tratamiento, se buscaron conjuntos de genes comunes a través de los diferentes tratamientos(Digrama de venn). Estos 16 genes componen un perfil



hipóxico no influenciado por factores micro ambientales (*CXCR4*, *SPAG4*, *LGALS14*, *LOX*, *ATP8B2*, *FXYD3*, *FAM110C*, *PPBP*, *ANPEP*, *BNIP3L*, *BNIP3*, *MIR210HG*, *SLC6A8*, *ANKRD37*, *AQP10*, *UTS2*) presentes en todas las combinaciones analizadas (pH-Hca-KRAS, pH-Hca-TP53, pH-Hca-Myc, pH-Hca-APC). Por lo tanto, los genes que están regulados positivamente por hipoxia independientemente de otros factores en el microambiente pueden ser marcadores más consistentes de hipoxia tumoral.

Voellenkle en el 2016 reportó 5 genes (*H19*, *MIR210HG*, *MEG9*, *MALAT1* y *MIR22HG*) inducidos por hipoxia (RNA-sequencing), primer trabajo que reporta la sobreexpresión del ARN no codificante largo (*MIR210HG*) inducido por hipoxia, el ARN no codificante largo (*MIR210HG*), también se encontró dentro de nuestros genes sensibles a hipoxia.

Sorensen et. Alabama. en 2015 informó una firma de 15 genes de hipoxia regulada como un perfil de hipoxia universal en varios tipos de células cancerosas. Nuestros datos se correlacionan con los genes *LOX*, *ANKR37*, *BNIP3L*. Estos datos sugieren que estos tres genes están altamente regulados por el efecto de la hipoxia. Por lo tanto, proponemos que los genes *LOX*, *ANKR37*, *BNIP3L* podrían agregarse potencialmente como genes universales de hipoxia junto con *HIF1 α* , *EPO*, *VEGF*, *GLUT1*, *CA9* y *LDH* ya ampliamente estudiados.

BNIP3 es un gen pro-apoptico, se sobre-expresa en diversos tipos de cáncer, Singers en el 2015 lo reporta como un gen inducible por hipoxia, su papel es



controversial se hipotetiza que la hipoxia genera mutaciones que modifica su función pro-apoptica, generando tumores resistentes a terapia.

Morrison en el 2014 reportó al gen *TXNIP* como un gen supresor de tumor, ya se ha asociado a diferentes tipos de cáncer, sin embargo, no se ha reportado como un gen sensible de hipoxia, este trabajo, sería el primer reporte que muestre evidencia de ser un gen inducible por hipoxia.

Hay pocos trabajos que reportan la asociación de genes con participación metabólica que son inducidos por estrés (hipoxia y acidez) Bogaerts et al, 2013.

Este trabajo esta enfocado en la búsqueda de genes con participación en procesos metabólicos influenciados por condiciones de estrés (hipoxia y acidez) y silenciamiento de genes. La interpretación funcional de genes significativos en el contexto de las redes moleculares y la relevancia de las vías canónicas se generó mediante el uso de Panther, GOrrilla y REVIGO. Los genes regulados positivamente después del tratamiento (hipoxia y acidez) se detectaron en las vías relacionadas al metabolismo, regulación de procesos biológicos, respuesta a estímulos y de respuesta a sistema inmune. Si bien la mayoría de los genes estaban implicados en las rutas de glucólisis, síntesis y degradación de lípidos, oxido reducción y de respuesta a hipoxia.

Singers en el 2015 reporta nuevos genes blanco de hipoxia, pero sin relacionarlos a la función metabólica que desempeñan.

En nuestro trabajo se muestra evidencia de nuevos genes blancos de hipoxia y su participación en diferentes vías metabólicas (Figura 26).



Sería importante aprender más sobre la función de los sensores de oxígeno y genes clave en el metabolismo en condiciones de hipoxia y estrés, así como también son necesarios estudios de expresión y de metilación para ampliar el conocimiento en esta área y para evaluar mejor el efecto de la hipoxia en los mecanismos de progresión de cáncer y metabolismo de las células tumorales.



CAPÍTULO 9

Conclusiones

- En el presente estudio se realizó la implementación de dos modelos de hipoxia (hipoxia química e hipoxia mediante depleción de los niveles de oxígeno), además de un modelo de acidez *in vitro*, los cuales fueron validados a través de la sobre expresión nivel transcripcional del gen HIF1 además de 5 genes sensibles a hipoxia (*EPO*, *VEGF*, *LDH*, *CA9*, *GLUT1*). El modelo químico presento una sobreexpresión en forma temprana (6 h), contrario al modelo de inducción de hipoxia con cámara de gases que la sobreexpresión se vio favorecida con el tiempo y esta se mantuvo hasta las 72 h.
- Se determino que la viabilidad se ve favorecida en el modelo de inducción de hipoxia con cámara de gases, mientras que en la hipoxia química no hay diferencias en la viabilidad celular esto con respecto al control normal.
- En el modelo de hipoxia con cámara de gases la apoptosis disminuyo, estos datos sugieren que la concentración de oxígeno es necesaria para la iniciación de apoptosis.
- Se logro el silenciamiento de 4 genes asociados a cáncer, además de determinar el efecto cuando existe la sub expresión de estos genes y están expuestos bajo condiciones de hipoxia y acidez, identificándose una firma de 16 genes blanco de hipoxia mediante el análisis de la



expresión génica global en los diferentes grupos de tratamientos (Normal, Hipoxia, Hipoxia/pH, Hipoxia-pH-genes silenciados).

- Se logro identificar genes altamente diferenciados que participan principalmente en vías metabólicas (metabolismo de lípidos, procesos de degradación, procesos de óxido reducción, degradación de moléculas pequeñas).
- Los resultados sugieren que bajo las condiciones evaluadas, el estrés (hipoxia y acidez) del microambiente permite la activación de diversas vías que involucran el metabolismo de la célula tumoral, principalmente la vía de síntesis/degradación de lípidos.
- En este estudio *in vitro* se identificaron genes que regulados positiva o negativamente por la hipoxia con influencia de pH ácido (pH 6.7). Los genes identificados aquí representan nuevos potenciales candidatos para marcadores de hipoxia junto con *HIF1 α* , *EPO*, *VEGF*, *GLUT1*, *CA9* y *LDH* ya ampliamente estudiados. Además de que el hallazgo de la vía metabólica más afectada por estas condiciones fue la de síntesis y degradación de lípidos, que esta poco analizada y puede ser una área con mucho potencial para estudios futuros.



Anexos

Protocolos

Expansión de células (CaCo-2)

1. Descongelar un vial de células CaCo-2 (-80°C)
2. Añadir en un tubo falcon de 15 ml con 5 ml de medio de cultivo
3. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos
4. Resuspender el botón de células en 1 mL de medio de cultivo DMEM
5. Colocar en una botella de T75 10 mL de medio mas 1 mL de donde se resuspendieron las células
6. Incubar las células a 37° C y 5% CO₂.

Inducción de Hipoxia (cámara de gases)

1. Plaquear 150 000 células por pozo en una placa de 6 pozos.
2. Incubar 24 h para permitir que las células se adhieran
3. Abrir ambos puertos de entrada y salida de la cámara de hipoxia
4. Conectar el tubo de entrada del puerto de Tygon a una fuente que contiene la mezcla de gas deseada (5% Dióxido de carbono, 1% Oxígeno y 94% de Nitrógeno).
5. Dejar los dos puertos de la cámara abiertos durante este procedimiento.
6. ADVERTENCIA: No exceda de 2 psi por encima de la presión atmosférica dentro de la cámara de hipoxia.
7. Purgar la cámara a una velocidad de 20 litros/minuto (2 psi) de 4-5 minutos.



8. Después que la cámara ha sido purgada, desconecte la fuente de gas.
9. Coloque la cámara en una incubadora a 37° C y 5% CO₂ a los diferentes tiempos de incubación deseada.

Inducción de Hipoxia química (CoCl₂)

- Preparar un stock de cloruro de cobalto (CoCl₂) 25 Mm
- Agregar 4 µL del un stock de cloruro de cobalto a un mL de medio de cultivo (DMEM) para tener una concentración de 100 µM.
- Calcular el volumen que se va a utilizar en cada ensayo

NOTA: La solución de cloruro de cobalto debe ser preparada en el momento.

Modificación de pH del medio de cultivo

Preparar soluciones stock de los buffer MOPS y HEPES a una concentración de 25 Mm, agregar 10 mL de buffer en 40 mL de medio de cultivo.

Medir pH con un potenciómetro y ajustar al final el pH deseado con HCl 1 M.

Protocolo extracción de ARN con trizol

1. Centrifugar la pastilla de células a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C; remover el sobrenadante y desecharlo.
2. Agregar 800 µL de trizol y agitar hasta disolver la pastilla
3. Agregar 200 µL de cloroformo.
4. Agitar vigorosamente 15 segundos e incubar 10 minutos.
5. Centrifugar a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo con 500 µL de isopropanol.



7. Invertir cuidadosamente e incubar 1 hora a -20°C .
8. Centrifugar a 15000 rpm por 10 minutos a 4°C y descartar sobrenadante.
9. Agregar 1 mL de etanol a 70% y desprender la pastilla agitando suavemente.
10. Centrifugar a 7600 rpm por 5 minutos a 4°C ; descartar sobrenadante hasta sequedad.
11. Dejar evaporar completamente el etanol.
12. Agregar 40 μL de agua libre de nucleasas, resuspender el pellet por pipeteo.
13. Cuantificar el ARN y almacenar a -20°C ó a -70°C hasta su uso.

Purificación del ARN en columna “RNeasy MinElute cleanup kit Qiagen”

1. Preparar el mix DNasa y buffer
2. Mezclar por cada muestra en un tubo de microcentrifuga
 - 87.5 μL de ARN
 - 10 μL de buffer RDD
 - 2.5 μL de solución de stock de DNasa IHasta completar un volumen total de 100 μL .
3. Incubar la mezcla 10 min a TA.
4. Adicionar 350 μL de buffer RTL y mezclar.
5. Agregar 250 μL de alcohol etílico absoluto y mezclar por pipeteo.



6. Transferir la mezcla (700 μ L) a la columna dentro del tubo, cerrar la tapa y centrifugar a 8000 g por 20 s. Descartar el tubo y poner uno nuevo.
7. Adicionar 500 μ L de buffer RPE a la columna y centrifugar a 8000 g por 20 s. Descartar el tubo y poner uno nuevo.
8. Agregar 500 μ L de alcohol etílico al 80% y centrifugar a 8000 g por 2 min. Descartar el tubo y poner uno nuevo.
9. Con la tapa abierta centrifugar la columna a toda velocidad por 5 min. Descartar el tubo y poner la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL.
10. Adicionar 14 μ L de agua libre de RNasa en el centro de la columna (caliente a 60°C) y centrifugar durante 1 min a máxima velocidad.
11. Repetir el mismo pasó utilizando el mismo eluido para obtener un ARN más concentrado.
12. Almacenar la muestra a -80°C.

Retrotranscripción (RT-PCR)

1. Preparar la reacción de acuerdo a la siguiente tabla
2. Use hasta 2 μ g de ARN total para una reacción de 20 μ L de volumen final.
3. Prepare un master mix 2x usando los componentes siguientes:



Componente	Volumen por reacción (µL)
RT buffer 10x	2.0
dNTP's mix 2x (100mM)	0.8
RT Random primers 10x/Oligo dt	2.0
MultiScribe Transcriptasa Reversa	1.0
RNase Inhibitor	1.0
Agua libre de nucleasas	3.2
Volumen final por reacción	10.0

4. Agregar 10 µL del master mix a 10 µL de A RNA la concentración elegida (100- 1000 ng/µL)
5. Correr el siguiente programa del termociclador

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 seg	∞

Reacción de qPCR con SyBr Green

1. Preparar el siguiente mix de reacción para cada par de primer.

Componente	Volumen (µL)
Agua	1.5
Primer F	1
Primer R	1
Master Mix 2x	5
cDNA	1.5
Volumen total	10



2. Poner la reacción de qPCR en el equipo Light Cycler 480

Protocolos Western Blot

Extracción de proteínas

1. Quitar medio de cultivo a la caja de cultivo.
2. Lavar con PBS frío.
3. Agregar un volumen 1:1 de buffer RIPA y complete
4. Raspar con scraper toda la botella
5. Recuperar el líquido en un tubo falcon de 15 mL
6. Sonicar 30 segundos.
7. Almacenar el extracto a -80 hasta su uso.

Cuantificación de proteínas

Método de Bradford en microplaca

1. Prepara una solución stock de BSA 1mg/mL
2. Diluir 1:1 la para tener una solución de 0.5 mg/mL
3. Pipetear los volúmenes de la siguiente tabla en una microplaca (todos los puntos se realizan por duplicado)
4. Leer la microplaca en un lector de ELISA a 595 nm.
5. Construir la curva estándar , calcular la R^2 y la ecuación de la recta para calcular la concentración de las muestras.



Concentración de proteína $\mu\text{g/mL}$	H ₂ O (μL)	BSA 0.5 mg/mL (μL)	Reactivo de Bradford (μL) (dilución 1:5)
0	40	0	180
0.5	39	1	180
1	38	2	180
1.5	37	3	180
2	36	4	180
2.5	35	5	180
3	34	6	180
Muestra (directa)	39	1	180

Preparación de geles de acrilamida

1. Montar el casete
2. Preparar la solución mezclando todos los reactivos excepto TEMED y APS, según el porcentaje del gel (ver tabla siguiente):

Gel / porcentaje	H ₂ O (mL)	Acrilamida/Bis (mL)	Buffer* (mL)	SDS 10% (mL)
4%	6.1	1.3	2.5	0.1
6%	5.4	2.0	2.5	0.1
8%	4.7	2.7	2.5	0.1
10%	4.1	3.3	2.5	0.1
12%	3.4	4.0	2.5	0.1
14%	2.7	4.7	2.5	0.1
16%	2.1	5.3	2.5	0.1

*Gel separador – Tris HCl 1.5 M pH 8.8

*Gel separador – Tris HCl 0.5 M pH 6.8



2. Agregar a la mezcla

Gel separador: APS 100 μ L, TEMED 10 μ L.

Gel concentrador: APS 100 μ L, TEMED 20 μ L.

3. Preparar y dejar polimerizar el gel separador por lo menos 30 minutos, preparar y dejar polimerizar el gel concentrador.
4. Las muestras se descongelan y se mantienen en hielo, cada carril de gel se carga con 30 μ g de proteína se mezcla con Laemmli Sample Buffer hasta un volumen final de 20 μ L por pozo, las muestras se someten a calentamiento (94°C) para desnaturalizarlas.
5. Cargar muestras y marcador Precision Plus Protein All Blue Standards.
6. Correr el gel en buffer de corrida a 120 V por aproximadamente 2 h
7. Al termino de la corrida, sacar el gel y ponerlo a equilibrar en buffer de transferencia frio aproximadamente 15 minutos.
8. Cortar la membrana y ponerla en metanol 15 segundos, agua 2 minutos y en buffer de transferencia 10-15 minutos.
9. Pasado este tiempo hacer el sándwich gel-membrana
10. Iniciar corrida de transferencia 30 V durante toda la noche en frio.

Revelado de membrana

1. Prender el equipo Chemi doc (Biorad), cámara y computadora.
2. Ajustar zoom, nitidez y abrir el iris utilizando una plantilla de fluorescencia.



3. Mezclar buffer A y B en la misma proporción (1:1) agregar sobre la membrana y dejar incubar 5 minutos en la oscuridad.
4. Poner la membrana dentro del equipo, seleccionar tiempo de exposición (50, 80 y/o 120 segundos).
5. Guardar imagen en formato .JPG.

Protocolo de Viabilidad Celular

Kit CellTiter-Glo

1. Sembrar 15000 células por pozo en una placa blanca de 96 pozos fondo claro.
2. Incubar 24 h para permitir que las células se adhieran a la placa.
3. Preparar medio acidificado a pH 6.7, 6.5 y 6.9 y agregar CoCl_2 a una concentración de 100 μM por pozo ó colocarlo en la cámara de hipoxia y dejar incubar por 0, 24, 48 y 72 h.
4. Pasado los tiempos de incubación, equilibrar la placa a temperatura ambiente aproximadamente 30 minutos.
5. Agregar un volumen del reactivo CellTiter-Glo (por ejemplo 100 μL de medio con células y 100 μL de reactivo)
6. Mezclar por dos minutos la placa
7. Hacer la lectura en el equipo Glomax.

Protocolo de Apoptosis

Kit Caspase Glo (3/7)



1. Sembrar 15000 células por pozo en una placa blanca de 96 pozos fondo claro.
2. Incubar 24 h para permitir que las células se adhieran a la placa.
3. Preparar medio acidificado a pH 6.7, 6.5 y 6.9 y agregar CoCl_2 a una concentración de 100 μM por pozo ó colocarlo en la cámara de hipoxia, dejar incubar por 0, 24, 48 y 72 h.
4. Pasado los tiempos de incubación, equilibrar la placa a temperatura ambiente aproximadamente 30 minutos.
5. Agregar un volumen del reactivo Caspase Glo (3/7) (por ejemplo 100 μL de medio con células y 100 μL de reactivo)
6. Mezclar por dos minutos la placa
7. Hacer la lectura en el equipo Glomax.

RNA de interferencia

1. Sembrar 20 000 células por pozo en una placa de 96 pozos
2. En un tubo preparar un mix de complejo de transfección (Agente transfectante + iRNA para el gen de interés) en medio Optimem, incubar a temperatura ambiente de 10 – 15 minutos.
3. Agregar 100 μL del complejo de transfección a las celular plaqueadas en cada pozo.
4. Incubar durante 24, 48 y 72 h



- Verifique el silenciamiento del gen de interés mediante qPCR, midiendo la expresión de los controles incluidos en el Kit (control positivo GAPDH, control Negativo Scramble), además de incluir controles de células sin tratamiento, células solo con agente transfectante y células solo con iRNA.

Microarreglos de expresión génica

Preparación de los controles de Poly A

- Colocar el Buffer de dilución y el control de Poly A, a temperatura ambiente durante 15-20 minutos hasta que se descongelen completamente.
- Prepare las diluciones del control poly A como se indica en la siguiente tabla:

Total RNA Input Amount	Serial Dilutions				Volume of 4 th Dilution to Add to Total RNA
	1 st Dilution	2 nd Dilution	3 rd Dilution	4 th Dilution	
50 ng	1:20	1:50	1:50	1:20	2 µL
100 ng	1:20	1:50	1:50	1:10	2 µL
250 ng	1:20	1:50	1:50	1:4	2 µL
500 ng	1:20	1:50	1:50	1:2	2 µL

- Las muestras de ARN deberá ser mezclada con el la dilución del control dependiendo de la concentración inicial de ARN.

Por ejemplo para preparar diluciones de Poly-A para 100 ng de ARN total:



- a. Agregue 2 μL del stock del control de Poly-A a 38 μL del buffer de dilución para la primera dilución (1:20).
- b. Agregue 2 μL de la primera dilución a 98 μL de buffer de dilución Poly-A para preparar la segunda dilución (1:50).
- c. Agregue 2 μL de la segunda dilución a 98 μL de buffer de dilución Poly-A para preparar la tercera dilución (1:50).
- d. Agregue 2 μL de la tercera dilución a 18 μL de buffer de dilución Poly-A para preparar la cuarta dilución (1:10).
- e. Agregue 2 μL de la cuarta dilución a 100 ng 98 de ARN total. El volumen final de ARN total con el control de poly A diluido no debe ser mayor a 5 μL .

Preparación de ARN Total

Es necesario verificar la calidad e integridad del RNA total mediante el uso de Agilent 2100 Bioanalyzer con un ARN LabChip Kit o equivalente, el valor del ARN Integrity Number (RIN) debe ser ≥ 8 .

Síntesis de la primera cadena



1. Prepare el master mix de la primera cadena como se describe en la siguiente tabla:

Component	Volume for One Reaction
3' First-Strand Buffer	4 μ L
3' First-Strand Enzyme	1 μ L
Total Volume	5 μL

2. Agregue la alícuota de master mix a cada tubo con el ARN total
3. incube por 2 h a 42°C, después 2 min at 4°C.

Síntesis de la segunda cadena

1. Prepare el master mix de la segunda cadena como se indica en la siguiente tabla:

Component	Volume for One Reaction
Nuclease-free Water	13 μ L
3' Second-Strand Buffer	5 μ L
3' Second-Strand Enzyme	2 μ L
Total Volume	20 μL

2. Incube por 1 hora a 16°C, después 10 minutos a 65°C y 2 minutos a 4°C.

Síntesis del cRNA marcado mediante la transcripción *in vitro*

1. Prepare el master mix IVT de acuerdo a la siguiente tabla:

Component	Volume for One Reaction
3' IVT Biotin Label	4 μ L
3' IVT Buffer	20 μ L
3' IVT Enzyme	6 μ L
Total Volume	30 μL



3. Incube de 4-16 h a 40°C, después a 4°C.

Purificación del cRNA marcado

1. Mezclar las perlas de purificación, agregar 100 μL de perlas a cada 60 μL de muestra de cRNA mezclar y transferir a una placa, incubar por 10 minutos.
2. Colocar la placa sobre el stand magnético e incubar 5 minutos, descartar sobrenadante y mantener la placa en el stand magnético.
3. Agregar 200 μL de etanol al 80% e incubar por 30 segundos, descartar lentamente el etanol, repetir el paso 1 y 2 hasta completar 3 lavados. Secar al aire por 5 minutos.
4. Remover la placa del stand magnético y agregar 27 μL de agua libre de RNAsa precalentada e incubar 1 minuto.
5. Mezclar por pipeteo 40 veces, colocar la placa en el magneto por 5 minutos, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo

Cuantificación del cRNA

Cuantificar el cRNA marcado con nanodrop, se requiere al menos 15 μg de cRNA en 32 μL .

Fragmentación del cRNA

1. Preparar la cantidad de cRNA marcado en hielo (468.75 ng/ μL mínimo por μL).



- Preparar la reacción de fragmentación como se indica en la siguiente tabla.

Component	49 or 64-Format	100 or 81/4-Format	169, 400-Format, or Array Plate	Array Strip	
Labeled cRNA	15 µg (in 32 µL)	12 µg * (in 25.6 µL)	12 µg (in 25.6 µL)	7.5 µg (in 16 µL)	9.4 µg (in 20 µL)
3' Fragmentation Buffer	8 µL	6.4 µL	6.4 µL	4 µL	5 µL
Total Volume	40 µL	32 µL	32 µL	20 µL	25 µL

- Incubar 35 minutos a 94°C y 4°C por 2 minutos, centrifugar y colocar en hielo.

Hibridación

- Prenda el horno de hibridación de Affymetrix® a una temperatura de 45°C y 60 rpm.
- Equilibre los arreglos a temperatura ambiente antes de su uso, marque cada arreglo con el nombre de la muestra con el que será equilibrado.
- Prepare el master mix de hibridación de acuerdo a la siguiente tabla:

Component	49 or 64-Format	100 or 81/4-Format	169 or 400-Format	Final Concentration
Control Oligo B2 (3 nM)	3.7 µL	3.3 µL	1.7 µL	50 pM
20X Hybridization Controls (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>)	11 µL	10 µL	5 µL	1.5, 5, 25, and 100 pM respectively
2X Hybridization Mix	110 µL	100 µL	50 µL	1X
DMSO	22 µL	20 µL	10 µL	10%
Nuclease-free Water	43.9 µL	40 µL	20 µL	
Total Volume	190.6 µL	173.3 µL	86.7 µL	



4. Agregue 200 μL de mix de pre-hibridación, incube de 30-40 minutos a 45°C y 60 rpm.
5. Prepare el coctel de hibridación como se muestra en la siguiente tabla:

Component	49 or 64-Format	100 or 81/4-Format	169 or 400-Format	Final Concentration
Hybridization Master Mix	190.6 μL	173.3 μL	86.7 μL	
Fragmented and labeled cRNA	29.4 μL (11 μg)	26.7 μL (10 μg)	13.3 μL (5 μg)	50 ng/ μL
Total Volume	220 μL	200 μL	100 μL	

6. Incubar el coctel de hibridación por 5 min a 99°C , después por 5 minutos a 45°C
7. Rellene el arreglo con el coctel y deje hibridando durante 16 h a 45°C

Lavado y tinción

1. Pasado el tiempo de hibridación, sacar los arreglos del horno.
2. Retirar el coctel de hibridación, rellenar el arreglo con buffer A completamente.
3. Equilibrar los arreglos antes del lavado y tinción.
4. Colocar tubos dentro de los holders en la estación de fluidos
 - a) En un tubo ámbar colocar un vial conteniendo 600 μL Stain Cocktail 1 en la posición 1.
 - b) En un tubo claro colocar un vial conteniendo 600 μL Stain Cocktail 2 en la posición 2.
 - c) En un tubo claro colocar un vial conteniendo 800 μL buffer Array Holding



en la posición 3.

5. Lavar los arreglos de acuerdo al tipo de arreglo y componentes de la hibridación, lavado y tinción, utilizar el protocolo FS450_0001 de la estación de fluidos.
6. Revisar que no contenga burbujas, rellenarlo manualmente con Array Holding Buffer si fuera necesario para remover las burbujas.

Escaneo

1. Escanear los chips en el escáner de affymetrix con el software GeneAtlas[®] Software Setup.



ANEXO 2

Análisis Bioinformático

Genes diferencialmente expresados (Hipoxia cámara)								
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value		
215446	s_at	215446	s_at	LOX	lysyl oxidase	6.66480702	6.894464954	3.10E+12
1555338	s_at	1555338	s_at	AQP10	aquaporin 10	5.590301578	6.858944181	3.65E+11
220158	at	220158	at	LGALS14	lectin, galactoside+binding, soluble, 14	5.502154917	6.933231926	1.40E+12
218625	at	218625	at	NRN1	neuritin 1	5.406917445	4.765873979	1.41E+10
219888	at	219888	at	SPAG4	sperm associated antigen 4	4.894922624	6.93100171	3.48E+09
226771	at	226771	at	ATP8B2	ATPase phospholipid transporting 8B2	4.651115996	5.979809439	4.76E+08
217028	at	217028	at	CXCR4	chemokine (C+X+C motif) receptor 4	4.61098325	5.193068966	2.75E+10
230645	at	230645	at	FRMD3	FERM domain containing 3	4.417947573	5.357220173	1.55E+08
201313	at	201313	at	ENO2	enolase 2 (gamma, neuronal)	4.3411658	6.642129489	1.47E+10
202887	s_at	202887	s_at	ANPEP	alanyl aminopeptidase, membrane	4.32388818	9.72517354	1.41E+11
219410	at	219410	at	TMEM45A	transmembrane protein 45A	4.134826898	7.157525169	7.51E+12
223784	at	223784	at	TMEM27	transmembrane protein 27	4.014718988	5.884167824	2.87E+08
201169	s_at	201169	s_at	BHLHE40	basic helix+loop+helix family member e40	3.948317257	5.653324262	1.11E+09
221478	at	221478	at	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3+like	3.855596031	9.719192486	2.77E+11
208519	x_at	208519	x_at	GNRH2	gonadotropin releasing hormone 2	3.73961965	5.95034851	8.57E+10
206177	s_at	206177	s_at	ARG1	arginase 1	3.699543494	3.753409448	8.70E+10
202219	at	202219	at	SLC6A8	solute carrier family 6 member 8	3.673295552	6.839672829	2.23E+09
201848	s_at	201848	s_at	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	3.635555744	9.19014045	5.67E+11
227337	at	227337	at	ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	3.608603539	8.117937139	5.65E+10
219529	at	219529	at	CLIC3	chloride intracellular channel 3	3.586466921	5.836127168	3.92E+10
214142	at	214142	at	ZG16	zymogen granule protein 16	3.578792034	6.803282358	2.28E+10
217967	s_at	217967	s_at	FAM129A	family with sequence similarity 129 member A	3.546914205	4.928533351	5.26E+10
226158	at	226158	at	KLHL24	kelch like family member 24	3.531158153	7.044746746	1.86E+08
231233	at	231233	at	PCAT6	prostate cancer associated transcript 6 (non+protein coding)	3.52399839	4.889626084	3.01E+08
239229	at	239229	at	PHEX	phosphate regulating endopeptidase homolog, X+linked	3.521155155	4.683107781	1.12E+09
216733	s_at	216733	s_at	GATM	glycine amidinotransferase	3.491835929	6.152185622	1.31E+08
231202	at	231202	at	ALDH1L2	aldehyde dehydrogenase 1 family member L2	3.467836068	5.770030746	2.53E+09
229230	at	229230	at	SLC51A	solute carrier family 51 alpha subunit	3.428673969	4.5739076	1.13E+08
1569020	at	1569020	at	NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down+regulated 9	3.399404031	5.205638839	9.27E+08
230710	at	230710	at	MIR210HG	MIR210 host gene	3.380355745	6.371577353	2.31E+09
226452	at	226452	at	PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase 1	3.369595942	9.083230032	1.50E+09
221748	s_at	221748	s_at	TNS1	tensin 1	3.347736276	6.167373028	1.74E+08
219564	at	219564	at	KCNJ16	potassium voltage-gated channel subfamily J member 16	3.314911996	5.939939208	8.98E+08
227949	at	227949	at	PHACTR3	phosphatase and actin regulator 3	3.302946318	3.947665326	3.87E+08
226682	at	226682	at	RORA	RAR related orphan receptor 4	3.291985917	7.926967979	6.37E+11
206424	at	206424	at	CYP26A1	cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1	3.283965219	5.27641505	1.78E+10
205286	at	205286	at	TFAP2C	transcription factor AP+2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)	3.224057955	8.464583542	1.31E+09
208383	s_at	208383	s_at	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	3.223804862	5.146356775	3.58E+08
217546	at	217546	at	MT1M	metallothionein 1M	3.209822026	5.103931874	9.41E+08
200632	s_at	200632	s_at	NDRG1	N+myc downstream regulated 1	3.201360902	10.28005904	1.02E+08
228499	at	228499	at	PFKFB4	6+phosphofructo+2+kinase/fructose+2,6+biphosphatase 4	3.187468982	7.799501325	2.14E+08
207426	s_at	207426	s_at	TNFSF4	tumor necrosis factor superfamily member 4	3.185500745	5.436851041	1.44E+09
202770	s_at	202770	s_at	CCNG2	cyclin G2	3.176389913	6.615486639	3.30E+10
210587	at	210587	at	INHBE	inhibin beta E	3.114060173	4.245347898	5.21E+08
205234	at	205234	at	SLC16A4	solute carrier family 16 member 4	3.093876787	6.507431686	7.49E+09
221530	s_at	221530	s_at	BHLHE41	basic helix+loop+helix family member e41	3.086181976	4.579473772	8.00E+11
202364	at	202364	at	MXI1	MAX interactor 1, dimerization protein	3.050688625	5.586530266	9.20E+10
202237	at	202237	at	NNMT	nicotinamide N+methyltransferase	3.027519222	5.028775255	1.81E+07
1560240	at	1560240	at	LINC01293	long intergenic non+protein coding RNA 1293	3.027067927	4.437354186	5.08E+08
217047	s_at	217047	s_at	FAM13A	family with sequence similarity 13 member A	3.010238867	8.148873214	7.32E+10
206675	s_at	206675	s_at	SKIL	SKI+like proto+oncogene	3.005393108	4.92105984	2.82E+07
212327	at	212327	at	LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1	2.999997544	4.75885252	3.28E+10
212097	at	212097	at	CAV1	caveolin 1	2.924937603	7.12302811	7.18E+10
202686	s_at	202686	s_at	AXL	AXL receptor tyrosine kinase	2.913179484	5.445584526	1.16E+07
204475	at	204475	at	MMP1	matrix metalloproteinase 1	-3.431297207	9.056746938	3.69E+09
220784	s_at	220784	s_at	UTS2	urotensin 2	-3.491042231	5.396749486	8.14E+09
224632	at	224632	at	GPATCH4	G+patch domain containing 4	-3.71054194	7.94630303	2.91E+07

Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes

Genes diferencialmente expresados (APC)						
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value
219564_at	219564_at	KCNJ16	potassium voltage-gated channel subfamily J member 16	5.906204532	7.247099824	3.52E+17
226771_at	226771_at	ATP8B2	ATPase phospholipid transporting 8B2	5.579961257	6.551421081	5.12E+17
219888_at	219888_at	SPAG4	sperm associated antigen 4	5.577171203	8.48450141	6.92E+15
215446_s_at	215446_s_at	LOX	lysyl oxidase	5.33259108	8.104930029	2.91E+18
1555338_s_at	1555338_s_at	AQP10	aquaporin 10	5.067931223	8.069189507	3.34E+16
220158_at	220158_at	LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14	4.877206284	8.398863382	3.32E+15
201313_at	201313_at	ENO2	enolase 2 (gamma, neuronal)	4.838415438	8.417330247	1.80E+13
221478_at	221478_at	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	4.684989618	10.53777249	7.95E+17
234989_at	234989_at	NA	NA	4.642958196	10.11418165	2.31E+13
213349_at	213349_at	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	4.620238909	9.820474742	1.57E+15
230710_at	230710_at	MIR210HG	MIR210 host gene	4.615011795	7.396654064	7.53E+16
201008_s_at	201008_s_at	TXNIP	thioredoxin interacting protein	4.606637233	9.104804453	2.75E+14
218625_at	218625_at	NRN1	neuritin 1	4.568674411	6.074341385	7.20E+14
217028_at	217028_at	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	4.379691211	7.125462958	5.10E+16
202219_at	202219_at	SLC6A8	solute carrier family 6 member 8	4.376982377	7.94542243	1.26E+14
202627_s_at	202627_s_at	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade I (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	4.368789143	6.114950558	1.55E+12
204298_s_at	204298_s_at	LOX	lysyl oxidase	4.347916462	7.124349918	1.52E+15
227020_at	227020_at	YPEL2	yippee like 2	4.267014864	7.647858003	4.28E+15
225239_at	225239_at	NA	NA	4.266823407	8.501870117	3.39E+12
221479_s_at	221479_s_at	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	4.258980152	10.16486609	9.64E+15
201848_s_at	201848_s_at	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	4.254257377	10.28626847	6.18E+16
202887_s_at	202887_s_at	ANPEP	alanyl aminopeptidase, membrane	4.253794152	10.24991446	3.20E+17
201170_s_at	201170_s_at	BHLHE40	basic helix-loop+helix family member e40	4.240376326	9.883412912	3.07E+15
242496_at	242496_at	ART4	ADP-ribosyltransferase 4 (Dombrock blood group)	4.165640037	6.929122636	2.20E+16
219529_at	219529_at	CLIC3	chloride intracellular channel 3	4.141363924	6.63626455	8.38E+16
230645_at	230645_at	FRMD3	FERM domain containing 3	4.122183879	6.170292452	4.86E+13
201009_s_at	201009_s_at	TXNIP	thioredoxin interacting protein	4.070200217	9.261652959	1.36E+16
227337_at	227337_at	ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	4.056605793	9.133227173	5.03E+16
201169_s_at	201169_s_at	BHLHE40	basic helix-loop+helix family member e40	4.028099227	6.44542374	4.11E+14
212977_at	212977_at	ACKR3	atypical chemokine receptor 3	4.025489493	6.422233084	9.42E+14
201010_s_at	201010_s_at	TXNIP	thioredoxin interacting protein	3.939346373	10.53539259	2.28E+14
214146_s_at	214146_s_at	PPBP	pro+platelet basic protein	3.933917609	6.758297548	1.03E+15
229230_at	229230_at	SLCS1A	solute carrier family 51 alpha subunit	3.904683577	6.259990963	4.62E+15
236313_at	236313_at	CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	3.884348323	7.536733806	1.34E+16
223484_at	223484_at	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	3.863091635	8.322381204	3.78E+16
215071_s_at	215071_s_at	HIST1H2AC	histone cluster 1, H2ac	3.817524228	8.605792017	4.36E+17
208651_x_at	208651_x_at	CD24	CD24 molecule	3.787133929	8.363506096	5.32E+15
223434_at	223434_at	GBP3	guanylate binding protein 3	3.746079047	5.599438806	2.87E+13
210538_s_at	210538_s_at	BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	3.72075976	9.08687513	6.54E+15
202973_x_at	202973_x_at	FAM13A	family with sequence similarity 13 member A	3.718597966	9.50023882	7.83E+16
228499_at	228499_at	PFKB4	6-phosphofructo+2-kinase/fructose+2,6-bisphosphatase 4	3.694010285	8.278245765	1.57E+13
201849_at	201849_at	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	3.676726753	11.75891083	6.36E+15
266_s_at	266_s_at	CD24	CD24 molecule	3.670483974	8.356475164	3.10E+15
240432_x_at	240432_x_at	KLF7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	3.669494746	6.148867094	6.03E+15
226682_at	226682_at	RORA	RAR related orphan receptor A	3.667768865	8.484964744	1.44E+15
236193_at	236193_at	HIST1H2BC	histone cluster 1, H2bc	3.667062038	4.969557525	1.47E+12
218532_s_at	218532_s_at	FAM134B	family with sequence similarity 134 member B	3.66308162	7.476257159	1.21E+16
218498_s_at	218498_s_at	ERO1A	endoplasmic reticulum oxidoreductase alpha	3.66138982	9.264468021	1.72E+13
210095_s_at	210095_s_at	IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3	3.660528904	5.163099653	2.26E+13
214455_at	214455_at	NA	NA	3.646753573	5.137779567	2.67E+12
205659_at	205659_at	HDAC9	histone deacetylase 9	3.641060663	6.307587599	1.02E+12
217047_s_at	217047_s_at	FAM13A	family with sequence similarity 13 member A	3.633980674	9.009643873	3.40E+16
208650_s_at	208650_s_at	CD24	CD24 molecule	3.633727948	8.307364704	8.08E+16
236518_at	236518_at	NA	NA	3.630437012	8.046113621	6.40E+16
202688_at	202688_at	TNFSF10	tumor necrosis factor superfamily member 10	3.611938413	5.72417627	1.22E+12
239806_at	239806_at	NA	NA	3.606310066	5.060590869	3.12E+13
242345_at	242345_at	COL28A1	collagen type XXVIII alpha 1	3.59744582	4.6872015	1.42E+12
209772_s_at	209772_s_at	CD24	CD24 molecule	3.593439096	7.389447751	2.70E+16
202023_at	202023_at	EFNA1	ephrin+A1	3.588900571	9.586761252	2.94E+16
200632_s_at	200632_s_at	NDRG1	N+myc downstream regulated 1	3.57152159	10.78557459	2.43E+15
204934_s_at	204934_s_at	HPN	hepsin	3.56789478	8.022882098	2.39E+14
226757_at	226757_at	IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	3.562794475	6.495826569	4.91E+13
216379_x_at	216379_x_at	CD24	CD24 molecule	3.529354899	9.845746607	1.76E+16
209598_at	209598_at	PNMA2	paraneoplastic Ma antigen 2	3.52486126	6.816762462	6.33E+13
223179_at	223179_at	YPEL3	yippee like 3	3.513391801	7.303362855	6.54E+14
218510_x_at	218510_x_at	FAM134B	family with sequence similarity 134 member B	3.49554163	6.515358591	1.83E+13
207543_s_at	207543_s_at	PAHA1	prolyl 4+hydroxylase subunit alpha 1	3.47646398	11.81524892	5.02E+13
217614_at	217614_at	HMHA1	histocompatibility (minor) HA+1	3.473504061	5.70807849	3.44E+12
212327_at	212327_at	LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1	3.467011707	5.675960577	7.35E+13
209771_x_at	209771_x_at	CD24	CD24 molecule	3.430119026	10.36445719	7.76E+16
238750_at	238750_at	CCL28	C-C motif chemokine ligand 28	3.415662168	7.427217752	9.09E+13
226158_at	226158_at	KLHL24	kelch like family member 24	3.411768058	7.300884149	2.77E+13



Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes

Genes diferencialmente expresados (APC)						
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value
241898_at	241898_at	LIPH	lipase H	3.402053706	6.815250942	2.36E+13
202488_s_at	202488_s_at	FXD3	FXD domain containing ion transport regulator 3	3.399449783	9.280798531	8.79E+15
202619_s_at	202619_s_at	PLOD2	procollagen+lysine, 2+oxoglutarate 5+dioxygenase 2	3.397767468	10.32327115	8.79E+13
202489_s_at	202489_s_at	FXD3	FXD domain containing ion transport regulator 3	3.373830869	11.26301338	4.36E+16
209457_at	209457_at	DUSP5	dual specificity phosphatase 5	3.373257952	10.30600909	2.10E+15
212328_at	212328_at	LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1	3.362887088	5.39671346	4.91E+13
1554452_a_at	1554452_a_at	HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated	3.334330138	8.438729701	1.56E+15
239921_at	239921_at	COL28A1	collagen type XXVIII alpha 1	3.328055982	5.345874957	2.76E+13
226863_at	226863_at	FAM110C	family with sequence similarity 110 member C	3.327709409	7.717656234	3.70E+15
213351_s_at	213351_s_at	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	3.295474244	7.511810515	3.34E+13
205771_s_at	205771_s_at	AKAP7	A-kinase anchoring protein 7	3.283174554	9.371630975	3.31E+15
1568609_s_at	1568609_s_at	NA	NA	3.25500886	7.919701967	4.26E+13
221748_s_at	221748_s_at	TNS1	tensin 1	3.250905075	6.524397823	1.04E+12
209822_s_at	209822_s_at	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	3.207671792	8.14981194	1.23E+14
209498_at	209498_at	CEACAM1	carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1	3.20285301	9.575211639	5.35E+15
219727_at	219727_at	DUOX2	dual oxidase 2	3.179624365	6.392233965	4.94E+14
236180_at	236180_at	NA	NA	3.162862732	10.37185129	1.31E+15
209183_s_at	209183_s_at	C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	3.159069347	6.82062603	3.43E+12
227112_at	227112_at	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	3.151625971	8.74192108	1.14E+15
243231_at	243231_at	NA	NA	3.133196293	6.221235083	6.18E+15
225646_at	225646_at	CTSC	cathepsin C	-2.900750559	7.449114999	1.81E+13
213379_at	213379_at	COQ2	coenzyme Q2 4+hydroxybenzoate polyprenyltransferase	-2.968610088	8.025831153	6.39E+14
222930_s_at	222930_s_at	AGMAT	agmatinase	-2.969594261	7.71865981	1.81E+14
226030_at	226030_at	ACAD5B	acyl+CoA dehydrogenase, short/branched chain	-2.979335745	5.28602067	3.99E+13
219006_at	219006_at	NDUFA4	NAADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 4	-2.993694683	9.210367339	5.11E+15
241937_s_at	241937_s_at	WDR4	WD repeat domain 4	-2.99704741	7.454221149	7.37E+13
1558152_at	1558152_at	LOC100131262	uncharacterized LOC100131262	-2.999225815	7.290867256	4.93E+13
229349_at	229349_at	LIN28B	lin+28 homolog B	-3.035352496	7.589435102	9.90E+13
201487_at	201487_at	CTSC	cathepsin C	-3.043204725	9.591325382	4.22E+14
45633_at	45633_at	GIN3	GIN3 complex subunit 3 (Psf3 homolog)	-3.043520546	6.660645851	4.69E+14
223413_s_at	223413_s_at	LYAR	Ly1 antibody reactive	-3.048020276	7.923155658	2.80E+12
1554242_a_at	1554242_a_at	COCH	cochlin	-3.060040951	7.862738199	4.01E+13
206293_at	206293_at	SULT2A1	sulfotransferase family 2A member 1	-3.062375081	6.497093036	2.47E+13
228038_at	228038_at	SOX2	SRY+box 2	-3.080324803	6.615654881	1.54E+14
1553171_x_at	1553171_x_at	LRRN4	leucine rich repeat neuronal 4	-3.193634828	6.337076873	9.69E+13
221648_s_at	221648_s_at	AGMAT	agmatinase	-3.19902157	9.70809349	2.53E+14
225368_at	225368_at	HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2	-3.305844563	6.67165299	9.56E+15
222774_s_at	222774_s_at	NETO2	neuropilin and tolloid like 2	-3.360882419	6.936033628	6.49E+13
223447_at	223447_at	REG4	regenerating family member 4	-3.379198513	7.195397224	3.65E+13
204404_at	204404_at	SLC12A2	solute carrier family 12 member 2	-3.380562345	7.292834563	4.93E+14
214240_at	214240_at	GAL	galanin/GMAP prepropeptide	-3.395198255	9.125579523	1.87E+13
1554436_a_at	1554436_a_at	REG4	regenerating family member 4	-3.396987195	6.773844277	3.25E+12
203180_at	203180_at	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family member A3	-3.408935237	5.87595815	9.17E+13
214957_at	214957_at	ACTL8	actin like 8	-3.409493729	6.475917836	2.40E+13
204475_at	204475_at	MMP1	matrix metalloproteinase 1	-3.434513426	7.49592541	8.98E+14
206664_at	206664_at	SI	sucrase+isomaltase (alpha+glucosidase)	-3.441869673	5.228261802	3.01E+12
201272_at	201272_at	AKR1B1	aldo+keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	-3.4449778	7.394759425	5.78E+15
219987_at	219987_at	ERVMER34+1	endogenous retrovirus group MER34 member 1	-3.503819748	7.616574543	1.24E+15
218888_s_at	218888_s_at	NETO2	neuropilin and tolloid like 2	-3.683996193	8.075678556	2.16E+13
205229_s_at	205229_s_at	COCH	cochlin	-3.690068856	8.366888801	2.78E+15
239835_at	239835_at	KBTBD8	kelch repeat and BTB domain containing 8	-3.723031057	5.14039212	7.84E+13
220784_s_at	220784_s_at	UTS2	urotensin 2	-3.995432399	3.543801496	2.00E+14
235117_at	235117_at	CHAC2	ChaC, cation transport regulator homolog 2 (E. coli)	-4.183668071	6.767886623	1.20E+15



Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes

Genes diferencialmente expresados (p53)							
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value	
219888	at	g11037054	SPAG4	sperm associated antigen 4	60.65	10.34	2.46E-16
220158	at	g9910347	LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14	57.2	10.46	5.26E-15
1555338	s_at	Hs.2Affx.1.212	AQP10	aquaporin 10	47.38	9.77	6.44E-17
201313	at	g5803010	ENO2	enolase 2 (gamma, neuronal)	43.58	10.45	1.52E-16
226771	at	Hs.43577.0	ATP8B2	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 2	42.29	8.79	6.04E-14
202219	at	g5032096	SLC6A8	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 8	34.14	10.17	1.23E-15
219564	at	g8923822	KCNJ16	potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 16	33.92	9.08	7.56E-17
217028	at	Hs.89414.1	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	32.98	8.78	4.11E-16
215446	s_at	Hs.102267.3	LOX	lysyl oxidase	27.12	9.19	1.29E-17
213349	at	Hs.179507.0	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	25.04	11.84	1.26E-16
219529	at	g4758005	CLIC3	chloride intracellular channel 3	24.7	8.72	1.38E-15
214146	s_at	Hs.2164.1	PPBP	pro-platelet basic protein	23.88	8.65	8.81E-17
227337	at	Hs.107381.1	ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	23.3	10.89	2.03E-16
202887	s_at	g9506686	DDIT4	DNA damage inducible transcript 4	21.25	11.88	1.94E-17
201848	s_at	g558845	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	17.72	11.6	1.83E-15
201008	s_at	Hs.179526.0	TXNIP	thioredoxin interacting protein	17.42	11.33	2.16E-14
221986	s_at	Hs.246875.1	KLHL24	kelch-like family member 24	17.34	8.22	6.97E-16
228499	at	Hs.198278.1	PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	17.05	9.9	4.88E-14
217614	at	Hs.165728.0	HMHA1	histocompatibility (minor) HA-1	16.64	7.39	1.41E-15
221478	at	Hs.132955.0	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	15.28	11.95	5.71E-15
230710	at	Hs.218710.0	MIR210HG	MIR210 host gene	14.3	8.57	2.42E-16
224027	at	g12002126	CCL28	chemokine (C-C motif) ligand 28	13.79	8.38	2.34E-16
1554452	a_at	Hs2.61762.2	HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet-associated	13.73	10.42	1.28E-15
211559	s_at	g1236234	CCNG2	cyclin G2	13.64	9.84	4.82E-14
201170	s_at	g4503298	BHLHE40	basic helix-loop-helix family, member e40	13.49	11.22	1.87E-14
1558679	at	Hs2.224905.1	NOL4L	nucleolar protein 4-like	13.36	7.49	2.41E-16
200632	s_at	g5174656	NDRG1	N-myc downstream regulated 1	13.33	12.27	6.90E-16
229230	at	Hs.18963.0	SLC51A	solute carrier family 51, alpha subunit	13.3	7.5	1.98E-15
232504	at	Hs.157752.0	LOC285628	MIR148A host gene	13.21	7.61	1.60E-14
209457	at	g642012	DUSP5	dual specificity phosphatase 5	13.08	11.78	6.79E-14
207980	s_at	g5174416	CITED2	Cbp/p300-interacting transcription factor, with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain, 2	12.93	10.64	2.17E-15
223169	s_at	g11527796	RHDU	ras homolog family member U	12.1	10.18	3.57E-14
203953	s_at	Hs.25640.0	CLDN3	claudin 3	11.73	9.06	6.34E-16
212977	at	Hs.23016.0	ACKR3	atypical chemokine receptor 3	10.83	8.07	1.00E-15
221748	s_at	Hs.9973.1	TNS1	tensin 1	10.71	8.22	4.94E-16
231491	at	Hs.145534.0	LINC00113	long intergenic non-protein coding RNA 113	10.69	7.3	2.84E-15
209183	s_at	g6807650	C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	10.68	8.12	3.14E-14
202489	s_at	g13528881	FXYD3	FXYD domain containing ion transport regulator 3	10.63	12.45	3.88E-14
227020	at	Hs.24133.0	YPEL2	yippee like 2	10.58	9.11	5.64E-14
214142	at	Hs.184507.0	ZG16	zymogen granule protein 16	10.54	8.63	6.33E-14
202688	at	g4507592	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	10.49	6.71	5.70E-15
209598	at	g4240254	PNMA2	paraneoplastic Ma antigen 2	10.49	8.39	2.53E-14
220812	s_at	g5901963	HHLA2	HERV-H LTR-associating 2	10.48	6.57	4.41E-14
204698	at	g6857799	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	10.35	8.71	7.23E-15
216733	s_at	Hs.75335.3	GATM	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	10.35	7.62	1.61E-14
218625	at	g7706122	NRN1	neurtin 1	10.32	6.68	2.12E-14
202973	x_at	g7682375	FAM13A	family with sequence similarity 13, member A	10.28	10.84	3.44E-15
211924	s_at	g13641308	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	10.18	8.82	1.80E-15
201251	at	g4505838	PKM	pyruvate kinase, muscle	10.17	11.53	2.40E-14
204070	at	g8051633	RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	10.15	8.27	5.77E-14
209772	s_at	g396167	CD24	CD24 molecule	10.13	8.92	2.62E-14
208519	x_at	g4504056	GNRH2	gonadotropin releasing hormone 2	10.05	8.62	6.56E-14
202237	at	g5453789	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	9.95	7.08	7.98E-15
200785	s_at	g4758685	LRP1	LDL receptor related protein 1	9.94	9.12	4.80E-14
205287	s_at	g4507444	TFAP2C	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)	9.87	7.87	9.49E-15
207543	s_at	g4505564	P4HA1	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide 1	9.82	12.96	1.68E-14
205820	s_at	g4557322	APOC3	apolipoprotein C-III	9.56	13.57	2.12E-14
202504	at	g6912249	TRIM29	tripartite motif containing 29	9.52	8.44	6.73E-15
219256	s_at	g9506676	SH3TC1	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1	9.42	7.94	3.57E-14
232230	at	Hs.301723.0	OLMALINC	oligodendrocyte maturation-associated long intergenic non-coding RNA	9.35	7.99	2.25E-14
203645	s_at	g4758721	CD163	CD163 molecule	9.22	7.69	2.54E-14
223484	at	g12656020	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	9.12	9.14	3.51E-14
204934	s_at	g4504480	HPN	hepsin	9.03	9.49	2.38E-14
1555788	a_at	Hs2.26802.3	TRIB3	tribbles pseudokinase 3	9.02	9.25	3.49E-14
223179	at	g13477108	YPEL3	yippee like 3	9	8.44	1.59E-14
209117	at	g4205085	WBP2	WW domain binding protein 2	8.93	10.04	8.61E-15
234989	at	Hs.250594.0	NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (non-protein coding)	8.92	11.35	4.81E-14
202708	s_at	g4504276	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be	8.72	8.49	4.78E-14
230645	at	Hs.150478.0	FRMD3	FERM domain containing 3	8.67	6.81	7.23E-14
214326	x_at	Hs.2780.1	JUN	jun D proto-oncogene	8.64	8.36	6.78E-14



Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes

Genes diferencialmente expresados (p53)						
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value
205076_s_at	g5870890	MTMR11	myotubularin related protein 11	8.6	7.81	3.45E-14
227803_at	Hs.35198.0	ENPP5	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative)	8.53	7.22	3.59E-14
208383_s_at	g4505638	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	8.5	6.61	2.52E-15
202455_at	g13259520	HDAC5	histone deacetylase 5	8.49	8.35	2.61E-14
1555854_at	Hs2.213397.1	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1; aldo-keto reductase family 1, member C2	8.49	8.39	8.76E-15
203986_at	g4503976	FAM47E-STBD1	FAM47E-STBD1 readthrough; starch binding domain 1	8.45	9.61	3.16E-14
229011_at	Hs.43148.0	EMP1	epithelial membrane protein 1	8.25	6.09	2.48E-15
201627_s_at	g5031800	INSIG1	insulin induced gene 1	8.22	12.7	1.62E-15
226757_at	Hs.293797.0	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	8.08	7.06	6.26E-15
232628_at	Hs.204720.0			8.08	7.84	1.67E-14
221200_at	g11545901	ERVK3-2	endogenous retrovirus group K3, member 2	8.07	6.81	1.73E-15
223434_at	g12052883	GBP3	guanylate binding protein 3	8.07	6.59	3.96E-14
205302_at	g4504614	IGFBP1	insulin like growth factor binding protein 1	8.03	7.81	1.49E-05
1566764_at	Hs2.67709.1	MACC1	metastasis associated in colon cancer 1	8.04	5	4.48E-05
232063_x_at	Hs.118570.0	FAR5B	phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	8.11	3.63	3.09E-05
225971_at	Hs.7076.0	DDHD1	DDHD domain containing 1	8.16	3.42	2.31E-05
204502_at	g7661593	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	8.21	4.18	1.61E-05
204404_at	g4506974	SLC12A2	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporter), member 2	8.27	6.19	3.62E-05
204475_at	g13027798	MMP1	matrix metalloproteinase 1	8.28	6.96	2.51E-05
205609_at	g4502086	ANGPT1	angiopoietin 1	8.35	3.83	2.14E-05
242260_at	Hs.214238.0	MATR3	matrin 3	8.35	3.31	3.36E-05
231872_at	Hs.193115.0	LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil centrosomal protein 1	8.43	4.41	3.36E-05
213194_at	Hs.301198.0	ROBO1	roundabout guidance receptor 1	8.5	5.34	1.73E-05
201487_at	g4503140	CTSC	cathepsin C	8.57	8.2	1.73E-05
226030_at	Hs.11805.0	ACADSB	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	8.61	4.18	1.73E-05
206664_at	g4506944	SI	sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	8.7	3.79	3.80E-05
228038_at	Hs.129911.0	SOX2	SRY box 2	8.9	5.66	2.43E-05
216609_at	Hs.306243.0	TXN	thioredoxin	8.96	5.63	3.53E-05
243372_at	Hs.259742.0	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	8.96	4.37	1.90E-05
201110_s_at	g4507484	THBS1	thrombospondin 1	9.1	4.28	1.73E-05
222774_s_at	Hs.6823.0	NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	9.13	5.25	1.67E-05
225368_at	Hs.21906.0	HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2	9.15	5.43	3.15E-05
219987_at	g13375687	ERVMER34-1	endogenous retrovirus group MER34, member 1	9.26	6.19	2.30E-05
244565_at	Hs.171068.0	HMX2	H6 family homeobox 2	9.73	4.17	3.38E-05
223908_at	g13182768	HDAC8	histone deacetylase 8	9.81	3.99	2.50E-05
203180_at	g4502040	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	9.92	4.66	4.48E-05
231784_s_at	Hs.273344.2	DCAF13	DDB1 and CUL4 associated factor 13	9.97	6.24	2.89E-05
235573_at	Hs.201615.0	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	10.11	3.5	1.79E-05
232861_at	Hs.232696.0	PDP2	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2	10.53	4.16	2.56E-05
1554478_a_at	Hs2.50579.2	HEATR3	HEAT repeat containing 3	-10.72	3.68	3.45E-05
239835_at	Hs.116665.0	KBTBD8	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8	-10.83	4.08	2.40E-05
220085_at	g8922361	HELLS	helicase, lymphoid-specific	-11.15	5.03	3.61E-05
218313_s_at	g8393408	GALNT7	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7	-11.51	5.46	3.40E-05
239960_x_at	Hs.115467.2	LYRM7	LYR motif containing 7	-11.74	3.08	3.54E-05
221935_s_at	Hs.5997.0	EOGT	EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	-11.81	3.35	4.55E-05
232060_at	Hs.128753.0	ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	-11.93	5.4	2.14E-05
214651_s_at	Hs.127428.2	HOXA10-HOXA9	HOXA10-HOXA9 readthrough; homeobox A9	-11.97	5.58	4.95E-05
205229_s_at	Hs.21016.0	COCH	cochlin	-12	6.61	1.85E-05
1553575_at	Hs2Affx.1.46	ND6	NADH dehydrogenase, subunit 6 (complex I)	-14.13	5.48	4.71E-05
220784_s_at	g12056478	UTS2	urotensin 2	-14.57	2.88	3.54E-05
231341_at	Hs.129192.0	SLC35D3	solute carrier family 35, member D3	-16.41	2.78	2.71E-05
228477_at	Hs.179972.1	ARGLU1	arginine and glutamate rich 1	-17.18	5.93	3.80E-05
235117_at	Hs.105223.0	CHAC2	ChaC, cation transport regulator homolog 2 (E. coli)	-17.23	4.92	4.84E-05



Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes

Genes diferencialmente expresados (Myc)						
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value
203153 at	203153 at	IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	8.788570837	6.348734176	3.86E-20
226702 at	226702 at	CMPK2	cytidine/uridine monophosphate kinase 2	8.688285776	5.69520045	6.67E-18
202411 at	202411 at	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	8.196928945	5.354577097	1.05E-18
204415 at	204415 at	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	7.786891946	7.317366961	5.44E-19
214022 s at	214022 s at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	7.722705149	6.166665462	1.19E-18
226757 at	226757 at	IFI2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	7.62409431	6.495826569	1.09E-17
202237 at	202237 at	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	7.203783098	6.76380507	1.58E-18
213797 at	213797 at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	7.044414926	3.943261935	2.34E-17
212203 x at	212203 x at	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	6.916321936	6.801672701	7.45E-17
213293 s at	213293 s at	TRIM22	tripartite motif containing 22	6.845188198	4.008668474	2.21E-17
202086 at	202086 at	MX1	MX dynamin like GTPase 1	6.781021849	7.192926075	1.24E-17
223784 at	223784 at	TMEM27	transmembrane protein 27	6.743628284	7.2603521	1.36E-15
228607 at	228607 at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	6.447104211	3.834682384	2.06E-17
229450 at	229450 at	IFI3	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	6.334273439	8.160097746	1.07E-15
204972 at	204972 at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	6.194737319	4.403326049	2.54E-16
205660 at	205660 at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase like	6.132267859	5.055882988	9.42E-18
242625 at	242625 at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	6.044754955	3.410967312	2.78E-19
219211 at	219211 at	USP18	ubiquitin specific peptidase 18	6.039737095	5.398358225	1.60E-15
204698 at	204698 at	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	5.961356085	7.334110132	1.55E-17
1405 l at	1405 l at	CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	5.952610334	3.292776859	7.85E-18
218986 s at	218986 s at	DDX60	DEXD/H-box helicase 60	5.927568349	5.460248485	1.86E-18
228152 s at	228152 s at	DDX50L	DEAD-box helicase 60-like	5.886243504	5.738250071	3.49E-15
219684 at	219684 at	RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	5.807869396	4.809591534	7.53E-18
204070 at	204070 at	RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	5.795306709	7.000721774	7.89E-16
205483 s at	205483 s at	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	5.604260517	9.441051191	9.72E-18
33304 at	33304 at	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	5.574641626	7.405353065	7.10E-16
228439 at	228439 at	BATF2	basic leucine zipper ATF-like transcription factor 2	5.568801918	6.435606836	2.08E-17
205552 s at	205552 s at	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	5.552556277	6.775314276	4.84E-14
217502 at	217502 at	IFI2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	5.514452811	5.807454468	1.02E-13
201315 x at	201315 x at	IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2	5.506311796	5.93261749	3.66E-18
217028 at	217028 at	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	5.498662322	7.125462958	2.04E-17
202688 at	202688 at	TNFSF10	tumor necrosis factor superfamily member 10	5.466002965	5.72417627	3.69E-15
201649 at	201649 at	UBE2L6	ubiquitin conjugating enzyme E2L 6	5.404065074	8.471214357	7.96E-17
227450 at	227450 at	ERP27	endoplasmic reticulum protein 27	5.400308271	7.788700047	1.48E-17
208965 s at	208965 s at	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	5.400197003	3.158752838	4.56E-17
202687 s at	202687 s at	TNFSF10	tumor necrosis factor superfamily member 10	5.377638313	5.334823389	2.97E-16
210797 s at	210797 s at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase like	5.356011497	5.646478294	6.60E-15
204279 at	204279 at	PSM89	proteasome subunit beta 9	5.306029784	6.647833893	6.15E-16
211122 s at	211122 s at	CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	5.284188873	3.358328904	1.95E-14
206332 s at	206332 s at	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	5.187405148	3.605385651	9.67E-16
1555756 s at	1555756 s at	CLEC7A	C-type lectin domain family 7 member A	5.184119089	2.83081354	1.33E-14
203645 s at	203645 s at	CD163	CD163 molecule	5.153899755	6.438036754	1.23E-16
218999 at	218999 at	TMEM140	transmembrane protein 140	5.136737071	6.650455825	9.84E-16
202238 s at	202238 s at	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	5.123773056	6.021284232	9.26E-17
203595 s at	203595 s at	IFI5	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5	5.066877895	6.375257948	1.54E-14
209417 s at	209417 s at	IFI35	interferon induced protein 35	5.046132401	8.014661695	3.58E-16
219564 at	219564 at	KCNJ16	potassium voltage-gated channel subfamily J member 16	5.017863836	7.247099824	3.54E-16
1555338 s at	1555338 s at	AQP10	aquaporin 10	4.98228517	8.069189507	4.24E-16
209761 s at	209761 s at	SP110	SP110 nuclear body protein	4.944342488	5.099072397	2.37E-14
222793 at	222793 at	DDX58	DEXD/H-box helicase 58	4.93907302	6.361059305	9.57E-14
219888 at	219888 at	SPAG4	sperm associated antigen 4	4.92210301	8.48450141	4.01E-14
219863 at	219863 at	HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	4.91047481	6.408203874	1.05E-16
202307 s at	202307 s at	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	4.906143552	7.372941174	2.53E-17
208436 s at	208436 s at	IRF7	interferon regulatory factor 7	4.901974028	8.558590718	1.10E-14
218943 s at	218943 s at	DDX58	DEXD/H-box helicase 58	4.901516056	6.20012902	7.52E-14
206133 at	206133 at	XAF1	XIAP associated factor 1	4.894861607	3.453813862	7.18E-16
1555759 s at	1555759 s at	CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	4.878285871	4.984164062	5.99E-16
204655 at	204655 at	CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	4.865795132	4.267720674	4.30E-17
202869 at	202869 at	CDC20	cell division cycle 20	4.841182469	7.85638062	2.07E-16
208966 x at	208966 x at	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	4.810312242	4.27003984	1.02E-14
209762 x at	209762 x at	SP110	SP110 nuclear body protein	4.806537483	5.531527644	2.07E-16
228617 at	228617 at	XAF1	XIAP associated factor 1	4.800274095	3.556217144	2.09E-17
211368 s at	211368 s at	CASP1	caspase 1	4.749346266	5.477723517	9.50E-14
228230 at	228230 at	HELZ2	helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator	4.742554269	7.248497816	3.56E-16
220158 at	220158 at	LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14	4.701387461	8.398863382	5.56E-15
205569 at	205569 at	LAMP3	lysosomal associated membrane protein 3	4.65348242	6.830724803	2.12E-14
203882 at	203882 at	IRF9	interferon regulatory factor 9	4.599102388	8.425513768	2.24E-15
223484 at	223484 at	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	4.565105892	8.322381204	3.55E-17
38241 at	38241 at	BTN3A3	butyrophillin subfamily 3 member A3	4.482390605	3.505114267	9.41E-15
210163 at	210163 at	CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	4.456120028	3.059199182	1.50E-13
201008 s at	201008 s at	TXNIP	thioredoxin interacting protein	4.383857055	9.104804453	5.52E-14
202902 s at	202902 s at	CTSS	cathepsin S	4.374088277	7.450706455	2.17E-16



Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes

Genes diferencialmente expresados (Myc)							
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value	
221122 at	221122 at	HRASL52	HRAS like suppressor 2	4.364978508	6.517236651	3.43E-15	
202270 at	202270 at	GBP1	guanylate binding protein 1	4.350288858	5.850306275	1.48E-13	
219962 at	219962 at	ACE2	angiotensin I converting enzyme 2	4.347269706	5.803531012	7.81E-14	
218400 at	218400 at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	4.275349021	8.251125138	3.04E-14	
242496 at	242496 at	ART4	ADP-ribosyltransferase 4 (Dombrock blood group)	4.215739443	6.929122636	1.85E-16	
205302 at	205302 at	IGFBP1	insulin like growth factor binding protein 1	4.184627088	6.416519695	2.31E-14	
219209 at	219209 at	IFIH1	interferon induced, with helicase C domain 1	4.171659795	7.10747982	1.01E-16	
1561254 at	1561254 at	LOC340340	uncharacterized LOC340340	4.143307442	6.32020613	1.26E-14	
209183 s at	209183 s at	C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	4.09898693	6.82062603	9.10E-14	
1552915 at	1552915 at	IFNL2	interferon, lambda 2	4.075173346	5.793546834	1.58E-13	
202864 s at	202864 s at	DNAJB12	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B12	4.029210028	7.920555024	1.83E-16	
232024 at	232024 at	GIMAP2	GTPase, IMAP family member 2	3.980915963	5.900118503	1.48E-15	
201009 s at	201009 s at	TXNIP	thioredoxin interacting protein	3.968184814	9.261652959	1.95E-16	
227609 at	227609 at	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)	3.906699524	8.325906369	1.53E-15	
244056 at	244056 at	SFTA2	surfactant associated 2	3.905550185	6.249550485	1.02E-14	
202863 at	202863 at	SP100	SP100 nuclear antigen	3.90276942	8.146297755	1.88E-16	
229781 at	229781 at	LOC100506725	uncharacterized LOC100506725	3.901858211	4.454226188	1.63E-14	
235276 at	235276 at	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)	3.871538282	7.315530005	3.97E-15	
219352 at	219352 at	HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	3.791548432	6.158117867	4.33E-14	
201010 s at	201010 s at	TXNIP	thioredoxin interacting protein	3.790382534	10.53539259	4.90E-14	
214079 at	214079 at	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	3.712613631	8.350106197	5.68E-15	
232155 at	232155 at	RNF213	ring finger protein 213	3.686226256	4.342108232	9.99E-14	
202219 at	202219 at	SLC6A8	solute carrier family 6 member 8	3.67441325	7.94542243	1.47E-13	
236313 at	236313 at	CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	3.662753121	7.536733806	3.07E-16	
201288 at	201288 at	ARHGDI8	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	3.651016758	8.958677292	8.07E-15	
242961 x at	242961 x at	DDX58	DEXD/H-box helicase 58	3.648937689	7.638825483	4.20E-16	
227337 at	227337 at	ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	3.641842428	9.133227173	2.31E-15	
214453 s at	214453 s at	IFI44	interferon induced protein 44	3.631711169	3.29621044	1.30E-13	
232593 at	232593 at	NEURL3	neuralized E3 ubiquitin protein ligase 3	3.603163059	7.386805098	4.00E-14	
214146 s at	214146 s at	PPBP	pro-platelet basic protein	3.601096075	6.758297548	3.58E-15	
229242 at	229242 at	TNFSF15	tumor necrosis factor superfamily member 15	3.578437011	7.324161056	3.61E-16	
209140 x at	209140 x at	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	3.56617778	11.10578845	7.35E-14	
219233 s at	219233 s at	GSDMB	gasdermin B	3.564443741	7.210409882	5.15E-16	
237340 at	237340 at	SLC26A8	solute carrier family 26 member 8	3.558139775	4.934068265	3.15E-14	
202489 s at	202489 s at	FXYP3	FXYP domain containing ion transport regulator 3	3.556990877	11.26301338	2.07E-16	
222257 s at	222257 s at	ACE2	angiotensin I converting enzyme 2	3.548971257	6.424113355	5.58E-14	
221667 s at	221667 s at	HSPB8	heat shock protein family B (small) member 8	3.52360037	8.776944534	1.07E-14	
229230 at	229230 at	SLC51A	solute carrier family 51 alpha subunit	3.500825002	6.259990963	2.15E-14	
204533 at	204533 at	CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	3.500665177	5.293527179	1.48E-14	
206801 at	206801 at	NPPB	natriuretic peptide B	3.466095403	10.69120376	2.05E-15	
1568592 at	1568592 at	TRIM69	tripartite motif containing 69	3.464206866	7.198511147	4.10E-15	
206424 at	206424 at	CYP26A1	cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1	3.444761653	6.455171374	4.66E-14	
219410 at	219410 at	TMEM45A	transmembrane protein 45A	3.441433669	8.059392866	8.61E-14	
221698 s at	221698 s at	CLECTA	C-type lectin domain family 7 member A	3.383829078	8.740254614	1.79E-13	
53720 at	53720 at	C19orf66	chromosome 19 open reading frame 66	3.363896825	6.895331527	9.88E-15	
219529 at	219529 at	CLIC3	chloride intracellular channel 3	3.352555344	6.63626455	1.65E-14	
212185 x at	212185 x at	MT2A	metallothionein 2A	3.251362839	11.01609651	3.00E-15	
211911 x at	211911 x at	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	3.245000237	10.59633752	6.78E-15	
201848 s at	201848 s at	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	3.220036474	10.28626847	3.13E-14	
204298 s at	204298 s at	LOX	lysyl oxidase	3.210101561	7.124349918	1.08E-13	
202430 s at	202430 s at	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	3.199598539	9.237146613	1.72E-15	
230710 at	230710 at	MIR210HG	MIR210 host gene	3.196137527	7.396654064	1.32E-13	
205174 s at	205174 s at	QPCT	glutamyl-peptide cyclotransferase	3.195920453	8.334319853	4.90E-15	
223220 s at	223220 s at	PARP9	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9	3.146511656	7.122378842	3.26E-14	
211075 s at	211075 s at	CD47	CD47 molecule	3.139806451	6.761097303	1.58E-14	
215446 s at	215446 s at	LOX	lysyl oxidase	3.131902274	8.104930029	5.43E-15	
202446 s at	202446 s at	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	3.130168639	10.24898387	3.15E-14	
209457 at	209457 at	DUSP5	dual specificity phosphatase 5	-3.122222153	10.30609099	6.24E-15	
226140 s at	226140 s at	OTUD1	OTU deubiquitinase 1	-3.08803095	9.647383587	3.29E-15	
1556643 at	1556643 at	BISPR	IS72 interferon stimulated positive regulator (non-protein coding)	-3.044398707	6.339080293	1.65E-14	
236657 at	236657 at	LOC100288911	uncharacterized LOC100288911	-3.038701826	7.302904639	8.15E-14	
202488 s at	202488 s at	FXYP3	FXYP domain containing ion transport regulator 3	-3.038066767	9.280798531	4.27E-14	
238056 at	238056 at	RBP7	retinol binding protein 7	-3.016964075	6.72358655	5.32E-14	
224701 at	224701 at	PARP14	poly(ADP-ribose) polymerase family member 14	-2.98860884	7.402324488	5.05E-15	
218543 s at	218543 s at	PARP12	poly(ADP-ribose) polymerase family member 12	-2.980567887	8.375411453	2.85E-15	
208729 x at	208729 x at	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	-2.973484541	9.588875617	3.03E-14	
208812 x at	208812 x at	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	-2.972853395	11.88506233	1.05E-13	
223169 s at	223169 s at	RHOJ	ras homolog family member U	-2.964351255	8.704008127	2.91E-14	
229435 at	229435 at	GLIS3	GLIS family zinc finger 3	-2.939636767	6.711803358	4.08E-14	
206363 at	206363 at	MAF	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	-2.910627744	6.122330344	5.95E-14	
214459 x at	214459 x at	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	-2.907136622	11.85193397	4.85E-14	



Implementación de un modelo *in vitro* de cáncer que permita evaluar simultáneamente el efecto de estrés (hipoxia y pH) y el silenciamiento de genes

Genes diferencialmente expresados (KRAS)						
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value
215446 s at	215446 s at	LOX	lysyl oxidase	5.95983061	8.10493003	6.00E-19
223784 at	223784 at	TMEM27	transmembrane protein 27	5.482621	7.2603521	2.51E-14
219564 at	219564 at	KCNJ16	potassium voltage-gated channel subfamily J member 16	5.37481317	7.24709982	1.34E-16
204298 s at	204298 s at	LOX	lysyl oxidase	5.23771765	7.12434992	1.09E-16
202237 at	202237 at	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	5.22886392	6.76380507	1.48E-16
220158 at	220158 at	LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14	5.12494089	8.39886338	1.65E-15
220620 at	220620 at	CRCT1	cysteine rich C-terminal 1	5.07780521	4.11955228	5.68E-15
219888 at	219888 at	SPAG4	sperm associated antigen 4	5.00310613	8.48450141	3.19E-14
203645 s at	203645 s at	CD163	CD163 molecule	4.94264561	6.43803675	2.23E-16
1555338 s	1555338 s	AQP10	aquaporin 10	4.74849344	8.06918951	8.37E-16
217028 at	217028 at	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	4.31713808	7.12546296	6.25E-16
209909 s at	209909 s at	TGFB2	transforming growth factor beta 2	4.28826944	3.59760382	5.03E-14
214146 s at	214146 s at	PPBP	pro-platelet basic protein	4.22666888	6.75829755	3.73E-16
219410 at	219410 at	TMEM45A	transmembrane protein 45A	4.09563925	8.05939287	7.47E-15
226771 at	226771 at	ATP8B2	ATPase phospholipid transporting 8B2	4.08898972	6.55142108	4.15E-15
219529 at	219529 at	CLIC3	chloride intracellular channel 3	3.95604021	6.63626455	1.60E-15
229781 at	229781 at	LOC1005067	uncharacterized LOC100506725	3.84843614	4.45422619	1.98E-14
202219 at	202219 at	SLC6A8	solute carrier family 6 member 8	3.57153359	7.94542243	2.19E-13
227450 at	227450 at	ERP27	endoplasmic reticulum protein 27	3.56966668	7.78870005	5.16E-15
242496 at	242496 at	ART4	ADP-ribosyltransferase 4 (Dombrock blood group)	3.50552424	6.92912264	2.51E-15
223484 at	223484 at	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	3.47481504	8.323812	1.69E-15
236313 at	236313 at	CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	3.44710057	7.53673381	7.24E-16
201848 s at	201848 s at	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	3.43389361	10.2862685	1.27E-14
221478 at	221478 at	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	3.29509908	10.5377225	1.14E-14
230710 at	230710 at	MIR210HG	MIR210 host gene	3.28956264	7.39665406	8.83E-14
208651 x at	208651 x at	CD24	CD24 molecule	3.26396122	8.3635061	4.31E-14
1555854 at	1555854 at	NA	NA	3.20048815	6.73857072	3.53E-14
202489 s at	202489 s at	FXYP3	FXYP domain containing ion transport regulator 3	3.19996716	11.2630134	9.21E-16
240432 x at	240432 x at	KLF7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	3.17047616	6.14886709	4.71E-14
266 s at	266 s at	CD24	CD24 molecule	3.16408334	8.35647516	2.50E-14
213349 at	213349 at	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	3.15048991	9.82047474	3.41E-13
216379 x at	216379 x at	CD24	CD24 molecule	3.14266162	9.84574661	9.10E-16
1554436 a	1554436 a	REG4	regenerating family member 4	-4.1090517	6.77384428	1.82E-10
220784 s at	220784 s at	UTS2	urotensin 2	-4.1110881	3.5438015	2.79E-11
204475 at	204475 at	MMP1	matrix metalloproteinase 1	-4.8128079	7.49592541	4.20E-12

Genes diferencialmente expresados (H/pH)						
GeneID	GeneSymbol	GeneName	logFC	AveExpr	t	P.Value
218625 at	218625 at	NRN1	neuritin 1	4.96558847	4.76587398	9.23E-10
1569020 at	1569020 at	NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	3.76283438	5.20563884	1.30E-07
217028 at	217028 at	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	3.73553395	5.19306897	4.99E-09
206177 s at	206177 s at	ARG1	arginase 1	3.60332201	3.75340945	3.50E-09
215446 s at	215446 s at	LOX	lysyl oxidase	3.59217141	6.89446495	1.61E-09
213227 at	213227 at	PGRMC2	progesterone receptor membrane component 2	3.5554002	7.98751968	6.32E-11
207256 at	207256 at	MBL2	mannose binding lectin 2	3.48167928	6.7833163	9.02E-10
208519 x at	208519 x at	GNRH2	gonadotropin releasing hormone 2	3.39706231	5.95034851	6.08E-09
224875 at	224875 at	C5orf24	chromosome 5 open reading frame 24	3.35076453	6.55476422	3.89E-08
224938 at	224938 at	NUFIP2	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2	3.31960638	7.98591398	7.80E-08
212327 at	212327 at	LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1	3.31859041	4.75885252	4.66E-10
239229 at	239229 at	PHEX	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	3.24147073	4.68310778	7.13E-09
238750 at	238750 at	CCL28	C-C motif chemokine ligand 28	3.19429981	6.84027399	2.35E-08
206424 at	206424 at	CYP26A1	cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1	3.16552528	5.27641505	7.81E-10
220158 at	220158 at	LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14	3.15761473	6.93323193	4.38E-10
227949 at	227949 at	PHACTR3	phosphatase and actin regulator 3	3.15550471	3.94766533	1.78E-07
218541 s at	218541 s at	CBorf4	chromosome 8 open reading frame 4	3.11917871	4.79049447	6.32E-09
209771 x at	209771 x at	CD24	CD24 molecule	3.00593921	8.81436341	2.18E-10
222108 at	222108 at	AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	2.98327043	5.50600332	8.81E-08
240557 at	240557 at	TSC22D2	TSC22 domain family member 2	2.90906695	5.5280937	6.24E-09
212097 at	212097 at	CAV1	caveolin 1	2.89060872	7.12302811	2.56E-09
230402 at	230402 at	DUSP15	dual specificity phosphatase 15	-3.1899435	5.01555575	3.87E-09



CAPÍTULO 11**Referencias**

- Abaci, H. E., Truitt, R., Luong, E., Drazer, G., & Gerecht, S. (2010). Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(6), C1527-1537. doi:10.1152/ajpcell.00484.2009
- Balaji Krishnamachary, S. B.-D., Brian Kelly, Faton Agani, David Feldser, Gloria Ferreira, Narayan Iyer, Jessica LaRusch, Brian Pak, Panthea Taghavi, and Gregg L. Semenza. (2003). Regulation of Colon Carcinoma Cell Invasion by Hypoxia-Inducible Factor. *CANCER RESEARCH*, 63, 1138 –1143.
- Befani, C., Mylonis, I., Gkotinakou, I. M., Georgoulas, P., Hu, C. J., Simos, G., & Liakos, P. (2013). Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(11), 2359-2368. doi:10.1016/j.biocel.2013.07.025
- Benita, Y., Kikuchi, H., Smith, A. D., Zhang, M. Q., Chung, D. C., & Xavier, R. J. (2009). An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res*, 37(14), 4587-4602. doi:10.1093/nar/gkp425
- Bradley A. Webb, M. C., Matthew P. Jacobson and Diane L. Barber. (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 11, 671-677. doi:10.1038/nrc3110
- Bristow, R. G., & Hill, R. P. (2008). Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*, 8(3), 180-192. doi:10.1038/nrc2344
- Bustin, S. A. (2004). *A-Z of Quantitative PCR*. (La Jolla, CA: International University Line ed.).



- Chan, D. A., & Giaccia, A. J. (2007). Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 26(2), 333-339. doi:10.1007/s10555-007-9063-1
- Chen, E. I. (2012). Mitochondrial dysfunction and cancer metastasis. *J Bioenerg Biomembr*, 44, 619-622. doi:10.1007/s10863-012-9465-9
- Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med*, 14(4), 771-794. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x
- Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N. M., . . . Pouyssegur, J. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res*, 69(1), 358-368. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2470
- Courtney, R., Ngo, D. C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S. M., & Karagiannis, T. C. (2015). Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep*, 42(4), 841-851. doi:10.1007/s11033-015-3858-x
- Dang, C. V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.*, 26(10), 877-890. doi:10.1101/gad.189365.112
- Davidson T, C. H., Garrick MD, D'Angelo G, and Costa M (2005). Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. . *Mol Cell Biochem*, 279, 157–162.
- Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, 8, 705-713.
- Duyndam MC, H. S., van der Wall E, Pinedo HM, and Boven E (2003). Evidence for a role of p38 kinase in hypoxia-inducible factor 1-independent induction of vascular endothelial growth factor expression by sodium arsenite. . *J Biol Chem*, 278, 6885–6895.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J. W., Shimoda, L., Dang, C. V., & Semenza, G. L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, 129(1), 111-122. doi:10.1016/j.cell.2007.01.047



- Gao N, D. M., Zheng JZ, Zhang Z, Leonard SS, Liu KJ, Shi X, and Jiang BH (2002). Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1a and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 277, 31963–31971.
- Gatenby, R. A., Smallbone, K., Maini, P. K., Rose, F., Averill, J., Nagle, R. B., . . . Gillies, R. J. (2007). Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer*, 97(5), 646-653. doi:10.1038/sj.bjc.6603922
- Gillies, R. A. G. a. R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 4, 891-899. doi:10.1038/nrc1478
- Gisele Höpfl, O. O., and Max Gassmann. (2004). HIFs and tumors - causes and consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, 608–623.
- Gordan, J. D., Thompson, C. B., & Simon, M. C. (2007). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*, 12(2), 108-113. doi:10.1016/j.ccr.2007.07.006
- Görlach, A. (2009). Regulation of HIF-1. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 3844-3852.
- Gregg L. Semenza, M. K. N., Suzie M. Chi, and Stylianos E. Antonarakis. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Sci*, 88, 5680-5684.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2(1), 38-47. doi:10.1038/nrc704
- Huber, V., De Milito, A., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Wahl, M. L., Rauch, C., . . . Fais, S. (2010). Proton dynamics in cancer. *J Transl Med*, 8, 57. doi:10.1186/1479-5876-8-57
- Hulikova, A., Harris, A. L., Vaughan-Jones, R. D., & Swietach, P. (2013). Regulation of intracellular pH in cancer cell lines under normoxia and hypoxia. *J Cell Physiol*, 228(4), 743-752. doi:10.1002/jcp.24221



- Iranon, N. N., & Miller, D. L. (2012). Interactions between oxygen homeostasis, food availability, and hydrogen sulfide signaling. *Front Genet*, *3*, 257. doi:10.3389/fgene.2012.00257
- Jean-Pascal Piret, D. M., Martine Raes and Carine Michiels. (2002). CoCl₂, a chemical inducer of Hypoxia-Inducible factor-1, and Hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *973*, 443-447.
- Josh Haimes, M. K. a. D. (2014). Demonstration of a $\Delta\Delta Cq$ calculation method to compute relative gene expression from qPCR
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, *9*(4), 239-252. doi:10.1038/nrc2618
- Justus, C. R., Sanderlin, E. J., & Yang, L. V. (2015). Molecular Connections between Cancer Cell Metabolism and the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, *16*(5), 11055-11086. doi:10.3390/ijms160511055
- Ke, Q., & Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, *70*(5), 1469-1480. doi:10.1124/mol.106.027029
- Ke Q, K. T., and Costa M (2005). Down-regulation of the expression of the FIH-1 and ARD-1 genes at the transcriptional level by nickel and cobalt in the human lung adenocarcinoma A549 cell line. . *Int J Environ Res Public Health*, *2*, 10–13.
- Lee, D. C., Sohn, H. A., Park, Z. Y., Oh, S., Kang, Y. K., Lee, K. M., . . . Yeom, Y. I. (2015). A lactate-induced response to hypoxia. *Cell*, *161*(3), 595-609. doi:10.1016/j.cell.2015.03.011
- Lenihan, C. R., & Taylor, C. T. (2013). The impact of hypoxia on cell death pathways. *Biochem Soc Trans*, *41*(2), 657-663. doi:10.1042/BST20120345
- Li J, D. G., Huang Y, Jiang BH, Shi X, Costa M, and Huang C. (2004). Nickel compounds act through phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-dependent, p70(S6k)- independent pathway to induce hypoxia inducible factor transactivation and Cap43 expression in mouse epidermal Cl41 cells. . *Cancer Res*, *64*, 94–101.



- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lukyanova, L. D. (2013). Mitochondrial Signaling in Hypoxia. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, 03(02), 20-32. doi:10.4236/ojemd.2013.32A004
- Madshus, I. H. (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem. J*, 250, 1-8.
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 5(5), 378-389. doi:10.1016/j.apsb.2015.05.007
- Maximo, V., Lima, J., Soares, P., & Sobrinho-Simoes, M. (2009). Mitochondria and cancer. *Virchows Arch*, 454(5), 481-495. doi:10.1007/s00428-009-0766-2
- Messineo, S., Laria, A. E., Arcidiacono, B., Chiefari, E., Luque Huertas, R. M., Foti, D. P., & Brunetti, A. (2016). Cooperation between HMGA1 and HIF-1 Contributes to Hypoxia-Induced VEGF and Visfatin Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7, 73. doi:10.3389/fendo.2016.00073
- Michael Höckel, P. V. (2001). Tumor Hypoxia Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 266-276.
- Neri, D., & Supuran, C. T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov*, 10(10), 767-777. doi:10.1038/nrd3554
- Otto Warburg, F. W. a. E. N. (1926). The metabolism of tumor in the body. *The Journal of General Physiology*, 519-530.
- Pelicano, H., Xu, R. H., Du, M., Feng, L., Sasaki, R., Carew, J. S., . . . Huang, P. (2006). Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol*, 175(6), 913-923. doi:10.1083/jcb.200512100



- Pouyssegur, J., Dayan, F., & Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, *441*(7092), 437-443. doi:10.1038/nature04871
- Raul Martinez-Zaguilán, E. A. S., Richard E. B. Seftor, Yi-Wen Chu, Robert J. Gillies and Mary J. C. Hendrix. (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *14*, 176-186.
- Roland H. Wenger, D. P. S., Gieri Camenisch. (2005). Integration of Oxygen Signaling at the Consensus HRE. *Science's STKE*.
- Rosa A. Cardone, V. C. a. S. J. R. (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer*, *5*, 786-795. doi:10.1038/nrc1713
- Ruoxiang Wang, F. J., Hua Zhong. (2014). A novel experimental hypoxia chamber for cell culture. *Am J Cancer Res*, *4*(1), 53-60.
- SC, H. J. a. L. (2001). A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. *FEBS Lett*, *505*, 269-274.
- Schulze, A., & Harris, A. L. (2012). How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*, *491*(7424), 364-373. doi:10.1038/nature11706
- Schwab, C. S. a. A. (2009). Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Arch*, *458*(5), 981-992. doi:10.1007/s00424-009-0677-8
- Scott K. Parks, J. C. a. J. P. g. (2013). Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, *13*, 611-623. doi:10.1038/nrc3579
- Shan, G. (2010). RNA interference as a gene knockdown technique. *Int J Biochem Cell Biol*, *42*(8), 1243-1251. doi:10.1016/j.biocel.2009.04.023
- Simon, L. L. a. M. C. (2004). Regulation of transcription by hyoxia. *Cancer Biology & Therapy*, *3*:6, 492-497.
- Sorensen, B. S., Alsner, J., Overgaard, J., & Horsman, M. R. (2007). Hypoxia induced expression of endogenous markers in vitro is highly influenced by pH. *Radiother Oncol*, *83*(3), 362-366. doi:10.1016/j.radonc.2007.04.028



- Sorensen, B. S., Hao, J., Overgaard, J., Vorum, H., Honore, B., Alsner, J., & Horsman, M. R. (2005). Influence of oxygen concentration and pH on expression of hypoxia induced genes. *Radiother Oncol*, 76(2), 187-193. doi:10.1016/j.radonc.2005.06.037
- Sorensen, B. S., Knudsen, A., Wittrup, C. F., Nielsen, S., Aggerholm-Pedersen, N., Busk, M., . . . Alsner, J. (2015). The usability of a 15-gene hypoxia classifier as a universal hypoxia profile in various cancer cell types. *Radiother Oncol*, 116(3), 346-351. doi:10.1016/j.radonc.2015.06.028
- Supuran, D. N. a. C. T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Cancer*, 10, 767-777. doi:10.1038/nrd3554
- Talita Antunes Guimarães, L. C. a. o. F., Eliane Sobrinho Santos, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Lissur Azevedo Orsini, Leandro de Freitas Teles, John David Feltenberger, Sabrina Ferreira de Jesus, Marcela Gonçalves de Souza, Sérgio Henrique Sousa Santos, Alfredo Maurício Batista de Paula, Ricardo Santiago Gomez, André Luiz Sena Guimarães. (2016). Metformin increases PDH and suppresses HIF-1 α under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7, 55057-55068.
- Tannock, M. J. B. a. I. F. (1992a). Regulation of Intracellular pH in Tumor Cell Lines Influence of Microenvironmental Conditions. *cancer research*, 52, 4441-4447.
- Tannock, M. J. B. a. I. F. (1992b). Regulation of Intracellular pH in Tumor Cell Lines Influence of Microenvironmental Conditions. *Cancer Res*, 52, 4441-4447.
- Toni Y. Reynolds, S. R. a. P. M. G. (1996). Genetic Instability Induced by the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*, 56, 5754-5757.
- U. R. Jewell, I. K. V., A. Scheid, C. Bauer, R. H. Wenger, M. Gassmann. (2001). Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *The FASEB Journal*.
- Wallace, D. C. (2005). Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 363-374. doi:10.1101/sqb.2005.70.035



- Wang GL, a. S. G. (1993). Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82, 3610–3615.
- Weidemann, A., & Johnson, R. S. (2008). Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*, 15(4), 621-627. doi:10.1038/cdd.2008.12
- William C. Copeland, J. T. W., F. M. Johnson and, & Penta, J. S. (2002). Mitochondrial DNA Alterations in Cancer. *Cancer Investigation*, 20, 557-569.
- Wilson, W. R., & Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 11(6), 393-410. doi:10.1038/nrc3064
- Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp*(54). doi:10.3791/2899
- Yuan Y, H. G., Ferguson T, and Millhorn DE (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor a and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor a *J Biol Chem*, 278, 15911–15916.
- Zeng, H. L., Zhong, Q., Qin, Y. L., Bu, Q. Q., Han, X. A., Jia, H. T., & Liu, H. W. (2011). Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol*, 12, 32. doi:10.1186/1471-2121-12-32
- Zuo, J., Wen, J., Lei, M., Wen, M., Li, S., Lv, X., . . . Wen, G. (2016). Hypoxia promotes the invasion and metastasis of laryngeal cancer cells via EMT. *Med Oncol*, 33(2), 15. doi:10.1007/s12032-015-0716-6
- https://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Disease__Model

