

Estudio de marcadores de estrés celular y parámetros metabólicos en un microambiente hipóxico in vitro en queratinocitos inmortalizados con los oncogenes virales del VPH-18

Natali D'Aiuto^{1,2},  0000-0002-4977-6972

Jimena Hochmann^{1,3},  0000-0002-0875-2333

Magdalena Millán¹,  0000-0002-0341-5127

Ronell Bologna-Molina⁴,  0000-0001-9755-4779

José Sotelo Silveira^{1,5},  0000-0002-4758-8556

Miguel Arocena^{1,2},  0000-0002-7682-4028



Resumen

Introducción: La hipoxia es una condición de deficiencia de oxígeno en las células de los tejidos que puede ocurrir en situaciones fisiopatológicas, como el cáncer ^(1,2). Por otro lado, el estrés oxidativo también es una característica frecuente del microambiente tisular, y juega un papel clave en la fisiología de las células tumorales a medida que crecen y avanzan hacia el estroma ⁽³⁾. Ambos procesos están íntimamente relacionados, por lo tanto, ensayos que permitan visualizar simultáneamente el estado hipóxico y oxidativo de las células en condiciones de bajo nivel de oxígeno, podrían contribuir a modelar la interacción entre la hipoxia y el estrés oxidativo in vitro.

Objetivos: Estudiar los niveles de hipoxia y estrés oxidativo simultáneamente en células HaCaT transducidas con los oncogenes del VPH-18 (HaCaT E5/E6/E7-18) ⁽⁴⁾ mediante la variante del método de hipoxia inducida por cubreobjetos ⁽⁵⁾. Evaluar el metabolismo de dichas células en condiciones de normoxia e hipoxia.

Métodos: Se utiliza la variante del método de hipoxia inducida por cubreobjetos para generar gradientes de hipoxia intracelular en HaCaT E5/E6/E7-18. Para visualizar este gradiente se utiliza una sonda que detecta la hipoxia en células vivas. A su vez, es posible detectar en simultáneo niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante el empleo de una sonda específica. Con el fin de medir la respiración y la acidificación en las células HaCaT E5/E6/E7-18 en relación a las células control, se utiliza el equipo "Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer" de la Facultad de Medicina. Además, para estudiar los cambios metabólicos en condiciones de hipoxia en relación a normoxia, se miden cambios de pH y producción de CO₂ mediante el Radiómetro ABL800 Flex del Hospital de Clínicas.

Resultados y Discusión: Observamos niveles más altos de hipoxia en células alejadas de una fuente de oxígeno y un descenso en los niveles de estrés oxidativo. Además, observamos que las células HaCaT E5/E6/E7-18 presentan una mayor tasa de acidificación extracelular, y un mayor consumo de oxígeno en relación a las células control. Además, observamos que HaCaT E5/E6/E7-18 en condiciones de hipoxia presentan una disminución de pH y un aumento en la presión de CO₂ en relación a normoxia.

Palabras clave: hipoxia, estrés oxidativo, normoxia.

¹Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay

²Cátedra de Bioquímica y Biofísica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay

³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

⁴Departamento de Patología Molecular, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay

⁵Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

Referencias

1. R.J. Gillies, R.A. Gatenby, Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis, *Cancer Metastasis Rev.* 26. 2007; 311–317. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9065-z>.
2. Lee, N.S. Chandel, M.C. Simon, Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21. 2020; 268–283. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0227-y>.
3. R.D. Guzy, B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. Liu, K.D. Mansfield, M.C. Simon, U. Hammerling, P.T. Schumacker, Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing, *Cell Metab.* 1. 2005; 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.001>.
4. Hochmann, J., Parietti, F., Martínez, J., Lopez, A.C., Carreño, M., Quijano, C., Boccardo, E., Sichero, L., Möller, M.N., Mirazo, S., Arbiza, J.. Human papilloma-virus type 18 e5 oncoprotein cooperates with e6 and e7 in promoting cell viability and invasion and in modulating the cellular redox state. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2020;115, e190405 . <https://doi.org/10.1590/0074-02760190405>.
5. Arocena, M; Landeira, M; Di Paolo, A Silva, A; Sotelo Silveira, J; Fernández, A; Alonso, J. Using a variant of coverslip hypoxia to visualize tumor cell alterations at increasing distances from an oxygen source, *J. Cell. Physiol.* 2019; jcp.28507. <https://doi.org/10.1002/jcp.28507>.

Financiación: CSIC Iniciación, Fondo Santander 2020, PEDECIBA Biología.