



Universidad  
Zaragoza



## Trabajo de Fin de Grado

### Grado en Biotecnología

# EFECTO DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS EN CÉLULAS TUMORALES.

*“Effect of genetic and environmental factors on  
the organization of the OXPHOS system in  
tumor cells”*

Autora:

Alba Díaz San Martín

Directores:

Dra. Raquel Moreno Loshuertos

Dr. Patricio Fernández Silva

Grupo GENOXPHOS.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

Facultad de Ciencias.

Universidad de Zaragoza, curso 2023-2024.

## Tabla de contenido

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y CELULARES DEL CÁNCER .</b>	<b>2</b>
<b>2.2 MITOCONDRIAS Y SISTEMA OXPHOS .....</b>	<b>2</b>
<b>2.3 METABOLISMO DEL CÁNCER Y EFECTO WARBURG .....</b>	<b>4</b>
<b>2.4 CÁNCER Y MITOCONDRIAS .....</b>	<b>5</b>
<b>2.5 CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>6</b>
<b>3 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1 CULTIVOS CELULARES .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.1 LÍNEAS CELULARES .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.3 CULTIVO CELULAR .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.4 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES</b>	<b>8</b>
<b>4.1.5 RECuento CELULAR .....</b>	<b>8</b>
<b>4.2 ELABORACIÓN DE GELES DE AGAROSA Y ELECTROFORESIS .....</b>	<b>8</b>
<b>4.3 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....</b>	<b>8</b>
<b>4.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO .....</b>	<b>8</b>
<b>4.3.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA .....</b>	<b>8</b>
<b>4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....</b>	<b>9</b>
<b>4.4.1 PCR .....</b>	<b>9</b>
<b>4.4.2 PCR EN TIEMPO REAL .....</b>	<b>9</b>
<b>4.5 GENERACIÓN DE CÍBRIDOS .....</b>	<b>9</b>
<b>4.5.1 GENERACIÓN DE LÍNEAS CARENTES DE DNA MITOCONDRIAL (p°) .....</b>	<b>9</b>
<b>4.5.2 ENUCLEACIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>4.5.3 FUSIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>4.5.4 SELECCIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>4.6 SECUENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MDA.MB468 .....</b>	<b>10</b>

4.6.1 ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN m.4794G>A EN EL MTDNA MEDIANTE RFLP .....	10
4.7 MEDIDA DE RESPIRACIÓN CELULAR.....	11
4.8 MEDIDA DE LA CITOTOXICIDAD DE METFORMINA Y DICLOROACETATO.....	11
4.9 PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS PARA ENSAYOS DE ELECTROFORESIS NATIVA .....	11
4.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BLUE NATIVE .....	12
4.11 ENSAYO DE ACTIVIDAD EN GEL (IGA) .....	12
4.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	12
4.13 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.....	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
5.1 SECUENCIACIÓN DE LA LÍNEA MDA.MB468.....	13
5.1.1 MUTACIÓN m.4794G>A E IMPACTO SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS.....	13
5.1.2 HETEROPLASMIA m.12385delC* E IMPACTO SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS.....	15
5.2 GENERACIÓN DE LÍNEAS $\rho^0$ .....	16
5.3 GENERACIÓN DE CÍBRIDOS .....	18
5.4 RESPIRACIÓN CELULAR.....	18
5.5 ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DE DNA MITOCONDRIAL.....	19
5.6 MEDIDA DE CITOTOXICIDAD DE METFORMINA Y DICLOROACETATO.....	20
5.7 FUNCIONALIDAD Y ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS .....	22
6. CONCLUSIONES .....	22
7. BIBLIOGRAFÍA .....	24
8. ANEXOS.....	

## ABREVIATURAS

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato

BN-PAGE: “*Blue Native electrophoresis*”

BP: Pares de bases

Cíbridos: Híbridos citoplasmáticos transmitocondriales

Cyt C: Citocromo C

CI: Complejo I, NADH deshidrogenasa

CII: Complejo II, succinato deshidrogenasa, SDH

CIII: Complejo III, citocromo c reductasa

CIV: Complejo IV, citocromo c oxidasa, COX

CV: Complejo V, ATP sintasa

DCA: Dicloroacetato

DMEM: “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*”

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNP: Dinitrofenol

EB: Bromuro de etidio

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ER: Receptor de estrógenos

EB: Bromuro de etidio.

ETC: Cadena de transporte electrónico

ETOH: Etanol

FADH<sub>2</sub>: Dinucleótido de flavina y adenina en su forma reducida

FMN: Flavin mononucleótido

FMOL: Femtomol

HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano

IGA: “*In Gel Activity*”

KCN: Cianuro de potasio

LA: Luminal A

MRC: Cadena respiratoria mitocondrial

MTDNA: DNA mitocondrial

MTT: Bromuro de dimetil-tiazoliltetrazolio

NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina en su forma reducida

nDNA: DNA nuclear

OXPPOS: “*Oxidative Phosphorylation System*”

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDH: piruvato deshidrogenasa

PDK: Piruvato deshidrogenasa quinasa

PEG: Polietilenglicol

PR: Receptor de progesterona

Q: Ubiquinona

QH<sub>2</sub>: Ubiquinol

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RFLP: “*Restriction Fragment Length Polymorphism*”

RNA: Ácido ribonucleico

RPM: Revoluciones por minuto

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCs: Supercomplejos

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TNBC: Triple negativo

TNA: Triple negativo A

TNB: Triple negativo B

TRNA: RNA de transferencia

## **1. RESUMEN**

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para numerosos procesos fisiológicos como la producción de energía, metabolismo celular, apoptosis y producción de especies reactivas de oxígeno. Tanto las variantes en la secuencia como el número de copias de DNA mitocondrial están estrechamente implicados en el proceso de carcinogénesis, induciendo la generación de tumores primarios o favoreciendo la adaptación de las células cancerosas a diferentes ambientes tumorales. Asimismo, la organización del sistema OXPHOS es crucial en la funcionalidad de la mitocondria y su disfunción se relaciona con el transcurso de la tumorigénesis.

En este trabajo se analiza la influencia mitocondrial en el proceso de tumoral. Con este objetivo se generan y seleccionan híbridos citoplasmáticos transmitocondriales (cíbridos) a partir de varias líneas celulares de cáncer de mama que exhiben diferente potencial metastático. De este modo se desvincula de las mitocondrias la influencia su fondo genético nuclear permitiendo así determinar el papel mitocondrial en la tumorigénesis. A partir de estas líneas celulares se determina su número de copias de DNA mitocondrial, tasas de respiración celular o respuesta a fármacos con la finalidad de evaluar el efecto de factores genéticos y ambientales sobre la función mitocondrial y organización del sistema OXPHOS. Asimismo, se secuencian el genoma mitocondrial de una línea tumoral de cáncer de pecho. Los resultados han permitido detectar dos mutaciones que afectan a las subunidades ND2 y ND5 del complejo I mitocondrial y cuyo modelado predice diferentes grados de impacto a nivel estructural. Además, a partir de los cíbridos se determina que las células tumorales con distinta capacidad invasiva presentan diversos defectos mitocondriales que afectan a la funcionalidad del sistema OXPHOS favoreciendo el proceso de tumorigénesis y que la modulación de la mitocondria puede ser una estrategia terapéutica para tratar el cáncer.

## **1. ABSTRACT**

Mitochondria are essential organelles for numerous physiological processes such as energy production, cellular metabolism, apoptosis and production of reactive oxygen species. Both sequence variations and the number of copies of mitochondrial DNA are closely involved in the carcinogenesis process, inducing the generation of primary tumors or favouring the adaptation of cancer cells to different tumor environments. Furthermore, the organisation of the OXPHOS system is crucial in the functionality of mitochondria and its dysfunction is related to the course of tumourigenesis.

In this work, the mitochondrial influence on the tumour process is analyzed. Within this aim cytoplasmic transmitochondrial hybrids (cybrids) are generated and selected from several breast cancer cell lines that exhibit different metastatic potential. In this way, the influence of the mitochondrial nuclear genetic background is unlinked from the mitochondria, allowing the determination of the mitochondrial role in tumorigenesis. From these cellular lines, their number of copies of mitochondrial DNA, rates of cellular respiration or response to drugs are determined in order to evaluate the effect of genetic and environmental factors on mitochondrial function and organisation of the OXPHOS system. Likewise, the mitochondrial genome of a breast cancer tumor line is sequenced. The results have allowed to detect two mutations that affect the ND2 and ND5 subunits of mitochondrial complex I and whose modelling predicts different degrees of impact at the structural level. In addition, it is determined from the cybrids, that tumour cells with different invasive capacity present different mitochondrial defects that affect the functionality of the OXPHOS system favouring the tumourigenesis process and that the modulation of mitochondria may be a therapeutic strategy to treat cancer.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y CELULARES DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad causada por un crecimiento celular descontrolado, excesivo y con capacidad de invadir áreas que generalmente corresponden a otras células. Las células cancerosas se definen por dos propiedades heredables: en primer lugar, desafían las restricciones normales de división celular y crecimiento; en segundo lugar, invaden y colonizan territorios que habitualmente están reservados para otras células. Como consecuencia del aumento de población de células anormales que crecen y se dividen fuera de control se genera un tumor o neoplasia. Si las células neoplásicas no adquieren propiedades invasivas el tumor se considera benigno. Por el contrario, se considerará cáncer solamente si el tumor tiene capacidad invasiva. La invasividad es la característica diferencial implicada en la generación de tumores secundarios o metástasis (1). La metástasis es un proceso complejo, que engloba múltiples subprocesos que ocurren en paralelo, por el que las células cancerosas de un cáncer primario se diseminan hacia órganos distales a través de la circulación sanguínea o vasos linfáticos, y esta es la principal causa de mortalidad del cáncer (1,2).

Los cánceres se clasifican en función del tejido y tipo celular del que derivan. Los carcinomas se originan a partir de células epiteliales y constituyen la mayoría de los cánceres humanos. Por otro lado, los sarcomas surgen a partir de células musculares o tejido conectivo. Además, existen otros como leucemias y linfomas, cuyo origen radica en leucocitos y células hematopoyéticas, así como cánceres derivados del sistema nervioso (1).

Aunque los diferentes tipos de cáncer muestran amplia heterogeneidad y diversidad genética, hay ciertas características que son comunes en la transformación de células normales a neoplásicas, y estos se han establecido como “*hallmarks*” o marcadores del cáncer. Estos “*hallmarks*” fueron establecidos por Bob Weinberg y Douglas Hanahan como una herramienta heurística para simplificar la gran complejidad de procesos tumorales en un conjunto básico de principios fundamentales que describen las capacidades que adquieren las células sanas en su transición a tumorales, a pesar de que el cáncer se desarrolle como consecuencia de múltiples procesos (3).

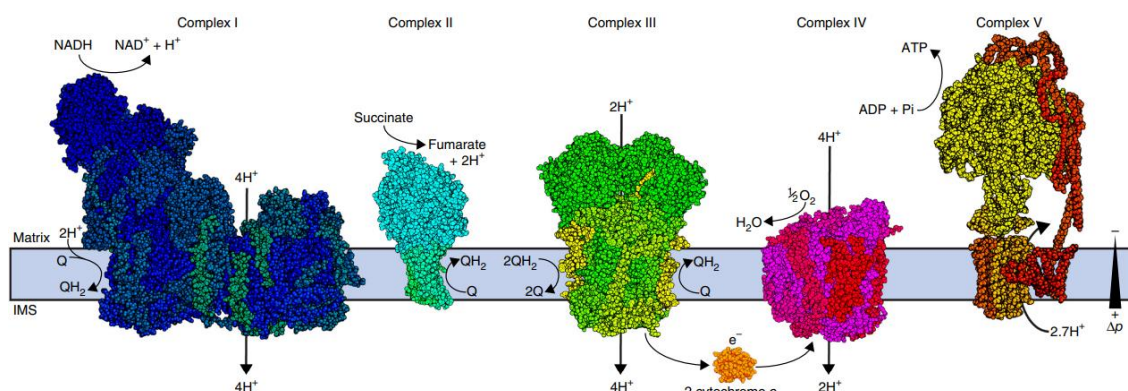
Estas características son: (a) capacidad para mantener las señales relativas a la proliferación, (b) evasión de los supresores del crecimiento, (c) resistencia a la muerte celular, (d) inducción y acceso a la vascularización, (e) activación de la invasión y la metástasis, (f) capacidad ilimitada de replicación, (g) reprogramación del metabolismo celular y (h) evasión de la destrucción por parte del sistema inmune. Los 6 primeros (a-f) se establecieron en el año 2000, y los dos últimos (g-h) se propusieron en 2011 como marcadores emergentes. Este mismo año se enunciaron dos *hallmarks* capacitantes que facilitan la adquisición de otros “*hallmarks*”: (i) inflamación promovida por el tumor e (j) inestabilidad genómica y mutaciones. A estos 10 “*hallmarks*” se les integran otros 4 más, propuestos por los mismos autores en 2022, y estos son (k) desbloqueo de la plasticidad fenotípica, (l) senescencia celular, (m) reprogramación epigenética no mutacional (4) y (n) microbiomas polimórficos, siendo estos dos últimos “*hallmarks*” capacitantes (3).

### 2.2 MITOCONDRIAS Y SISTEMA OXPHOS

La mitocondria es el orgánulo citoplasmático responsable de la síntesis de la mayor parte del ATP celular mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Está constituida por un sistema de doble membrana, separadas por un espacio intermembrana, en el que la membrana mitocondrial externa es fácilmente permeable a moléculas pequeñas (menos de 5 kDa) e iones, que difunden libremente a través de canales transmembrana compuestos por porinas. Por el

contrario, la membrana mitocondrial interna es impermeable a la mayoría de los iones y moléculas pequeñas, por lo que las especies que la atraviesan lo hacen por medio de transportadores específicos. Esta membrana interna alberga la cadena de transporte electrónico (ETC) incluyendo los complejos I-IV, ATP sintasa (complejo V), ADP-ATP translocasa y otros transportadores de membrana. Tiene pliegues denominados crestas, que contribuyen al aumento del área superficial. A su vez, la membrana interna acota el espacio de la matriz mitocondrial. En esta región se localizan el complejo de la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo del ácido cítrico (o ciclo de Krebs), la ruta de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y las rutas implicadas en la oxidación de los aminoácidos (1).

El sistema OXPHOS está compuesto por complejos respiratorios. El complejo I es el de mayor tamaño y transfiere electrones del NADH a la ubiquinona (Q) que se reduce al ubiquinol (QH<sub>2</sub>) y el complejo II cataliza la transformación enzimática de succinato a fumarato, y por medio de FADH<sub>2</sub> transfiere los electrones también a Q que se reduce a QH<sub>2</sub>. El complejo III cede los electrones desde QH<sub>2</sub> hasta el citocromo c, localizado en el espacio intermembrana. Por último, el citocromo c cede los electrones al complejo IV, donde se transfieren al O<sub>2</sub> dando lugar a H<sub>2</sub>O. El flujo electrónico está acoplado a un gradiente de protones, ya que estos se bombean de la matriz mitocondrial interna al espacio intermembrana por los complejos I, III y IV, y dicho gradiente se emplea para la síntesis de ATP a partir de ADP por la ATP sintasa por fosforilación oxidativa (5).



**Figura 1: Representación del sistema OXPHOS a partir de modelos estructurales determinados experimentalmente de mitocondrias de mamíferos.** La membrana interna mitocondrial se representa como un rectángulo azul. Q: Ubiquinona; QH<sub>2</sub>: Ubiquinol; IMS: Espacio intermembrana (6).

Algunos de los complejos individuales de la cadena electrónica interactúan físicamente y se ensamblan generando estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos (SCs) (7,8) y se han propuesto varios modelos para explicar la organización supramolecular de estos.

En cuanto al modelo sólido, los estudios pioneros por espectrometría de Chance y Williams representaban MRC como un conjunto sólido de grupos prostéticos que llevan a cabo reacciones redox de forma secuencial en una matriz proteica. Las pruebas que respaldan el modelo rígido o de estado sólido se fundamentan en el aislamiento de CI-CIII y CII-CIII activas en una proporción estequiométrica 1:1 durante pasos intermedios de purificación de las enzimas individuales (7).

Por el contrario, el modelo fluido postula que los CI-CIV, ATP sintasa y componentes redox difunden libremente de forma independiente, y la transferencia de electrones se da por colisiones aleatorias. Se respalda por la evidencia de que Q y Cyt c están en un único “pool” en mitocondrias de mamíferos y se han aislado complejos individuales que retienen la actividad enzimática (7).

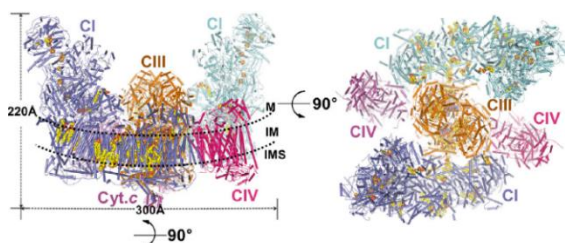
Asimismo, hay un tercer modelo dinámico de plasticidad, que integra estos dos modelos clásicos que suponen casos extremos, planteando la existencia de un equilibrio entre la difusión libre de



los complejos y sus asociaciones, pudiendo coexistir los SCs con los complejos individuales de ETC (8). En este caso, los complejos se asociarían de forma transitoria y reversible, y los componentes redox difundirían lateralmente (7).

Asimismo, la combinación de métodos como microscopía electrónica de partícula única, acoplamiento de estructuras, construcción por homología y modelado “*de novo*” han permitido obtener las estructuras del supercomplejo  $SC_{I_2III_2IV_1}$  y megacomplejo  $MC_{I_2III_2IV_2}$  (9).

El megacomplejo respiratorio humano  $MC_{I_2III_2IV_2}$  representa el mayor grado de ensamblaje de los complejos respiratorios y constituye una estructura circular en la que CIII en su forma dimérica se localiza en el centro y está rodeada por dos subunidades de CI y CIV. Asimismo, dos moléculas de citocromo c se posicionan en la superficie de CIII donde actúan como aceptores de electrones (9).



**Figura 2: Estructura de  $MC_{I_2III_2IV_2}$  mostrada en 2 vistas rotadas.** Cada complejo aparece coloreado e indicado de un color diferente. La región transmembrana se marca por líneas discontinuas. M: matriz, IM: membrana interna, IMS: espacio intermembrana (9).

El mtDNA tiene herencia materna y es una molécula circular de doble cadena de 16,5 kb que codifica 7 de los 45 polipéptidos del complejo I (NADH ubiquinona-oxidorreductasa), 1 de los 11 polipéptidos del complejo III (Citocromo bc1), 3 de los 13 polipéptidos del complejo IV (Citocromo c oxidasa, COX), 2 de los 18 polipéptidos del complejo V, 22 tRNAs y las subunidades 12 S y 16 S del RNA ribosómico, así como una región control constituida por 1122 nucleótidos. El resto de las funciones mitocondriales están codificadas por el DNA nuclear, incluyendo las 4 subunidades del complejo II (Succinato deshidrogenasa) (10).

El mtDNA tiene una alta tasa de mutación debido a la ausencia de sistemas eficientes de reparación de errores, y estas dan lugar a la heteroplasmia, que es la presencia de mtDNA original y mtDNA con mutaciones en la misma célula o individuo. A este fenómeno se le contrapone la homoplasmia, que es la situación en la que todas las moléculas de mtDNA son idénticas (11).

### 2.3 METABOLISMO DEL CÁNCER Y EFECTO WARBURG

Las células tumorales en diferentes estadios dependen del metabolismo de la glucosa en distinto grado ya que estas exhiben plasticidad metabólica durante el proceso de metástasis. La energía celular la aporta principalmente el metabolismo de los carbohidratos y se han descrito varios efectos que explican el consumo de glucosa (12).

Según el “efecto Pasteur” las bajas concentraciones de oxígeno favorecen la fermentación, mientras que los niveles altos de este la inhiben, favoreciendo la respiración aeróbica y reduciendo la glucólisis aerobia (12).

Por otra parte, en 1923 Otto Warburg descubrió diferencias significativas en el metabolismo de carbohidratos de células tumorales y células normales. El “efecto Warburg” explica la reprogramación metabólica experimentada por las células tumorales, mediante la transición de la fosforilación oxidativa a la glucólisis aerobia, con un alto consumo de glucosa y producción de ácido láctico en presencia de concentraciones fisiológicas de oxígeno y mitocondrias funcionales. De este modo se generan grandes cantidades de ácido láctico en el citosol causando acidosis láctica. Este efecto facilita la rápida producción de ATP en estos tejidos y además proporciona

intermediarios metabólicos esenciales y precursores para la síntesis de fosfolípidos y ácidos nucleicos. Por esta razón la tasa de crecimiento de las células cancerosas es más rápida que en las normales, ya que este les permite crear un microambiente apto para que las células tumorales sobrevivan y promueve su capacidad invasiva y de metástasis, a la vez que les permite escapar de los mecanismos de inmunidad corporal y apoptosis (12).

## 2.4 CÁNCER Y MITOCONDRIAS

Las mitocondrias desempeñan diversos roles en el cáncer, ya que son orgánulos complejos que están implicados en la bioenergética y señalización celular, siendo esto imprescindible en los procesos de adaptación celular al ambiente (13). Son responsables de procesos fisiológicos como la producción de ATP vía OXPHOS, ciclo de Krebs, metabolismo de lípidos, aminoácidos y nucleótidos. Asimismo, están implicadas en reacciones redox, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), regulación de los niveles citoplasmáticos de calcio, biosíntesis de precursores como el Acetil-CoA y las pirimidinas, iniciación de la apoptosis... (5). Por ello, las mitocondrias son importantes mediadoras de la tumorigénesis, ya que este proceso requiere flexibilidad para adaptarse a las alteraciones del ambiente tumoral y los tratamientos contra el cáncer. El proceso de tumorigénesis, a su vez, implica la biogénesis y recambio mitocondrial, dinámicas de fusión y fisión, muerte celular, estrés oxidativo o señalización, entre otras. Sin embargo, las funciones de la mitocondria en el cáncer varían según factores genéticos, medioambientales y existen diferencias en función del tejido de origen (13).

Las variaciones en la secuencia de mtDNA son comunes en ciertos tumores. En el contexto de cáncer, se distinguen mutaciones “*de novo*” que juegan un papel de “inductores” de la carcinogénesis, induciendo la generación de tumores primarios y la transformación neoplásica, así como variantes funcionales que actúan como “adaptadores”, permitiendo a las células cancerosas adaptarse y proliferar en un determinado ambiente. Estas variantes a su vez pueden proceder de variantes heredadas, mutaciones somáticas propias que surgen en cada célula o individuo y variantes asociadas a linajes antiguos de mtDNA (haplogrupos) que favorecen la adaptación a cambios en entornos tisulares o geográficos. Las variantes en el mtDNA pueden contribuir a un crecimiento tumoral acelerado, favorecer procesos metastáticos y conferir resistencia a los tratamientos. Además de la variación en la secuencia, el número de copias de mtDNA puede tener un impacto crucial en el proceso de oncogénesis (10).

A pesar de que las células tumorales dependen en gran medida de la glucólisis aerobia, se ha demostrado que las mitocondrias funcionales son cruciales para las células cancerosas, lo que ha podido verificarse por la eliminación de mtDNA de estas, generando células  $\rho^0$ . Las células  $\rho^0$  se obtienen a partir de células que han sido expuestas durante largos periodos de tiempo a bromuro de etidio (EB) u otros compuestos y han perdido su mtDNA (5). El EB se intercala en el DNA mitocondrial e impide su replicación, sin tener efecto en la replicación del DNA nuclear si se emplean concentraciones relativamente bajas de este (14). Las células  $\rho^0$  resultantes son auxótrofas para uridina y en algunos casos, también dependen de la adición de piruvato (15,16). Por esto, para la generación de estas líneas se emplean medios suplementados con uridina y piruvato. Estas células carecen de 13 genes que son esenciales en los complejos I, III, IV y V y en consecuencia no pueden formar los supercomplejos respiratorios, impidiendo por tanto el transporte electrónico mitocondrial y la respiración (15). La auxotrofia a uridina se debe a que la dihidroorotato deshidrogenasa, una enzima implicada en la ruta biosintética de las pirimidinas y localizada en la membrana interna mitocondrial, requiere transporte electrónico mitocondrial para su función (14). La importancia del mtDNA en cáncer se ha podido confirmar también por el

intercambio de células con mtDNA patogénico o normal, lo que resulta en una alteración de los fenotipos cancerosos (5).

## **2.5 CÁNCER DE MAMA**

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más prevalente en mujeres, aunque puede ocurrir también en hombres con una frecuencia menor al 1%. Entre los factores de riesgo más importantes se encuentran antecedentes familiares, envejecimiento, factores hormonales y factores relacionados con el estilo de vida como la inactividad física, obesidad o consumo de alcohol (17).

El cáncer de mama o pecho es una enfermedad muy heterogénea desde el punto de vista clínico y se distinguen varios subtipos cuya clasificación ha ido evolucionando a lo largo de los años. La clasificación más ampliamente aceptada es desde una perspectiva inmunohistoquímica, basada en la expresión de receptores hormonales: estrógeno (ER), progesterona (PR) y factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (18).

El receptor de estrógenos (ER) es determinante en el diagnóstico ya que un 70-75 % de los carcinomas de pecho invasivos tienen una expresión elevada de este. Por su parte, el receptor de progesterona se expresa generalmente en más del 50 % de los pacientes que expresan ER, y raramente en los pacientes ER negativo. La expresión del receptor de progesterona está regulada por el receptor de estrógeno, por lo que los valores fisiológicos de PR informan sobre la funcionalidad de la ruta de ER. Una mayor expresión de PR se asocia de forma positiva con la supervivencia general, mientras que, por el contrario, niveles más bajos se asocian con una enfermedad más agresiva y peor pronóstico (18).

En cuanto a HER2, se expresa aproximadamente en un 15-25 % de los cánceres de pecho y su sobreexpresión es uno de los primeros eventos en el proceso de carcinogénesis. Esto conduce a una sobreactivación de las vías de señalización protooncogénicas, lo que resulta en un crecimiento celular canceroso descontrolado, asociado también a los peores resultados clínicos (18).

Según la expresión de estos marcadores se reconocían inicialmente 4 subtipos de cáncer de mama: luminal A, luminal B, subtipo HER2 y triple negativo (TNBC) (18). De acuerdo con la clasificación seguida por la literatura actual, en general, no se diferencian las líneas luminales entre A y B; las líneas HER2 positivas se dividen en luminal-HER2+ (luminal B) y ER-negativo-HER2+; y las líneas triple negativas se dividen en subtipo basal A o basal B. Hay una buena correlación entre las características morfológicas de los subtipos en tumores y líneas celulares, siendo los tumores luminales los menos agresivos y los que tienen mejor pronóstico, mientras que las líneas triples negativas son más agresivas y de peor pronóstico. Dentro de estas últimas, el subtipo basal B es más agresivo que el basal A (19).

## **3 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

La interacción entre el proceso de tumorigénesis y la función mitocondrial es un aspecto crucial en la comprensión del cáncer, ya que las mitocondrias son orgánulos altamente complejos y desempeñan un papel fundamental en la regulación de la iniciación, proliferación, supervivencia y capacidad metastásica de las células cancerosas. Las mitocondrias aportan una importante flexibilidad a nivel bioenergético, modulando la respuesta al estrés oxidativo y la susceptibilidad a la muerte celular, lo que confiere a las células cancerosas la capacidad de sobrevivir en entornos adversos y resistir mejor a los tratamientos oncológicos. Por lo tanto, para abordar de manera efectiva el cáncer es imprescindible considerar la contribución de las mitocondrias en el desarrollo y progresión de la enfermedad (20).

El trabajo se encuentra enmarcado en una investigación para aumentar el conocimiento sobre las diferencias en la función y estructura del sistema OXPHOS entre líneas celulares de cáncer de mama con distinto potencial metastático. Los objetivos son los siguientes:

- Secuenciar el DNA mitocondrial de la línea celular MDA.MB468, modelar sus variantes y su impacto sobre la organización del sistema OXPHOS.
- Generar y seleccionar líneas celulares carentes de DNA mitocondrial (líneas  $\rho^0$ ).
- Generar y seleccionar híbridos citoplasmáticos transmitocondriales (cíbridos) a partir de líneas celulares de cáncer de pecho que exhiben diferente potencial metastático.
- Evaluar el papel del mtDNA en el cáncer comparando cíbridos que comparten el mismo fondo genético nuclear, asociando las diferencias resultantes al mtDNA.
- Evaluar la respuesta celular de los cíbridos en presencia de diferentes factores genéticos y ambientales y su efecto sobre la organización del sistema OXPHOS.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 CULTIVOS CELULARES**

#### **4.1.1 LÍNEAS CELULARES**

Las líneas celulares empleadas son MDA.MB468, MDA.MB231, MCF-7 y 613. A partir de estas se generan líneas carentes de DNA mitocondrial, y posteriormente híbridos citoplasmáticos transmitocondriales.

La línea MCF-7 es positiva para ER y PR y negativa para HER2, por lo que se clasifica como Luminal A (LA) y procede de un carcinoma ductal invasivo. Por su parte, la línea MDA.MB468 es negativa para ER, PR y HER2 y se cataloga como Triple Negativa A (TNA) / Basal A. Asimismo, MDA.MB231 también es negativa para ER, PR y HER2, y pertenece al subgrupo Triple Negativa B (TNB) / Basal B. Tanto MDA.MB231 como MDA.MB468 proceden de adenocarcinomas (19). La línea transmitocondrial 613 se emplea como control al poseer mitocondrias sanas y fue generada por fusión de 143B (osteosarcoma sin mtDNA, (16)) con plaquetas de un donante sano de haplogrupo H.

#### **4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO**

Para el cultivo celular se he empleado medio DMEM (Gibco) con D-Glucosa (4,5 g/l), L-Glutamina y piruvato, que se ha suplementado con SFB al 10 % y 1 % de una mezcla de antibióticos compuesta por 10000 U/ml de penicilina G sódica y 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina (Invitrogen).

#### **4.1.3 CULTIVO CELULAR**

Todo el trabajo de las líneas celulares se realiza en una campana de flujo laminar esterilizada con una solución de etanol 70 % y material estéril. Tanto antes como después de cada sesión de trabajo se emplea la luz UV. Además, se emplea un baño de agua termostático ("*JP Selecta<sup>TM</sup> Precistern*") a 37 °C para precalentar todos los compuestos que posteriormente van a entrar en contacto con las células.

Las células de todas las líneas celulares empleadas se siembran en placas Petri estériles de 40, 100 o 150 mm de diámetro (TPP), a una densidad de  $10^4$ - $10^5$  células/ml. Las placas de cultivo se mantienen en una estufa a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renueva de forma periódica cada 48 horas. Además, antes de alcanzar la confluencia celular, se dividen las células

en placas nuevas. Para ello, empleando una pipeta Pasteur se elimina el medio por succión, y se añade a la placa PBS pH 7,4 (Gibco) con la finalidad de debilitar la adherencia de las células ya que se elimina el suero del medio que contiene inhibidor de tripsina. Posteriormente, se succiona el PBS y se añade una mezcla de 0,05 % de tripsina y 0,02 % de EDTA a 0,033 ml/cm<sup>2</sup> preparada en PBS y esterilizada por filtración (0.22 µm). Después se incuba en la estufa 5 minutos aproximadamente. Una vez que las células se han despegado, se añade medio de cultivo y se vuelven a sembrar a la densidad de interés.

#### 4.1.4 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Para la congelación, se despegan las células con tripsina, se centrifuga, y el pellet obtenido se resuspende en 450 µl de medio de cultivo. Justo a continuación, estos se traspasan a un tubo criogénico al que se le añaden 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) que actúa como crioprotector. El tubo se almacena en un contenedor de isopropanol, lo que permite que la congelación se produzca progresivamente (-1 °C / min) en un congelador a -80 °C.

Para la descongelación de las líneas, se extrae el criotubo del congelador y se mantiene unos minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspenden las células en una pequeña cantidad de medio y se siembran sobre una placa de cultivo de 100 mm de diámetro.

#### 4.1.5 RECuento CELULAR

Con la finalidad de determinar la densidad celular, se toma una alícuota de 50 µl de la línea celular de interés y se le añaden 50 µl de colorante Azul Trypan 0.4 % en NaCl 0.9 %. El conteo se realiza empleando una cámara de Neubauer, sobre la que se depositan 10 µl de la solución con las células. Para calcular la densidad celular se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nº de células viables} \cdot \text{dilución} \cdot 10^4}{\text{nº cuadrantes}} = \text{nº células / ml}$$

#### 4.2 ELABORACIÓN DE GELES DE AGAROSA Y ELECTROFORESIS

Para la preparación de geles de agarosa se emplea tampón TAE 1X y agarosa de “*UltraPure™ Agarose*” (Invitrogen™). La cantidad de agarosa varía en función de si la concentración final del gel es del 1 % (para verificar el amplificado de las PCRs) o del 2 % (para el ensayo de RFLP) y se añade EB a una concentración de 0,5 µg/ml. Posteriormente se deposita el gel solidificado en una cubeta y se vierte la solución de TAE. Para la carga de las muestras se añaden 10 µl de DNA y 1 µl de “*BlueJuice™ 10X*”, y para el marcador de pesos moleculares se añaden 4 µl de “*Low DNA Mass Ladder*” (Invitrogen™) y 1 µl de “*BlueJuice™ 10X*” (Invitrogen™). El sistema se conecta a la fuente de alimentación para electroforesis “*PowerPacBasic™*” (Bio-Rad) a 75 V durante 20-30 minutos. Finalmente, se visualiza el gel en “*GelDoc2000*” (Bio-Rad).

#### 4.3 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

##### 4.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Para realizar la extracción de DNA genómico de células de cultivo se emplea el kit comercial “*QIAamp® DNA Mini Kit*” (Qiagen), siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial. Finalizado este proceso, se emplea “*NanoVue*” para cuantificar y determinar la pureza de la muestra.

##### 4.3.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Para purificar fragmentos de PCR desde geles de agarosa se empleó el kit comercial “*NZYGelpure*”, siguiendo las instrucciones del fabricante NYZTech.

## 4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### 4.4.1 PCR

Se llevaron a cabo 9 PCR con la finalidad de amplificar el genoma mitocondrial de la línea MDA.MB468. Los 18 cebadores directos y reversos empleados y el programa del termociclador se detallan en los anexos IA y IC, respectivamente. Se emplea “*T300 Thermocycler*” (Biometra).

Tabla 1. Contenido de cada reacción de PCR para un volumen total de 50 µl.

	Volumen (µl)	Concentración final
Buffer 10X	5	1X
dNTPs	1 (10 µM)	0.2 mM
Taq Polimerasa	0.3	5 U / µl
DNA	variable	0.01 ng / µl
H <sub>2</sub> O	variable	-
Oligonucleótido directo	2	0.25 µM
Oligonucleótido reverso	2	0.25 µM

### 4.4.2 PCR EN TIEMPO REAL

Para llevar a cabo la PCR en tiempo real se emplea el kit comercial “*LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green*” y el sistema capilar “*LightCycler<sup>R</sup> 2.0 System*”, ambos de Roche.

Cada capilar, con un volumen final 10 µl, contiene: 2 µl de “*Master Mix*”, 6,25 µl de H<sub>2</sub>O “*PCR grade*”, 0,25 µl de “*Primer Mix*” y 1,5 µl de DNA a una concentración de 5 ng/µl. Para los controles negativos, en vez de 1,5 µl de DNA, se emplea la misma cantidad de agua. El “*Primer Mix*” es una mezcla en proporción 1:1 de los dos oligonucleótidos mitocondriales o nucleares, en cada caso, para una concentración final 5 mM cada uno. Las secuencias de los oligonucleótidos y el programa de la qPCR están detalladas en el anexo ID.

La PCR a tiempo real se realiza para cuantificar el número de copias de mtDNA con respecto al número de copias del DNA nuclear, amplificando el gen hDloop en el caso del DNA mitocondrial y β-globina para el DNA nuclear. Con esto se obtiene el Ct (“*threshold cycle*” o umbral de ciclo) que es la intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral, e indica el punto en el que se detecta la fluorescencia del producto de la qPCR por primera vez.

Para el cálculo del número de copias se aplica la siguiente fórmula, teniendo en cuenta que ΔCt se calcula como la diferencia entre el Ct nuclear y el Ct mitocondrial.

$$\text{Número de copias: } \frac{mtDNA}{nDNA} = 2^{\Delta Ct}$$

## 4.5 GENERACIÓN DE CÍBRIDOS

Los cíbridos son híbridos citoplasmáticos transmitocondriales, generados a partir de la fusión de citoplastos y células sin mtDNA (que en este caso son células ρ<sup>o</sup>). El objetivo principal de su obtención es desvincular la influencia del genoma mitocondrial de su fondo genético nuclear. De este modo, a partir de varias líneas de cíbridos que poseen el mismo fondo genético nuclear se pueden asociar las diferencias experimentales a la presencia de diferentes DNAs mitocondriales (21).

### 4.5.1 GENERACIÓN DE LÍNEAS CARENTES DE DNA MITOCONDRIAL (ρ<sup>o</sup>)

Para la generación de líneas ρ<sup>o</sup>, se suplementa el medio de cultivo descrito en el apartado 4.1.2 con uridina 50 µg/ml y bromuro de etidio y se renueva periódicamente cada 48 horas. Se han probado varias concentraciones de EB (50 ng/µl y 500 ng/µl) durante distintos periodos de tiempo (mínimo 22 días) en diferentes líneas celulares: MDA.MB231, MDA.MB468 y MCF-7.

#### 4.5.2 ENUCLEACIÓN

Para la generación de cíbridos se prepara medio de enucleación, que contiene 30 ml de DMEM, 2 ml de SFB y 320 µl de citocalasina B (1mg/ml en EtOH). Primero se añade a cada placa de 40 mm de diámetro 1 ml del medio de enucleación y se mantiene 1 h a 37 °C (preincubación). Pasado este tiempo, se colocan las placas boca abajo en los tubos de centrífuga (“Gyrozen 2236R”), que ya contienen el medio de enucleación y se centrifuga 20 minutos a 30 °C y 6500 rpm para que los núcleos queden en el medio. Finalizada la centrifugación, se recuperan las placas.

#### 4.5.3 FUSIÓN

Posteriormente, se tripsinizan los citoplastos y centrifugan 5 min a 1500 rpm. Sobre el pellet obtenido para cada línea celular se añaden aproximadamente 10<sup>6</sup> células ρ<sup>o</sup> en 2 ml de medio, y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 min. Después, se añaden 100 µl de PEG 42 % y se resuspende durante 30 s y 30 s más tarde se añade medio ρ<sup>o</sup> y se siembra en placa de 100 mm de diámetro.

#### 4.5.4 SELECCIÓN

Las células resultantes de las diferentes fusiones se mantienen en un medio carente de uridina durante un periodo mínimo de 3 semanas renovando el medio de cultivo cada 48 h, y pasado este tiempo se trabaja con la población resultante que ha sobrevivido a dichas condiciones, denominando a las líneas resultantes 231mt231, 231mt468, 231mtMCF-7 y 231mt613.

#### 4.6 SECUENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MDA.MB468

Para secuenciar las 7 subunidades del CI y las 3 subunidades del CIV se llevan a cabo varias PCR detalladas en el apartado 4.4.1 con los cebadores especificados en el anexo IA. La secuenciación la lleva a cabo la empresa Secugen. Los cromatogramas resultantes se alinean con la secuencia de referencia del genoma mitocondrial completo (NCBI Reference Sequence: NC\_012920.1).

##### 4.6.1 ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN m.4794G>A EN EL MTDNA MEDIANTE RFLP

Mediante el análisis de la secuenciación de la línea MDA.MB468 se determina la mutación m.4794G>A en el cromatograma. Para verificar la mutación se recurre a el sistema RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”). Para ello, se introduce en el primer directo un “*mismatch*” en la posición 4791T por A, de modo que se genera un nuevo sitio de corte para la enzima de restricción Mse I cuando la mutación está presente. Por su parte, el primer reverso es totalmente complementario a la secuencia de la hebra codificante.

De este modo, se amplifican con los oligonucleótidos indicados los DNAs de las líneas celulares MDA.MB231, MDA.MB468, MCF-7 y 613 y se verifican las amplificaciones por electroforesis. Tras ello, se lleva a cabo una reacción de digestión para cada línea celular con Mse I a 37 °C durante 1-2 h empleando “*Eppendorf ThermoMixer<sup>TM</sup> C*” y se separan los fragmentos digeridos resultantes en un gel de agarosa del 2 %. Por consiguiente se obtiene un patrón de bandas diferente en función de si está presente la mutación (Tabla 2) o si no lo está (Tabla 3).

**Tabla 2: Patrón de bandas y longitud de cada fragmento tras digerir con Mse I la muestra con la mutación m.4794G>A.**

Mutante m.4794G>A		
Fragmento	Coordinadas	Longitud de cada fragmento (bp)
1	1-5	5
2	6-41	36
3	42-227	186
4	228-280	53

**Tabla 3: Patrón de bandas y longitud de cada fragmento tras digerir con Mse I la muestra sin la mutación m.4794G>A.**

Sin mutación m.4794G>A (“ <i>Wild type</i> ”)		
Fragmento	Coordinadas	Longitud de cada fragmento (bp)
1	1-5	5
2	6-227	222
3	228-280	53

#### 4.7 MEDIDA DE RESPIRACIÓN CELULAR

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial de las líneas 231mt231, 231mt468 y 231mt613 se mide su consumo de oxígeno empleando un electrodo de Clark termostatzado (“*Oxytherm*”, Hansatech Instrument) y los datos obtenidos se registran en el programa informático “*Oxygraph Plus V1.00*”.

Para llevar esto a cabo, se siembra una placa de cultivo de 150 mm de diámetro para cada medida a realizar. Posteriormente, se tripsinizan, se recogen, se centrifugan y se hace un conteo celular. Tras ello, se resuspenden en 1 ml de medio y se introducen las células en el electrodo para determinar su tasa de respiración endógena cuando la respiración está acoplada a la síntesis de ATP. Pasados 2 o 3 minutos, se añaden 10 µl de una solución de 2,4-dinitrofenol (DNP) 6.5 mM, un compuesto químico desacoplante que desconecta la síntesis de ATP y la transferencia de electrones, permitiendo que continúe la respiración sin síntesis de ATP y detectando de este modo la respiración máxima. De nuevo, 2 o 3 minutos después se adicionan 10 µl de KCN 400 mM ya que el cianuro (CN<sup>-</sup>) bloquea la transferencia de electrones entre el complejo IV (citocromo oxidasa) y el oxígeno, y así inhibe la síntesis de ATP y la respiración (22).

#### 4.8 MEDIDA DE LA CITOTOXICIDAD DE METFORMINA Y DICLOROACETATO

Para determinar la toxicidad de los fármacos metformina y dicloroacetato (DCA) sobre las líneas celulares transmitocondriales 231mt231, 231mt468 y 231mt613 se emplea el método de Mosmann. Este método permite medir la actividad metabólica celular como un indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celulares. Es un ensayo colorimétrico que se basa en la reducción por parte de las células viables de una sal de tetrazolio MTT ((Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)) amarilla a cristales de formazán insolubles de color morado (23). De este modo, la cantidad de cristales formados correlaciona con la viabilidad celular, permitiendo detectar inhibición del crecimiento o muerte como respuesta a un fármaco. En este caso se prueban los fármacos metformina (5 mM, 10 mM y 20 mM) y dicloroacetato (5 mM, 15 mM y 25 mM) por triplicado técnico. La metformina inhibe de forma reversible el complejo I mitocondrial y el DCA tiene como diana el complejo piruvato deshidrogenasa. Para ello se siembran las células en placas de 96 pocillos de fondo plano, a una densidad de  $2 \cdot 10^3$  células / pocillo y un volumen final de 200 µl por pocillo. Una vez adheridas las células al fondo del pocillo se añaden ambos fármacos a diferentes concentraciones y por triplicado según corresponda y pasadas 48 h se renueva el medio de cultivo con el fármaco. Finalizadas las 72 h se añade a cada pocillo 50 µl de una disolución de MTT (5 mg/ml). Tras ello se incuba la placa a 37 °C durante 4 h, se elimina el sobrenadante de los pocillos y se resuspenden los cristales de formazán formados mediante la adición de 200 µl de DMSO por pocillo. Para determinar la cantidad de cristales se mide la absorbancia a nm en un lector de placas (“*Biochrom EZ Reader 400 Microplate Reader*”, Fisher Scientific).

#### 4.9 PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS PARA ENSAYOS DE ELECTROFORESIS NATIVA

Se cultivan las líneas 231mt231, 231mt468 y 231mt613 tratadas con DCA 25 mM durante 72 h y sin tratar. Posteriormente se tripsinizan, se lavan por centrifugación 2 veces con PBS y se congela a -80 °C el pellet obtenido para facilitar la posterior ruptura de las células. Se descongelan los pellets, se resuspenden en 7 veces el volumen del pellet celular de tampón hipotónico (sacarosa 83 mM y MOPS 10 mM a un pH de 7.2) y se incuban durante 2 minutos en hielo. Tras ello se homogeneizan mediante 8-10 “*pops*” empleando un homogeneizador y se añade el mismo



volumen de tampón hipertónico (250 mM sacarosa, 30 mM MOPS, pH 7,2) que el añadido de tampón hipotónico. Se centrifuga a 1000xg a 4 °C durante 5 minutos para eliminar los núcleos y células no lisadas. Seguidamente se recoge el sobrenadante, se reparte en tubos eppendorf y se centrifuga a 13000 rpm durante 2 minutos a 4 °C para la sedimentación de las mitocondrias. Los pellets resultantes se lavan por centrifugación con medio MAITE (Sacarosa 25 mM; Sorbitol 75 mM; KCl 100 mM; EDTA-Na 0.05 mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM; Tris-HCl 10 mM pH 7.4 y Fosfato Potásico 10 mM, pH 7.4), y se juntan todas las mitocondrias de tipo de muestra en un único tubo. A continuación, se resuspende en un volumen variable de 10 µl a 40 µl de “*Buffer C*” (50 mM NaCl, 50 mM imidazol/HCl, 2 mM ácido 6-aminohexanoico, 1 mM EDTA, pH 7.0) dependiendo del tamaño del pellet. Asimismo, se añaden 0,4 mg de digitonina (detergente)/ml de suspensión mitocondrial, se mezcla bien y se incuba en hielo 5 minutos. Finalmente se centrifuga a 13000 rpm durante 22 minutos, se recoge el sobrenadante y se le añade 1/3 del volumen final del tampón de carga “*Blue G*” al 5 %.

#### 4.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BLUE NATIVE

Se emplean geles comerciales “*NativePAGE™*” Bis-Tris de Invitrogen con un gradiente del 3 al 12 % de poliacrilamida para separar los complejos respiratorios del sistema OXPHOS. Primero se monta el gel en un soporte adecuado y se añaden los tampones para el cátodo A (50 mM tricina, 15 mM Bis-Tris pH 7.0 (4 °C), 0.02 % “*Coomassie brilliant blue G-250*”) y del ánodo (50 mM Bis-Tris, pH 7.0) en cámara fría. A continuación, se cargan 15 µl de cada muestra y se inicia la electroforesis con un voltaje constante de 80 V durante 30 minutos. Pasado este tiempo se aumenta el voltaje a 160 V durante 2 h 15 min. Cuando las muestras avanzan 5-7 centímetros en el gel, se cambia el tampón del cátodo A por el del cátodo B (50 mM tricina, 15 mM Bis-Tris pH 7.0, 0.002 % “*Coomassie brilliant blue G-250*”), con una menor concentración de colorante (24,25).

#### 4.11 ENSAYO DE ACTIVIDAD EN GEL (IGA)

Con la finalidad de evaluar la actividad NADH Deshidrogenasa del complejo I, finalizada la electroforesis del apartado 4.10 se sumerge el gel en una solución que contiene los sustratos (5 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.1 mg/ml NADH; 2.5 mg/ml NBT) y se incuba a temperatura ambiente en oscuridad hasta que aparecen bandas de precipitado.

#### 4.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para analizar estadísticamente los datos resultantes de los ensayos se ha empleado el programa “*GraphPad*”. Para ello se emplea el test ANOVA de comparación múltiple para encontrar diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0.05$ ). El análisis estadístico completo aparece detallado en el anexo II.

#### 4.13 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Los cromatogramas resultantes de la secuenciación se visualizan empleando “*BioEdit Sequence Alignment Editor*” y se alinean con la secuencia de referencia del genoma mitocondrial completo (NCBI Reference Sequence: NC\_012920.1) empleando la herramienta “*Nucleotide BLAST*” (26).

Por su parte, el diseño del ensayo de RFLP se ha lleva a cabo con la ayuda de la herramienta “*NebCutter 3.0*”, que permite predecir los patrones de corte de las enzimas de restricción (27).

En lo que respecta al estudio de las mutaciones se emplean ficheros PDB (28) a partir de los que se realiza el modelado empleando “*PyMol*”. Para la predicción del impacto de mutaciones se emplea “*AlphaMissense*”, que es una adaptación de “*AlphaFold*” que a partir de bases de datos de frecuencias de variantes de poblaciones predice la patogenicidad de mutaciones que implican

la sustitución de un aminoácido (29). Asimismo, para la traducción de la secuencia mutada se utiliza “EMBOSS Transeq” (30) y para la predicción estructural de la proteína mutada se hace uso de “Swiss Model” (31) que a su vez emplea como molde un modelo generado por “AlphaFold” (32).

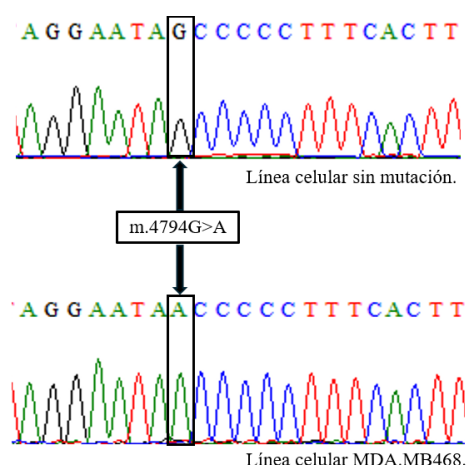
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 SECUENCIACIÓN DE LA LÍNEA MDA.MB468

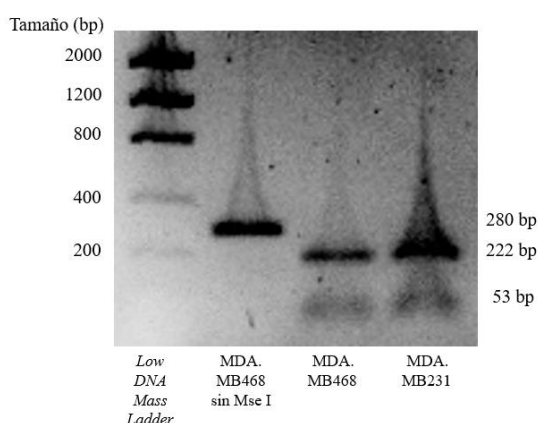
#### 5.1.1 MUTACIÓN m.4794G>A E IMPACTO SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS

Muchas líneas tumorales se caracterizan por presentar mutaciones en su mtDNA y tanto la línea celular MDA.MB231 como MCF-7 tienen su secuencia publicada (33). Sin embargo, no se ha publicado la secuencia del mtDNA de la línea MDA.MB468. Por ello se han secuenciado 25 genes del DNA mitocondrial detallados en el anexo IA, entre los que se encuentran las 7 subunidades ND del complejo I y las 3 subunidades del complejo IV, debido a que estas acumulan la mayoría de las mutaciones con relevancia en cáncer. Por otra parte, la información sobre la estructura y organización de los complejos del sistema OXPHOS puede ayudar a la comprensión de las alteraciones en su función y facilitar el desarrollo de terapias para el tratamiento de enfermedades humanas en las que se produce una disfunción de este sistema (9).

Como resultado de la secuenciación, se identificó la mutación m.4794G>A o p.A109T, correspondiente al gen MTND2 / ND2, que codifica para la subunidad 2 del complejo I mitocondrial (Figura 3). Esta mutación ya había sido descrita en heteroplasmia para la línea MDA.MB231 (33). Para verificar dicha mutación se recurre al sistema RFLP detallado en 4.6.1. En la figura 4 se muestra el patrón de bandas obtenido, donde MDA.MB468 sin Mse I se emplea como muestra control en la que se obtiene una única banda a 280 pb, correspondiente al producto de PCR sin digerir. Por su parte, en las muestras de las líneas celulares MDA.MB468 y MDA.MB231 digeridas con Mse I se determina la presencia de la mutación m.4794G>A debido a que se observa una banda de 222 bp y otra de 53 bp. Asimismo, se ha verificado que las líneas MCF-7 y 613 no portan dicha mutación en su genoma mitocondrial.



**Figura 3: Comparación de los cromatogramas de las secuencias obtenidas por secuenciación.** La secuencia de línea celular sin mutación está en la parte superior y la secuencia de la línea MDA.MB468 en la parte inferior. Recuadrada la posición 4794.



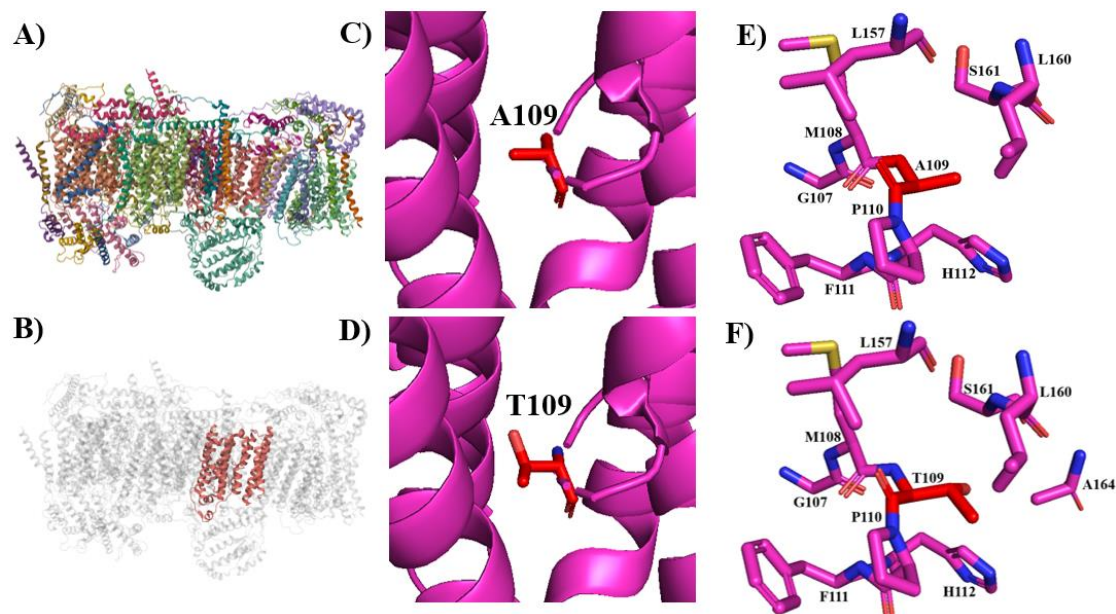
**Figura 4: Gel de agarosa 2% visualizado en “GelDoc2000” (Bio-Rad).** En el eje vertical izquierdo se indican los tamaños de los fragmentos del marcador de pesos moleculares del primer carril y en el eje vertical derecho los tamaños de las bandas obtenidas tras la amplificación y digestión con Mse I de cada una de las líneas celulares indicadas en el eje horizontal.

En humanos, la disfunción de CI genera especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así como perjudica la fosforilación oxidativa, reduce el potencial de membrana y la síntesis de ATP y altera el ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Estos defectos en conjunto alteran una gran variedad de procesos metabólicos implicados en multitud de enfermedades humanas (9).

El complejo I se produce la oxidación del NADH por una molécula de FMN y se liberan 2 electrones que entran en una cadena de varios clusters FeS hasta alcanzar la ubiquinona, que es el aceptor final que se reduce y se desplaza hasta el complejo III. La transferencia de cada par de electrones se acopla al bombeo de 4 protones al espacio intermembrana. Asimismo, el FMN reducido reacciona con oxígeno molecular y genera especies reactivas de oxígeno (34,35).

Estudios previos han demostrado que el CI es la proteína más compleja de la mitocondria y se divide en una región de membrana y otra de matriz. Por su parte, el brazo de la matriz está constituido por 7 subunidades centrales hidrofílicas conservadas que constituyen el dominio rédox, 8 clusters FeS y una molécula de FMN y todos ellos están rodeados por 10 complejos supernumerarios. A nivel funcional se distinguen los módulos  $M_D$  y  $M_P$  entre los que se reparten todas las subunidades mencionadas y recogidas en anexo III (36). Por su parte, la región de membrana tiene 7 subunidades centrales hidrofóbicas o subunidades ND, 21 complejos supernumerarios y 18 moléculas de fosfolípidos que participan en las interacciones proteína-proteína y le confieren flexibilidad a la región de membrana para participar en la traslocación de los protones. La región de membrana puede dividirse en un módulo de bombeo de protones proximal ( $P_P$ ) que contiene las subunidades centrales ND1, ND2, ND3, ND4L, ND5 y ND6 y un módulo de bombeo de protones distal ( $P_D$ ) que engloba las subunidades ND4 y ND5 (9,37). En eucariotas las subunidades centrales hidrofóbicas están codificadas en el genoma mitocondrial, mientras que las hidrofílicas están codificadas por el DNA nuclear (38). Las subunidades supernumerarias estabilizan el complejo (38) y su distribución se detalla en el anexo III.

En cuanto al posible impacto de la mutación m.4794G>A sobre la organización del sistema OXPHOS, la subunidad ND2 del complejo I se localiza en el módulo proximal de bombeo de protones en la región de membrana. En la mutación descrita se sustituye la alanina, que es un aminoácido alifático no polar, por una treonina que posee una cadena alifática hidroxilada y su tamaño es ligeramente mayor que la alanina. Para evaluar la mutación se parte del fichero PDB 5xtc, que procede del artículo que publica la estructura con mayor resolución descrita hasta la fecha de los supercomplejos respiratorios humanos (9). Se modela la mutación a partir del modelo de PDB 5xtc (9), que corresponde a la estructura de todo el complejo I (Figura 5A) determinada por criomicroscopía electrónica. Partiendo de 5xtc, se trabaja únicamente con la cadena i que corresponde a ND2 (Figura 5B) y se construye el modelo que porta la mutación p.A109T (Figuras 5D y 5F), que se puede comparar con la estructura no mutada (Figuras 5C y 5E). Se analiza el impacto en la estructura evaluando los contactos de T109 con su entorno y no se encuentra ningún cambio significativo con respecto a los contactos de A109, simplemente varía ligeramente la distribución espacial debido a que, en presencia de la mutación, T109 queda a menos de 4 Å de A164, y en ND2 original A109 y A164 están más alejadas. A partir del modelado en “PyMol” no se detectan nuevas interacciones en presencia de la mutación, por lo que se espera que su impacto sobre la organización de la subunidad ND2 sea poco significativo. Para verificar esta predicción, se consulta además “AlphaMissense”, que pronostica que la mutación es ambigua. Finalmente se concluye que el resultado obtenido modelando con “PyMol” y predicción de “AlphaMissense” sobre el impacto en la organización del sistema OXPHOS concuerdan, y se espera que el efecto de la mutación no tenga consecuencias significativas sobre el funcionamiento de la fosforilación oxidativa.

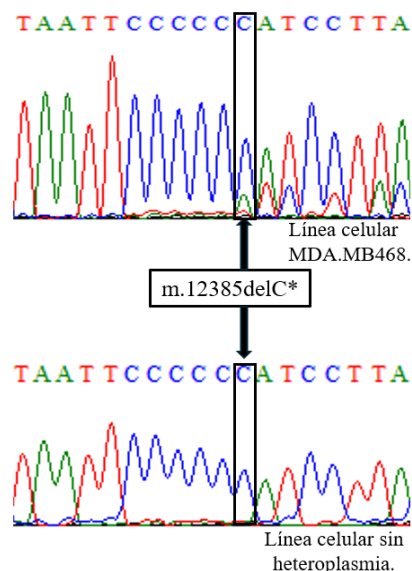


**Figura 5: Modelado de la mutación m.4794G>A o p.A109T.** A) Estructura del complejo I completo (PDB 5xtc). B) ND2 original de color marrón (PDB: 5xtc, cadena i). C y D) A109 (Fig.C) y T109 (Fig.D) en rojo y representados como “stick”. El resto de la proteína en morado y representado como “cartoon”. E y F) A109 (Fig.E) y T109 (Fig.F) en rojo y residuos localizados a menos de 4 Å en morado.

Aunque se ha descrito que las líneas MDA.MB231 y MDA.MB468 poseen la mutación m.4794G>A y son ambas TNBC al exhibir mayor agresividad y un peor pronóstico, sus características tumorales probablemente no estén influidas por la mutación m.4794G>A debido a que se pronostica que su impacto sea mínimo.

### 5.1.2 HETEROPLASMA m.12385delC\* E IMPACTO SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS

A partir de la secuenciación de la línea MDA.MB468 se puede determinar la existencia de una mutación en heteroplasmia en la posición 12385 (m.12385delC\*). La región 12385-13390 es una región constituida por Poli C, lo que implica que algunas copias de mtDNA han sufrido una deleción en una de las C, mientras que otras la conservan, lo que alterará el marco de lectura. Esto se pudo determinar a partir del cromatograma mostrado en la figura 6.

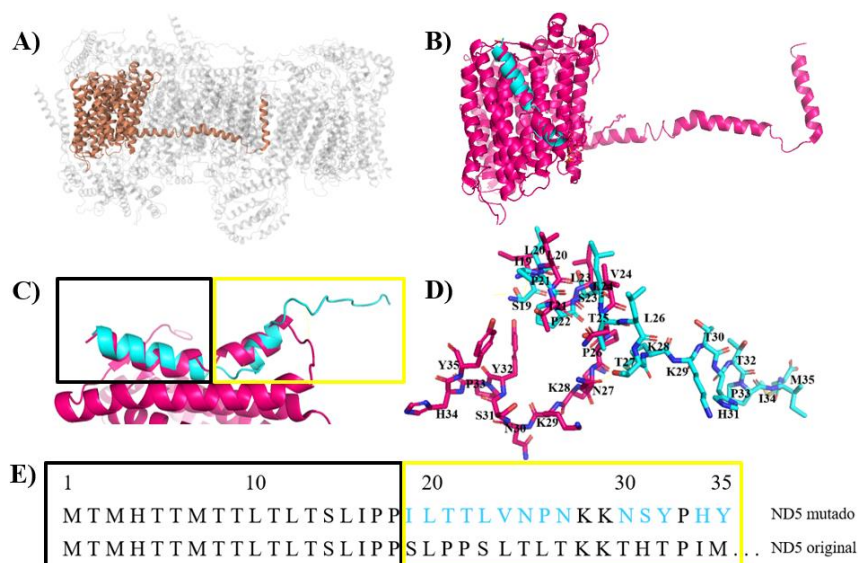


**Figura 6: Comparación de los cromatogramas de las secuencias obtenidas por secuenciación.** La secuencia de la línea celular MDA.MB468 con heteroplasmia m.12385delC\* en parte superior y la secuencia de la línea celular sin heteroplasmia en la parte inferior.

El posible impacto de la heteroplasmia sobre la organización del sistema OXPHOS se estudia generando un modelo con la deleción de la C en la posición 12385. Primero, la secuencia mutada se traduce empleando “EMBOSS Transeq”, y a partir de esta se genera un modelo de la proteína mediante el recurso “Swiss Model” que emplea como molde para el modelado una forma truncada de MT-ND5 (A0A096W714.1.A), obtenido a partir de un modelo de “AlphaFold”. A partir de la

cadena I que corresponde a ND5 del fichero PDB 5xtc (Figura 7A) se alinea dicho modelo de la proteína truncada para compararlos (Figura 7B). La mutación afecta significativamente a la estructura de ND5, ya que produce una forma truncada de 35 aminoácidos y la subunidad ND5 original posee 603 aminoácidos. Además, los 35 residuos que tiene ND5 truncada no coinciden en su totalidad con los de la subunidad original debido a que la delección produce un cambio en el marco de lectura. De estos 35 residuos, los 18 primeros son iguales a los originales (Figuras 7C y 7E), y entre los residuos 19-35 solamente 3 residuos son idénticos a la subunidad ND5 “*wild type*”, por lo que se aprecian modificaciones en la secuencia que se traducen en cambios estructurales (Figura 7D). En la figura 7B se muestra una gran diferencia estructural entre ND5 original y ND5 m.12385delC\*, debido a que ND5 mutada carece de más del 96 % de los residuos presentes en ND5 “*wild type*”. Se concluye que el impacto de la mutación m.12385delC\* sobre la estructura es significativo y podría tener consecuencias a nivel funcional en el sistema OXPHOS.

Esta región 12385 de poli C fue estudiada como candidata a propiciar inestabilidad genómica mitocondrial en células de leucemia mieloide aguda, junto con otras regiones del mtDNA constituidas por repeticiones. Concluyeron que había alteraciones profundas en algunas de ellas, pero sobre 12385 poli C no se menciona que estas existan (39). Por otro lado, posteriormente otro grupo describió la existencia de una inserción de una C en la región 12385-12390 en un tumor renal (40). Con la información actual tras la caracterización de m.12385delC\* se puede concluir que la región 12385-12390 contribuye con la inestabilidad genómica en algunos tipos de cáncer. De las líneas tumorales de estudio, esta mutación solo ha sido determinada para MDA.MB468 y puede existir una correlación entre su agresividad en el proceso tumoral y m.12385delC\*.



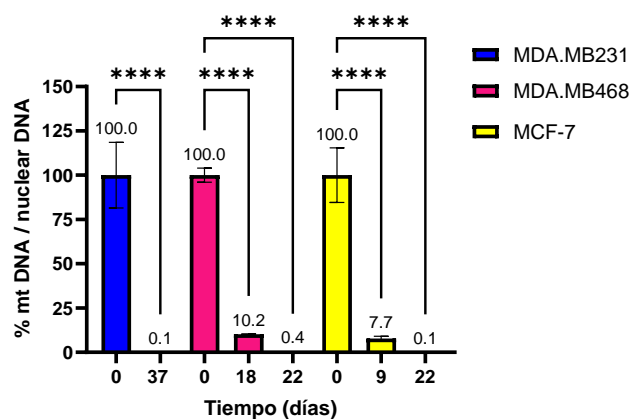
**Figura 7: Modelado de m.12385delC\*.** A) Estructura del complejo I con ND5 de color marrón (PDB 5xtc). B) ND5 original coloreado en rosa (PDB: 5xtc, cadena I) y predicción de ND5 m.12385delC\* en azul, ambas alineadas. C) Ampliación de la figura B. Recuadrados por el código de colores de la figura E. D) Modelado de los residuos 19-35 de ND5 original y ND5 mutado. E) Comparación de la secuencia de ND5 original y ND5 m.12385delC\*. Recuadrados en negro los aminoácidos 1-18 comunes a ambas proteínas y en amarillo los aminoácidos 19-35.

## 5.2 GENERACIÓN DE LÍNEAS $\rho^0$

Para determinar el papel de las mitocondrias en los procesos de tumorigénesis y metástasis entre líneas celulares se requiere un modelo en el que todas tengan el mismo entorno nuclear, por lo que es necesario disponer de líneas celulares carentes de mtDNA a las que transferir las distintas variantes mitocondriales a estudiar. Asimismo, para que los resultados experimentales reflejen la

realidad de las líneas celulares estudiadas de la forma más fiel posible se comienza generando líneas  $\rho^0$  de cada una de las líneas tumorales para posteriormente poder generar a partir de estas las líneas transmitocondriales.

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.5.1, se generaron las líneas MDA.MB468  $\rho^0$ , MDA.MB231  $\rho^0$  y MCF-7  $\rho^0$ . Para verificar la eliminación completa del mtDNA se realizó una qPCR para medir el número de copias de mtDNA por célula en cada una de ellas. En el caso de MDA.MB231 tratada con EB 50 ng/ $\mu$ l durante 37 días, mantiene un 0,1 % de mtDNA con respecto a MDA.MB231 sin tratar, empleada como control. Además, MDA.MB468 conserva un 10,2 % de mtDNA con respecto a su control a los 18 días y 0,4 % a los 22 días de tratamiento con EB 500 ng/ $\mu$ l. Por su parte, MCF-7 tratada con EB 500 ng/ $\mu$ l a los 9 días mantiene un 7,7 % de mtDNA con respecto a su control y un 0,1 % a los 22 días. Se concluye por tanto que se han obtenido con éxito las líneas MDA.MB468  $\rho^0$ , MDA.MB231  $\rho^0$  y MCF-7  $\rho^0$ . En todos los casos las diferencias en el número de copias de mtDNA son estadísticamente significativas con respecto al control correspondiente.



**Figura 8: Porcentaje del número de copias de DNA mitocondrial por célula con respecto a su control sin tratar para cada línea celular (MDA.MB231, MDA.MB468 y MCF-7).** Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico completo se recoge en el anexo IIA. Los \* representan diferencias estadísticamente significativas.

Las células MDA.MB231 tratadas durante 37 días a 50 ng/ $\mu$ l, se subclonaron a una densidad de 1 célula por pocillo en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se aislaron 7 clones que no sobrevivían en un medio con galactosa debido a que las células que tienen defectos en el metabolismo oxidativo tienen un crecimiento limitado en medios que contienen galactosa en vez de glucosa. Esto se debe a que las células de mamífero no emplean la galactosa como sustrato glucolítico de forma eficiente, y en los medios que la contienen las células se ven obligadas a depender casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa para la producción de ATP (41).

Por qPCR, se comprobó que estos 7 clones habían perdido el mtDNA debido a que el porcentaje de copias con respecto al control en los 7 casos es 0 % o un valor muy próximo a este (Tabla 4). A pesar de que los clones individuales han reducido al mínimo el mtDNA, se trabaja con la población de células de las que estos proceden para evitar errores derivados de uno o varios clones, que pueden no reflejar el comportamiento de la población MDA.MB468 en su totalidad.

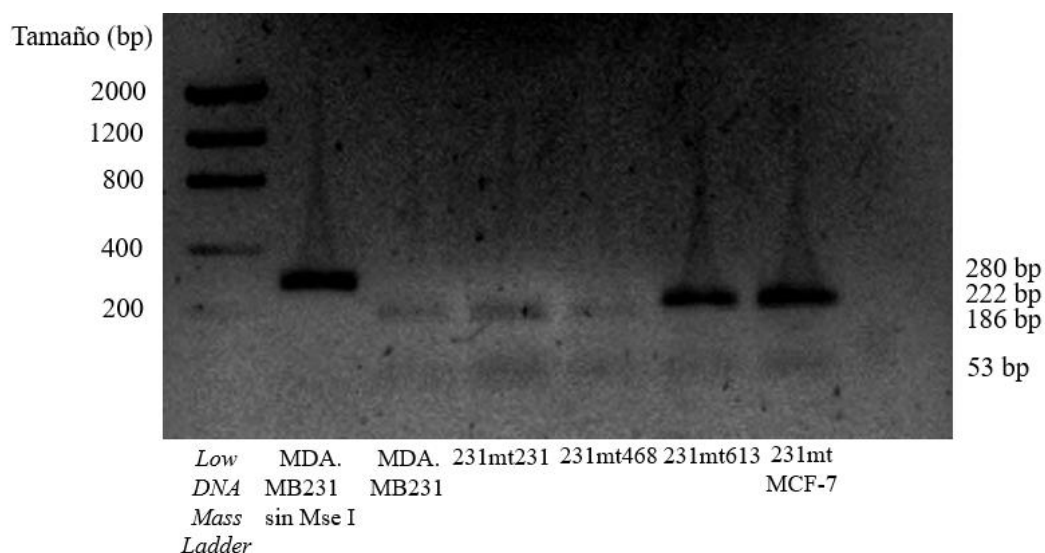
**Tabla 4: Porcentaje de mtDNA que conserva cada uno de los 7 clones aislados (C1-C7) en comparación con el control de MDA.MB 231 sin tratar con bromuro de etidio.**

	MDA.MB231 sin tratar (control)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Porcentaje de copias de mtDNA con respecto al control	100	0,0	0,01	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1



### 5.3 GENERACIÓN DE CÍBRIDOS

Siguiendo el protocolo de la generación de cíbridos desarrollado en 4.5, se generaron y seleccionaron las líneas 231mt231, 231mt468, 231mt613 y 231mtMCF-7. A partir de estas se evalúa la pureza de su mtDNA mediante RFLP antes de analizar la función y organización del sistema OXPHOS. Como se observa en la figura 9, la línea 231mt231 posee el mismo patrón de bandas que MDA.MB231 ya que esta le ha aportado las mitocondrias y su mtDNA porta la mutación m.4794G>A, por lo que aparece una banda de 186 bp y otra de 53 bp. Asimismo, 231mt468 tiene el mismo patrón de bandas que estas debido a que MDA.MB468, que le aporta las mitocondrias, también tiene la mutación m.4794G>A en su mtDNA. Por su parte, 231mt613 y 231mtMCF-7 tienen las mitocondrias de las líneas 613 y MCF-7, respectivamente, y como estas no portan la mutación m.4794G>A, se distingue una banda de 222 bp y otra de 53 bp. Como control del ensayo se emplea MDA.MB231 sin enzima de restricción Mse I, y en este caso se observa una única banda de 280 bp, correspondiente al producto de la PCR sin digerir. De este modo, se concluye que cada una de las líneas cíbridas posee la variante del mtDNA en la posición 4794 correspondiente a la de la línea celular que ha aportado las mitocondrias y que no contienen el mtDNA de la línea MDA.MB231, sino solamente solo su DNA nuclear.



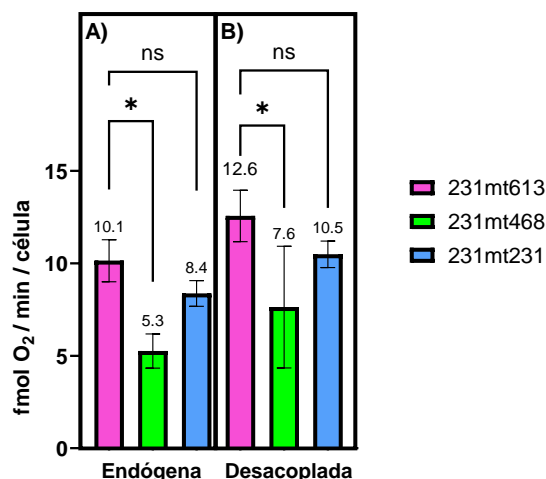
**Figura 9:** Gel de agarosa 2 % en “Gel Doc 2000” (Bio-Rad). En el eje vertical izquierdo se indican los tamaños de los fragmentos del marcador de pesos moleculares (*Low DNA Mass Ladder*) del primer carril y en el eje vertical derecho aparecen los tamaños de las bandas obtenidas tras la amplificación y digestión con Mse I de cada una de las líneas celulares indicadas en el eje horizontal.

### 5.4 RESPIRACIÓN CELULAR

Una vez verificada la pureza del mtDNA de cada una de las líneas transmitocondriales se valora su función OXPHOS. Para ello se evalúa su tasa de respiración endógena y desacoplada.

Como se muestra en la figura 10A, la respiración endógena de la línea 231mt231 es inferior a 231mt613 (control), pero la diferencia no es estadísticamente significativa. Por el contrario, 231mt468 presenta un valor más inferior y estadísticamente significativo con respecto al control. Al desacoplar la respiración de la síntesis de ATP por adición de DNP, se observa un patrón similar en la figura 10B, concluyendo la línea 231mt468 presenta un aumento con respecto a su consumo de oxígeno en la respiración endógena y hay una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. En cambio, 231mt231 también sufre un aumento con respecto a la respiración endógena, pero este valor no es significativo con respecto al control.

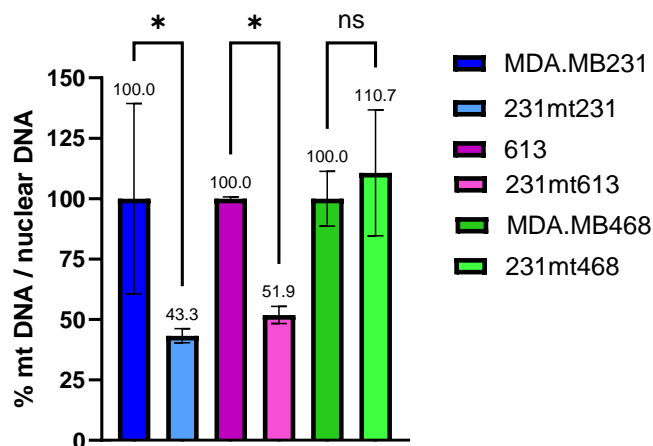
**Figura 10: A) Respiración endógena. B) Respiración desacoplada.** El consumo de oxígeno se expresa como fmol de O<sub>2</sub> por minuto y por célula. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. El \* representa diferencias estadísticamente significativas y “ns” representa diferencias no estadísticamente significativas. Se selecciona 231mt613 como control en ambos casos (A y B). El análisis estadístico se detalla en el anexo IID.



## 5.5 ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DE DNA MITOCONDRIAL.

Una de las características de las células tumorales son las alteraciones en el número de copias de mtDNA ya que se ha determinado que diferentes tipos de tumores difieren con respecto a los valores del tejido sano en cada caso, estando aumentados o disminuidos en comparación con este. Por ello, el número de copias de mtDNA es un marcador de la función mitocondrial (10). Por este motivo, se compara el número de copias de DNA mitocondrial que presenta cada híbrido con respecto a la línea celular que ha aportado las mitocondrias asociando a esta el valor máximo de 100 % en cada caso. Así se puede confirmar que todos los híbridos generados a partir de la fusión de la línea MDA.MB231  $\rho^0$  con las líneas MDA.MB231, MDA.MB468 y 613 han incorporado mitocondrias que tienen DNA mitocondrial detectable por qPCR (Figura 11). Se pueden apreciar diferencias en el número de copias entre los diferentes híbridos, manteniendo 231mt231 un 43,3 % de copias con respecto a su control y 231mt613 un 51,9 % con respecto al suyo. Por el contrario, 231mt468 tiene un 110,7 % con respecto a su control.

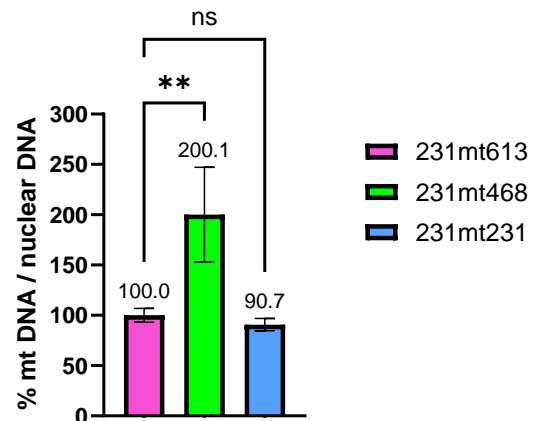
**Figura 11: Porcentaje del número de copias de DNA mitocondrial por híbrido con respecto a la línea celular que ha aportado las mitocondrias en cada caso (MDA.MB231, MDA.MB468 y MCF-7).** Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. El \* representa diferencias estadísticamente significativas y “ns” representa diferencias no estadísticamente significativas. El análisis estadístico se detalla en el anexo IIB.



A su vez se compara el número de copias de cada uno de los híbridos con respecto a 231mt613 ya que las mitocondrias de esta proceden de plaquetas de un donante sano y por ello se establece como control. En este caso se concluye que la línea 231mt468 posee el doble de copias que la línea control siendo esta diferencia estadísticamente significativa, mientras que 231mt231 tiene un 90,7 % con respecto al control y no considerándose significativa la diferencia con respecto a 231mt613 (Figura 12).

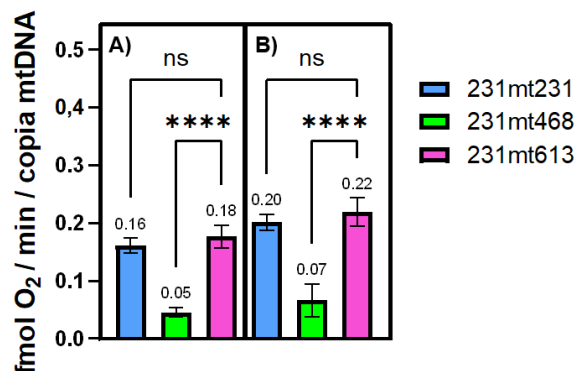


**Figura 12: Porcentaje del número de copias de DNA mitocondrial por híbrido (231mt231 y 231mt468) con respecto a 231mt613.** Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. El \* representa diferencias estadísticamente significativas y “ns” representa diferencias no estadísticamente significativas. El análisis estadístico se detalla en el anexo IIB.



Se normalizan los valores de respiración endógena y desacoplada dividiendo en cada caso entre el número de copias de mtDNA de cada línea celular correspondiente. En la figura 10 se aprecia que 231mt468 es el híbrido con menor consumo de oxígeno en la respiración endógena y desacoplada, y la figura 12 muestra que a su vez es el híbrido con mayor número de copias de mtDNA. Tras normalizar (Figura 13) se manifiestan de forma más evidente las diferencias entre las líneas celulares y se concluye que la línea 231mt468 es la que menor consumo de  $O_2$  por minuto y por copia de mtDNA presenta, siendo estadísticamente significativa la diferencia con respecto a 231mt613 (control). Por su parte, la línea 231mt231 presenta unos valores normalizados muy similares a 231mt613 tanto en la respiración endógena como en la desacoplada.

**Figura 13: A) Respiración endógena. B) Respiración desacoplada.** El consumo de oxígeno se expresa como fmol de  $O_2$  por minuto y por copia de mtDNA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. El \* representa diferencias estadísticamente significativas y “ns” representa diferencias no estadísticamente significativas. Se selecciona 231mt613 como control en ambos casos (A y B). El análisis estadístico se detalla en el anexo IID.



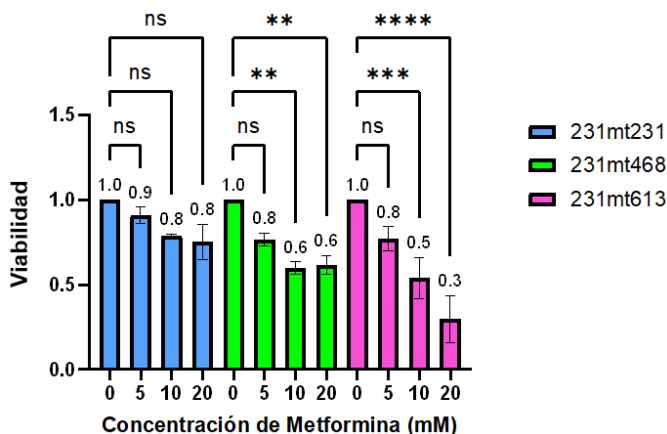
## 5.6 MEDIDA DE CITOTOXICIDAD DE METFORMINA Y DICLOROACETATO

La metformina es un fármaco anti-hiperglucémico que ejerce algunas de sus acciones a través de la modulación de la bioenergética mitocondrial. En concreto, se ha descrito que induce una inhibición débil y reversible, pero específica del complejo I mitocondrial. El mecanismo por el que la metformina entra en la mitocondria e inhibe este complejo aún no se comprende por completo, aunque probablemente esté mediado por la interacción con ND3 de dicho complejo. Como resultado de la inhibición, se reduce la oxidación del NADH, el gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial y el ratio del consumo de oxígeno. Se ha descrito que el efecto de la metformina en células cancerosas habitualmente resulta en una disminución de la función OXPHOS y la producción de ATP, lo que resulta en una activación de vías catabólicas e inhibición de los procesos anabólicos a través de la regulación ejercida por mTORC1. En última instancia esta reprogramación metabólica reduce el crecimiento y la proliferación celular (42).

En la figura 14 no se aprecia que para la línea 231mt231 existan diferencias significativas a nivel estadístico en la viabilidad celular para las diferentes concentraciones de metformina. En el caso de 231mt468 la viabilidad para 5 mM del fármaco desciende un poco con respecto al control sin

tratar, pero las diferencias comienzan a hacerse estadísticamente significativas para las concentraciones de 10 mM y 20 mM, en las que la viabilidad media con respecto al control se reduce al 60 %. Finalmente, en el caso de 231mt613 tampoco hay diferencias relevantes para 5 mM de metformina, pero estas comienzan a hacerse significativas para 10 mM y 20 mM del fármaco, llegando disminuir la viabilidad hasta el 30 %.

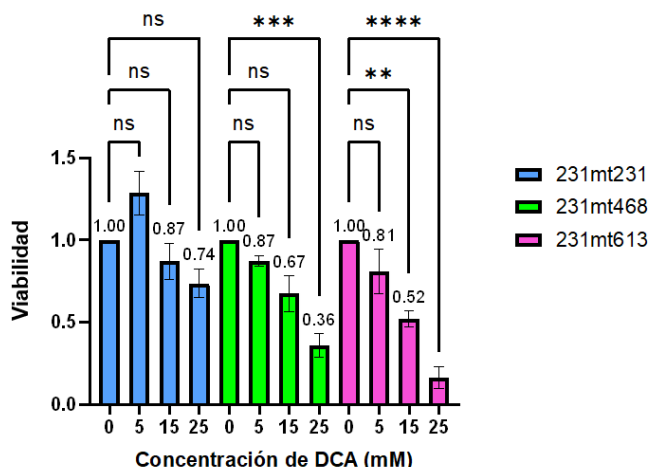
**Figura 14: Viabilidad celular de las líneas 231mt231, 231mt468 y 231mt613, expuestas a diferentes concentraciones de metformina, expresada como fracción con respecto al control sin tratar.** Los datos se representan como media  $\pm$  desviación estándar de la viabilidad celular en ausencia del fármaco. El \* representa diferencias estadísticamente significativas y “ns” representa diferencias no estadísticamente significativas. El análisis estadístico se detalla en el anexo IIC.



El mecanismo de acción del dicloroacetato se basa producir cambios en el metabolismo tumoral que antagonizan el crecimiento tumoral, la metástasis y la supervivencia. Para ello revierte el efecto Warburg, redirigiendo el metabolismo de la glucosa de la glucólisis a la fosforilación oxidativa. Actúa inhibiendo la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), lo que resulta en la activación de la piruvato deshidrogenasa (PDH). De este modo, se favorece el metabolismo del piruvato por la fosforilación oxidativa y se revierte la supresión mitocondrial exhibida por las células cancerosas, promoviendo en última instancia la apoptosis. Además, el DCA suprime la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, dificultando así la generación de nucleótidos para la replicación celular y la estimulación del crecimiento endotelial por parte de las células cancerosas. También se ha descrito que aumenta la sensibilidad a la radioterapia y quimioterapia (43).

En la figura 15 se muestra que para la línea 231mt231 no hay diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad para ninguna de las concentraciones de DCA. Para 231mt468 se aprecia un ligero descenso que no es estadísticamente significativo a concentraciones menores de 25 mM de DCA. Por su parte, 231mt613 también experimenta una disminución de la viabilidad con respecto al control, y esta es significativa a partir de 15 mM, llegando a reducirse su viabilidad al 16 % tras el tratamiento con 25 mM de DCA.

**Figura 15: Viabilidad celular de las líneas 231mt231, 231mt468 y 231mt613, expuestas a diferentes concentraciones de DCA, expresada como fracción con respecto al control sin tratar.** Los datos se representan como media  $\pm$  desviación estándar de la viabilidad celular en ausencia del fármaco. El \* representa diferencias estadísticamente significativas y “ns” representa diferencias no estadísticamente significativas. El análisis estadístico se detalla en el anexo IIC.

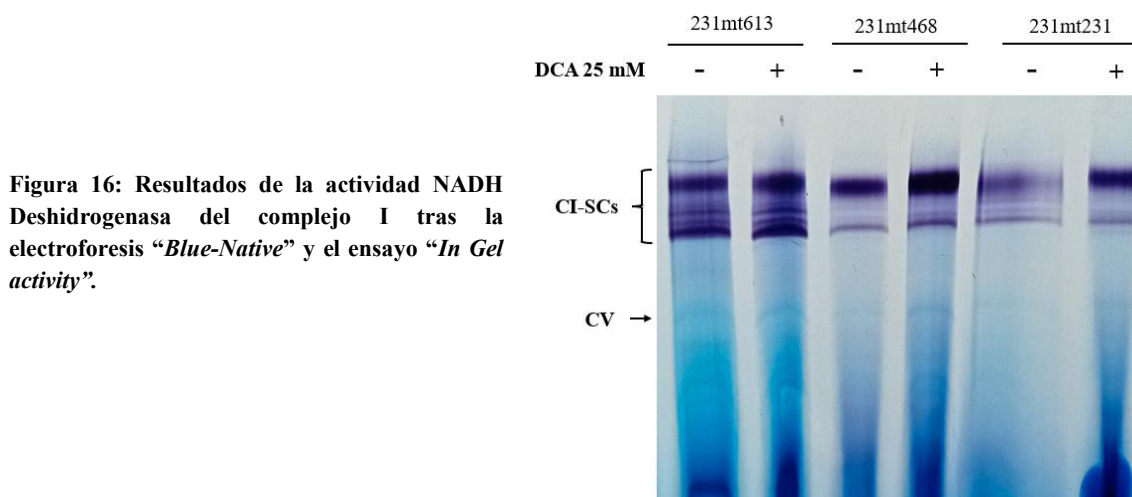


## 5.7 FUNCIONALIDAD Y ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OXPHOS

Se ha evidenciado que los supercomplejos respiratorios pueden contener CI, CIII y CIV en diferentes estequiometrías. El principal supercomplejo es el respirasoma ( $CI_n + CIII_2 + CIV_n$ ) y su nombre hace referencia a que, junto con los transportadores móviles de electrones Q y el citocromo c, puede actuar como una única unidad funcional que transfiere los electrones a través de ETC hasta el oxígeno generando a su vez un gradiente electroquímico en la membrana mitocondrial interna. Asimismo, se han propuesto una serie de ventajas estructurales o funcionales que confieren los supercomplejos al sistema OXPHOS entre las que se encuentran: (i) aumento de la eficiencia del transporte electrónico a través de ETC, (ii) previene la pérdida de electrones y (iii) mantiene la integridad estructural de los complejos individuales (8).

Con la finalidad de estudiar la organización del sistema OXPHOS y las asociaciones existentes entre los complejos respiratorios primero se separan mediante electroforesis nativa “*Blue Native PAGE*”, que es un método que permite el aislamiento de proteínas de membrana enzimáticamente activas (44). En esta se emplea “*azul brillante G Coomassie®*” que aporta carga negativa a las proteínas de membrana y permite una óptima separación de los supercomplejos (24,25). A continuación, se estudia la actividad NADH Deshidrogenasa del complejo I mediante el ensayo de “*In Gel Activity*” (IGA).

En la figura 16 se aprecia en todos los casos el CV, y además, CI formando parte de diferentes supercomplejos. No se detectan grandes cambios entre cada cíbrido tratado con DCA 25 mM y su respectivo control sin fármaco. Aun así, en el caso de 231mt613 y 231mt468 tratadas con DCA se aprecia un ligero aumento en la cantidad de CI-SCs con respecto sus respectivos controles. En el caso de la línea 231mt231 es más difícil concluir si hay diferencias o no por la diferente anchura de las calles y por el hecho de que la muestra tratada con DCA presentaba muy pocas células. En todos los casos sería necesario normalizar la señal de los SCs por algún marcador de carga fiable.



## 6. CONCLUSIONES

- Se determinan dos mutaciones: m.4794G>A y m.12385delC\*. Se predice que la mutación m.4794G>A es neutra y el impacto a nivel estructural de ND2 en la organización y función del sistema OXPHOS no será significativo. Por el contrario, la mutación m.12385delC\* producirá una mayor repercusión en la estructura de ND5 al tratarse de una proteína truncada que carece de más del 96 % de los residuos presentes en ND5 original. Por ello se pronostica que puede afectar negativamente a la funcionalidad del sistema OXPHOS.

- Se verifica que tanto las líneas  $\rho^0$  como los cíbridos se han generado y seleccionado correctamente debido a que todos los híbridos citoplasmáticos transmitocondriales portan el DNA mitocondrial de la línea que les ha aportado las mitocondrias en cada caso. De este modo se acepta que las diferencias experimentales entre ellas se deben al DNA mitocondrial.
- Los cíbridos presentan diferente número de copias de mtDNA y tasas de respiración, estando ambas directamente relacionadas con el proceso de carcinogénesis. Al relacionar ambos parámetros entre sí se concluye que la línea 231mt468 es la que más alterado posee el ratio de consumo de oxígeno por copia de mtDNA.
- Los cíbridos responden de diferente modo a la metformina y DCA, siendo 231mt613 portadora de mitocondrias sanas la que mayor disminución de la viabilidad presenta para ambos fármacos. En cambio, 231mt231 posee las mitocondrias de la línea tumoral más agresiva de todas las estudiadas y es la más resistente a ambos. Además, el tratamiento con DCA parece favorecer la asociación del complejo I formando supercomplejos.
- Estos resultados apoyan la hipótesis de que las células tumorales con diferentes grados de invasividad presentan diversos defectos mitocondriales que afectan a la funcionalidad del sistema OXPHOS favoreciendo el proceso de tumorigénesis.

## 6. CONCLUSIONS

- Two mutations are identified: m.4794G>A and m.12385delC\*. It is predicted that the m.4794G>A mutation is neutral and the structural impact of ND2 on the organisation and function of the OXPHOS system will not be significant. In contrast, the m.12385delC\* mutation will have a more significant impact on the structure of ND5 as it is a truncated protein lacking more than 96% of the residues present in the original ND5. It is therefore predicted to negatively affect the functionality of the OXPHOS system.
- It is verified that both the  $\rho^0$  lines and the cybrids have been generated and selected correctly because all the cytoplasmic transmitochondrial hybrids contain the mitochondrial DNA of the line that provided the mitochondria in each case. Thus, it is accepted that the experimental differences between them are due to mitochondrial DNA.
- The cybrids have different mtDNA copy number and respiration rates, and both are directly related to the carcinogenesis process. Relating both parameters, it is concluded that line 231mt468 is the one with the most altered oxygen consumption ratio per mtDNA copy.
- The cybrids respond differently to metformin and DCA, with 231mt613, which contains healthy mitochondria, showing the greatest decrease in viability to both drugs. In contrast, 231mt231 has the mitochondria of the most aggressive tumour line of all those studied and is the most resistant to both. In addition, treatment with DCA seems to favour the association of complex I to form supercomplexes.
- These results support the hypothesis that tumour cells with different degrees of invasiveness present various mitochondrial defects that affect the functionality of the OXPHOS system favouring the process of tumorigenesis.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell Fifth Edition.
2. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. Vol. 9, Cell Systems. Cell Press; 2019. p. 109-27.
3. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, Cancer Discovery. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31-46.
4. Xu X, Peng Q, Jiang X, Tan S, Yang Y, Yang W, et al. Metabolic reprogramming and epigenetic modifications in cancer: from the impacts and mechanisms to the treatment potential. Vol. 55, Experimental and Molecular Medicine. Springer Nature; 2023. p. 1357-70.
5. Wallace DC. Mitochondria and cancer. Vol. 12, Nature Reviews Cancer. 2012. p. 685-98.
6. Letts JA, Sazanov LA. Clarifying the supercomplex: The higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. Vol. 24, Nature Structural and Molecular Biology. Nature Research; 2017. p. 800-8.
7. Lobo-Jarne T, Ugalde C. Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. Vol. 76, Seminars in Cell and Developmental Biology. Elsevier Ltd; 2018. p. 179-90.
8. Javadov S, Jang S, Chapa-Dubocq XR, Khuchua Z, Camara AK. Mitochondrial respiratory supercomplexes in mammalian cells: structural versus functional role. Vol. 99, Journal of Molecular Medicine. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 57-73.
9. Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. Cell. 7 de septiembre de 2017;170(6):1247-1257.e12.
10. Kopinski PK, Singh LN, Zhang S, Lott MT, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation and cancer. Vol. 21, Nature Reviews Cancer. Nature Research; 2021. p. 431-45.
11. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. Vol. 16, Nature Reviews Genetics. Nature Publishing Group; 2015. p. 530-42.
12. Liao M, Yao D, Wu L, Luo C, Wang Z, Zhang J, et al. Targeting the Warburg effect: A revisited perspective from molecular mechanisms to traditional and innovative therapeutic strategies in cancer. Acta Pharm Sin B. 16 de diciembre de 2023;
13. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. Vol. 166, Cell. Cell Press; 2016. p. 555-66.
14. P.King Michael, Attardi Giuseppe. Isolation of Human Cell Lines Lacking Mitochondrial DNA.
15. Berridge M V., Neuzil J. The mobility of mitochondria: Intercellular trafficking in health and disease. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1 de diciembre de 2017;44:15-20.
16. P.King Michael, Attardi Giuseppe. Human Cells Lacking mtDNA: Repopulation with Exogenous Mitochondria by Complementation.
17. Ortega MA, Fraile-Martínez O, Asúnsolo Á, Buján J, García-Honduvilla N, Coca S. Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. J Oncol. 2020;2020.
18. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Núñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Chapter 3: Subtypes of Breast Cancer. Breast Cancer. 2022;31-42.
19. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. Vol. 8, Journal of Cancer. Ivyspring International Publisher; 2017. p. 3131-41.
20. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. Vol. 166, Cell. Cell Press; 2016. p. 555-66.
21. Bacman SR, Nissanka N, Moraes CT. Cybrid technology. En: Methods in Cell Biology. Academic Press Inc.; 2020. p. 415-39.
22. Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principios de bioquímica. 5.<sup>a</sup> ed. Ediciones Omega; 2009.
23. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Vol. 65, Journal of Immunological Methods. 1983.

24. Schtigger H, Von G, Gustav-Embden J. Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. Vol. 199, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1991.
25. Schaägger H, Cramer WA, von Jagow G. Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Anal Biochem.* 1 de marzo de 1994;217(2):220-30.
26. Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query [Internet]. [Citado 1 de junio de 2024]. Disponible en: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_SPEC=GeoBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch)
27. NEBcutter 3.0 [Internet]. [Citado 1 de junio de 2024]. Disponible en: <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>
28. RCSB PDB: Homepage [Internet]. [Citado 1 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/>
29. Cheng J, Novati G, Pan J, Bycroft C, Žemgulyte A, Applebaum T, et al. Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense. *Science* (1979). 22 de septiembre de 2023;381(6664).
30. EMBOSS Transeq < EMBL-EBI [Internet]. [Citado 1 de junio de 2024]. Disponible en: [https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss\\_transeq](https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss_transeq)
31. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2 de julio de 2018;46(W1):W296-303.
32. AlphaFold Protein Structure Database [Internet]. [Citado 1 de junio de 2024]. Disponible en: <https://alphafold.ebi.ac.uk/>
33. Gallardo ME, Moreno-Loshuertos R, López C, Casqueiro M, Silva J, Bonilla F, et al. m.6267G > A: A recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome C oxidase activity and is associated with tumors. *Hum Mutat.* junio de 2006;27(6):575-82.
34. Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT, McKenzie M. Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. Vol. 1793, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2009. p. 78-88.
35. Giachin G, Bouverot R, Acajjaoui S, Pantalone S, Soler-López M. Dynamics of human mitochondrial complex I assembly: Implications for neurodegenerative diseases. Vol. 3, *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A.; 2016.
36. Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell.* 7 de septiembre de 2017;170(6):1247-1257.e12.
37. Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex i. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1 de julio de 2016;1857(7):902-14.
38. Hirst J. Mitochondrial complex i. Vol. 82, *Annual Review of Biochemistry*. 2013. p. 551-75.
39. Shin MG, Joon Kim H, Kim HR, Lee IK, Cho D, Kee SJ, et al. Impaired Activity of Mitochondrial Respiratory Chain Enzyme Complexes and Mitochondrial Genomic Aberrations in Leukemia Cells from Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 16 de noviembre de 2006;108(11):1918.
40. Mayr JA, Meierhofer D, Zimmermann F, Feichtinger R, Kögler C, Ratschek M, et al. Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocyoma. *Clinical Cancer Research.* 15 de abril de 2008;14(8):2270-5.
41. Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. Vol. 10, *Human Molecular Genetics*. 2001.
42. Vial G, Detaille D, Guigas B. Role of mitochondria in the mechanism(s) of action of metformin. Vol. 10, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
43. Schoenmann N, Tannenbaum N, Hodgeman RM, Raju RP. Regulating mitochondrial metabolism by targeting pyruvate dehydrogenase with dichloroacetate, a metabolic messenger. Vol. 1869, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V.; 2023.
44. Schägger H. [46]Electrophoretic techniques for isolation and quantification of oxidative phosphorylation complexes from human tissues. *Methods Enzymol.* 1 de enero de 1996;264:555-66.