



Universidad
Zaragoza

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Efecto del metabolismo glucídico sobre la supervivencia y proliferación de los tumores

Trabajo de Fin de Máster
Máster en Biología Molecular y Celular
2015

Autor

Joaquín Marco Brualla

Directores

Alberto Anel

Raquel Moreno Loshuertos

ABREVIATURAS

2HE: 2-hidroetidio

ABB: *Annexin Binding Buffer*; Tampón de unión de anexina

AIF: *Apoptosis Inducing Factor*; Factor de inducción de apoptosis

Akt: Proteín quinasa B

Ann-V: Anexina-V

Apaf-1: *Apoptotic protease activating factor 1*; Factor de activación de proteasa apoptótica 1

APS: Persulfato de amonio

BNGE: Electroforesis nativa en gel en gradiente de poliacrilamida

BSA: Albúmina sérica bovina

BTK: Tirosina quinasa de Bruton

CAC: Ciclo del ácido cítrico

Células NK: Células *Natural Killer*; Asesinas naturales

c-FLIP: *cellular Flice-Like Inhibitory Protein*; Proteína inhibidora similar a “Flice” (caspasa 8)

CI; CII; CIII; CIV; CV: Complejo I; complejo II; complejo III; complejo IV; complejo V

CLL: Leucemia linfocítica crónica

CoQ: Coenzima Q

COX: Citocromo c oxidasa

CS: Citrato sintasa

CTL: Linfocitos T citotóxicos

Cyt c: Citocromo c

DCA: Dicloroacetato

DCF: Diclorofluoresceína

DCPIP: 2,6-Diclorofenol indofenol

DcR1; DcR2: *Decoy Receptor 1; Decoy Receptor 2*; Receptor señuelo 1; Receptor señuelo 2

DD: *Death Domain*; Dominio de muerte

DED: *Death Effector Domain*; Dominio efector de muerte

DHE: Dihidroetidio

DISC: *Death-Inducing Signaling Complex*; Complejo de señalización de la inducción de muerte

DNP: Dinitrofenol

DR4; DR5: *Death Receptor 4; Death Receptor 5*; Receptor mortal 4; Receptor mortal 5

DTNB: Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoico)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FADD: *Fas Associated Death Domain*; Dominio de muerte asociado a Fas

FDA: *Food and Drug Administration*

Gal: Galactosa

Glu: Glucosa

H₂DCF-DA: Dihidrodiclorofluoresceína diacetato

HIF: Factor inducible por hipoxia

IFN- γ : Interferón gamma

LUV: *Large Unilamellar Vesicles*; Vesículas grandes unilaminares

LUV-TRAIL: Liposomas tipo “LUV” unidos a la fracción extracelular recombinante de TRAIL

MCL: Linfoma de células de manto

mETC: Cadena de transporte electrónico mitocondrial

MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

mTOR1: *mammalian Target Of Rapamycin 1*; Diana de rapamicina de mamíferos 1

MTT: Bromuro de dimetil-tiazolitetrazolio

NADH-DH: NADH deshidrogenasa

OAA: Oxalacetato

OXPPOS: Fosforilación oxidativa mitocondrial

PBS: Tampón fosfato salino

PDH: piruvato deshidrogenasa

PDK1: Piruvato deshidrogenasa quinasa 1

PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa

PS: Fosfatidil serina

PVDF: Polivinil difluoruro

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPP: Ruta de las pentosas fosfato

SC: Supercomplejo respiratorio

SDS: Dodecil sulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRAIL: *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*; Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Bases moleculares del cáncer.....	2
2.1.1. <i>Requerimientos mínimos para la transformación oncogénica.....</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Metabolismo del cáncer.....</i>	<i>4</i>
2.1.2.1. Causas de la pérdida de la respiración mitocondrial.....	5
2.1.2.2. Rutas alteradas en la síntesis de biomoléculas.....	6
2.1.3. <i>Progresión tumoral y metástasis.....</i>	<i>7</i>
2.2. Organización de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC)....	8
2.3. Muerte celular programada o apoptosis.....	10
2.3.1. <i>Vía intrínseca.....</i>	<i>11</i>
2.3.2. <i>Vía extrínseca.....</i>	<i>12</i>
3. ANTECEDENTES.....	13
3.1. La línea celular L929dt como modelo <i>in vitro</i> de células metastáticas.....	13
3.2. Dicloroacetato (DCA) como agente antitumoral.....	13
3.3. Liposomas decorados con Apo2L/TRAIL como inmunoterapia antitumoral	14
3.4. Ibrutinib.....	16
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
4.1. Hipótesis.....	17
4.2. Objetivos.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Cultivos celulares.....	18
5.1.1. <i>Líneas celulares.....</i>	<i>18</i>
5.1.2. <i>Medios de cultivo.....</i>	<i>18</i>
5.1.3. <i>Mantenimiento de los cultivos celulares.....</i>	<i>18</i>

5.1.4.	<i>Contaje y determinación de la viabilidad celular</i>	19
5.1.5.	<i>Congelación y descongelación de células</i>	19
5.2.	<i>Análisis de proteínas</i>	19
5.2.1.	<i>Purificación de mitocondrias para análisis de complejos por “Blue Native-PAGE”</i>	19
5.2.2.	<i>Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida “Blue Native”</i>	21
5.2.2.1.	<i>Determinación de la actividad del complejo I en gel</i>	22
5.2.3.	<i>Extracción y fraccionamiento de lisados celulares</i>	22
5.2.4.	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS</i>	23
5.2.5.	<i>Transferencia de proteínas a membranas</i>	23
5.2.6.	<i>Análisis de proteínas mediante inmunoblot (Western-Blotting) y detección de los inmunocomplejos</i>	24
5.3.	<i>Medidas de la actividad enzimática</i>	25
5.3.1.	<i>Medida de la actividad de la citrato sintasa</i>	25
5.3.2.	<i>Medida de la actividad del complejo I</i>	26
5.3.3.	<i>Medida de la actividad de los complejos I+III</i>	27
5.3.4.	<i>Medida de la actividad del complejo II</i>	27
5.3.5.	<i>Medida de la actividad de los complejos II+III</i>	28
5.3.6.	<i>Medida de la actividad del complejo IV</i>	28
5.4.	<i>Medida de la funcionalidad OXPHOS</i>	29
5.4.1.	<i>Electrodo de oxígeno</i>	29
5.4.2.	<i>Medida de respiración endógena y desacoplada en células intactas</i>	29
5.4.3.	<i>Curvas de crecimiento</i>	30
5.5.	<i>Determinación de la proliferación celular</i>	31
5.6.	<i>Citometría de flujo</i>	32
5.6.1.	<i>Inducción de apoptosis</i>	32
5.6.2.	<i>Expresión de DR4 y DR5 en superficie</i>	32

5.6.3.	<i>Expresión del MHC-I</i>	33
5.6.4.	<i>Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	33
5.7.	Análisis estadístico	34
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1.	Efecto sinérgico entre el DCA y LUV-TRAIL.....	35
6.1.1.	<i>Efecto del DCA sobre la expresión de c-FLIP, DR4 y DR5</i>	38
6.2.	Efecto sinérgico de la combinación de DCA con ibrutinib	40
6.2.1.	<i>Discusión</i>	42
6.3.	Caracterización de la capacidad respiratoria mitocondrial de la línea celular L929dt e influencia sobre su metabolismo glucolítico	44
6.3.1.	<i>Metabolismo glucolítico de la línea celular L929dt</i>	44
6.3.1.1.	Tiempo de duplicación en medio de galactosa	44
6.3.1.2.	Respiración endógena y desacoplada	45
6.3.1.3.	Efecto del DCA sobre el crecimiento, la viabilidad y la expresión del MHC-I	45
6.3.2.	<i>Funcionalidad de los complejos respiratorios</i>	47
6.3.2.1.	Expresión y asociación de los complejos respiratorios	48
6.3.2.2.	Actividad de los complejos respiratorios.....	49
6.3.3.	<i>Análisis comparativo de la formación de ROS</i>	51
6.3.4.	<i>Discusión</i>	52
7.	CONCLUSIONES	54
8.	BIBLIOGRAFÍA	55
9.	ANEXOS	60

1. RESUMEN

Cuando una célula normal del organismo se convierte en tumoral, ésta sufre una amplia remodelación metabólica. Entre otros cambios, las células tumorales cambian su forma de obtener energía, pasando de realizar la respiración aerobia a la anaerobia. Esto es conocido como el “efecto Warburg”. En los últimos años, se está empezando a utilizar este cambio metabólico como diana contra el cáncer. En este trabajo, se ha estudiado el metabolismo glucídico del cáncer a través de dos aproximaciones. Por una parte, se ha utilizado el dicloroacetato (DCA), fármaco que fuerza a las células a realizar la fosforilación oxidativa mitocondrial, como agente sensibilizador de líneas celulares de distintos orígenes frente a la acción citotóxica de TRAIL unido a liposomas o de ibrutinib. Por otra parte, se ha caracterizado la funcionalidad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC) y su influencia en el metabolismo glucolítico de la línea celular L929dt, derivada de la línea de fibroblasto de ratón L929, que sufrió un proceso espontáneo de pérdida de adhesión a la placa de cultivo. Los resultados muestran que el DCA es capaz de sinergizar con los fármacos utilizados en las líneas celulares ensayadas. Además de esto, las células L929dt presentan una disminución en la incorporación del complejo I de la mETC en supercomplejos, lo cual reduce su capacidad respiratoria y las hace sensibles al DCA.

When normal cells become tumorigenic, they undergo a large metabolic shift. Among other things, tumor cells change their way of obtaining energy, shifting from aerobic to anaerobic respiration. This phenomena is known as “Warburg effect”. In the last years, tumor metabolism has become a novel and promising approach against cancer. In this work, glycolytic metabolism of cancer has been studied through two different approaches. On the one hand, dichloroacetate (DCA), a drug which forces cells to perform oxidative phosphorylation (OXPHOS), has been used to sensitize several cell lines to the cytotoxic effect of either liposome-bound TRAIL or ibrutinib. On the other hand, it has been characterised the mitochondrial electron transport chain (mETC) functionality and its influence in the glycolytic metabolism of L929dt cells, a tumor cell derived from mouse fibroblast L929, which suffered a spontaneous detachment from the culture dish. Results show that DCA can synergise with both drugs in the studied cell lines. Apart from this, L929dt cells have defects in mETC complex I ability to form supercomplexes, which limits their OXPHOS performance and turns them sensitive to DCA action.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Bases moleculares del cáncer

La carcinogénesis, u oncogénesis, es un proceso mediante el cual una célula normal se transforma en célula tumoral. Las células tumorales, debido a la acumulación de mutaciones en su material genético, comienzan a proliferar de manera autónoma y descontrolada, conformando un nuevo tejido o neoplasia [1]. Este tumor crece inicialmente de manera local, en su tejido originario. Durante este estadio de crecimiento se conoce como tumor primario o benigno. No obstante, conforme avanza en su crecimiento, este tejido canceroso comienza a adquirir características invasivas, pasando a ser un tumor maligno [2]. Posteriormente, estas células malignas pueden abandonar el tejido originario y colonizar otros tejidos del organismo. Este último proceso se conoce como metástasis.

El cáncer es una enfermedad altamente heterogénea. A lo largo de los años, se han descrito más de 100 tipos de cánceres, e incluso pueden encontrarse subtipos de cánceres dentro del propio tejido neoplásico [3, 4]. La carcinogénesis es inespecífica de tejido y puede originarse por una gran variedad de mutaciones. Así pues, el cáncer supone una enfermedad de una amplia diversidad, lo que complica en gran medida su estudio para tratar de combatirla. No obstante, las células cancerosas durante su desarrollo poseen una serie de capacidades comunes entre ellas que las definen, que son: evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis prolongada en el tiempo, autosuficiencia sobre los factores de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento e invasión de los tejidos y metástasis [5]. Una revisión posterior de este trabajo permitió añadir otras características comunes que comparten los tumores: inflamación del tumor, inestabilidad genómica, evasión de la respuesta inmunitaria y remodelación del metabolismo energético [6] (*Fig.2.1*).

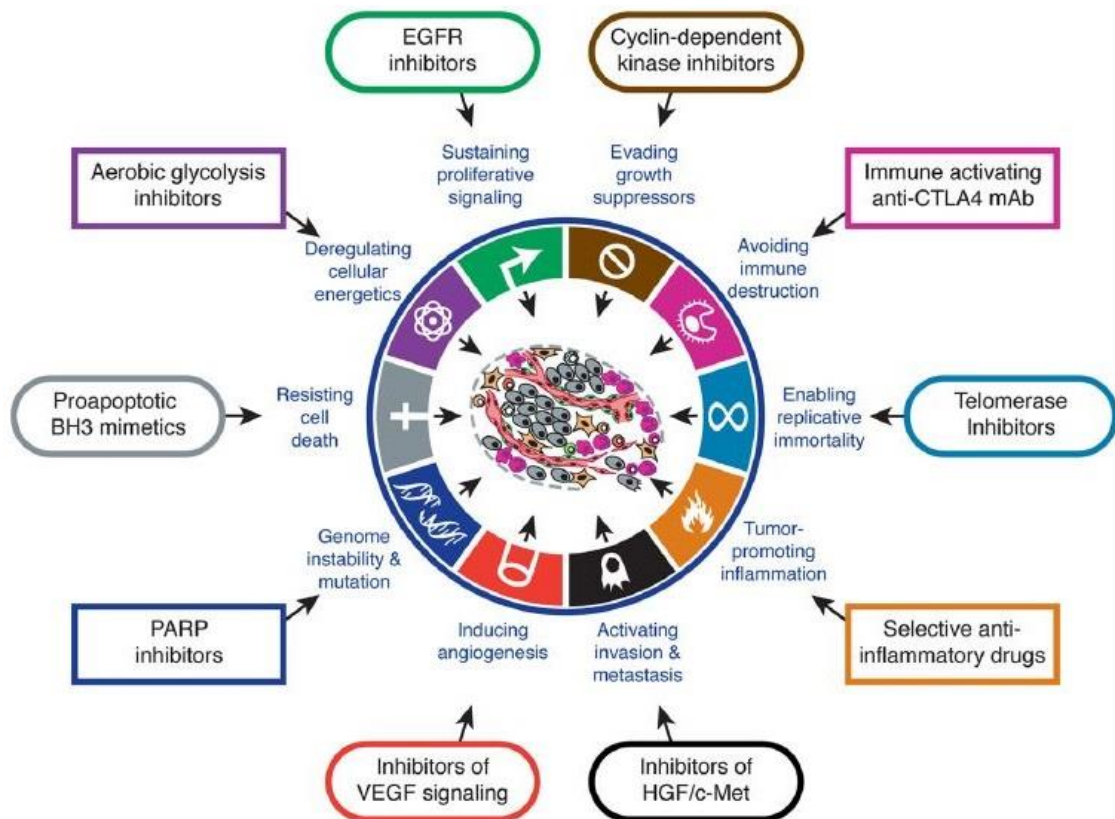


Figura 2.1 Características comunes en el desarrollo de los tumores y ejemplos ilustrativos de terapias para combatirlos [6].

2.1.1. Requerimientos mínimos para la transformación oncogénica

Las células tumorales, para poder obtener las capacidades que las definen [6], deben primero haber estado sujetas a ciertas mutaciones que afectan a 3 aspectos esenciales en su crecimiento y regulación:

- *Potencial replicativo ilimitado*: las células normales poseen una capacidad de replicación limitada [7]. Esto es principalmente debido a la pérdida progresiva de la actividad de la enzima telomerasa, cuya función consiste en replicar los telómeros de los cromosomas. Esta actividad es esencial para mantener la estabilidad del genoma. Por tanto, conforme pasa el tiempo, los telómeros se van acortando debido a esta pérdida de actividad, y esto termina provocando eventualmente la inhibición de la replicación y la muerte de la célula [7]. Sin embargo, las células tumorales readquieren esta actividad telomerasa, encontrándose constitutivamente activa [8], lo cual implica el mantenimiento de la longitud de los telómeros y, por tanto, el desbloqueo del límite replicativo.

- *Inactivación de genes supresores de tumores*: una de las adversidades a las que se enfrenta una célula tumoral desde sus inicios es la manera de inhibir las señales antiproliferativas. Esto lo consiguen gracias a la mutación en genes supresores de tumores. Estos genes suelen estar asociados al control del ciclo celular en función de las señales de crecimiento del entorno (en forma de citoquinas o factores de crecimiento) o del daño interno de la célula (lesión de un orgánulo, daño en el DNA, etc.). Los ejemplos más representativos son los genes que codifican la proteína del retinoblastoma (pRb) y p53 [6]. Una mutación en alguno de estos genes conlleva una falta de sensibilidad a errores internos y a las señales antiproliferativas, lo cual impide la parada en el ciclo celular para la corrección de errores, o la inducción de apoptosis en la célula, promoviendo así el crecimiento anómalo del tumor.
- *Ganancia de actividad de protooncogenes*: los protooncogenes son genes que en situación fisiológica codifican proteínas que participan en el control del crecimiento celular. Cuando estos genes sufren una mutación, puede ocurrir que codifiquen proteínas patológicamente activas o que las sobreexpresen, de manera que la célula sufre un crecimiento acelerado y sin control. A estos genes mutados se les denomina oncogenes. Se han descrito una amplia cantidad de oncogenes en células tumorales, como por ejemplo receptores de factores de crecimiento, proteínas citoplasmáticas de transducción de señal o ciclinas [5].

2.1.2. Metabolismo del cáncer

Paralelamente a los cambios producidos durante la transformación oncogénica, las células tumorales recién formadas sufren en general una rápida remodelación en su metabolismo. Uno de los cambios más llamativos, observado por primera vez por Otto Warburg [9] es la preferencia por realizar la ruta fermentativa de la glucólisis en lugar de la respiración y la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), incluso en presencia de oxígeno. De esta manera, a pesar de obtener ATP de una forma menos eficiente, es decir, utilizando una mayor cantidad de glucosa (dos moléculas de ATP obtenidas por la ruta fermentativa en comparación con las 34 moléculas de ATP por molécula de glucosa obtenidas por la ruta OXPHOS), sí lo consiguen con una mayor rapidez. Este fenómeno es conocido como “efecto Warburg”.

2.1.2.1. Causas de la pérdida de la respiración mitocondrial

Basándose en esta teoría, O. Warburg propuso además que la causa originaria de este cambio hacia un fenotipo más glucolítico podrían ser defectos en el metabolismo energético, principalmente los llevados a cabo por la mitocondria. Si bien se ha observado una gran variedad de mutaciones en mitocondrias de diversas células tumorales [10], estos defectos no son los únicos que son capaces de causar una pérdida en la actividad respiratoria mitocondrial. De hecho, pueden ser muy diversos:

Por una parte, la gran mayoría de los tumores se ven forzados a crecer en un microambiente poco vascularizado, es decir, en hipoxia. Esta situación fuerza a las células a su adaptación metabólica por medio de la activación de moléculas como los factores inducibles por hipoxia (HIF-1 y HIF-2). Estos factores por su parte promueven la glucólisis e inhiben la utilización del ciclo del ácido cítrico (CAC) y de la vía OXPHOS, a través de la inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), para obtener energía [11].

Por otra parte, y tal como se ha explicado con anterioridad, durante el proceso de transformación oncogénica se producen mutaciones de protooncogenes o/y de genes supresores de tumores claves en la regulación del metabolismo celular. Esta alteración provoca un cambio en el tumor hacia un fenotipo glucolítico. Unas de las mutaciones más encontradas en el cáncer son las de la familia de protooncogenes Ras, y p53 [12, 13]. Además de estos genes, existen otros oncogenes que alteran diversas rutas de señalización celular, como la ruta de supervivencia y proliferación PI3K/Akt/mTORC1 (*fosfatidil inositol 3 quinasa / proteína quinasa B / mammalian target of rapamycin 1*) y Myc, que se encuentran activas en células tumorales de forma continua e independiente de los factores de crecimiento extracelulares. Esta activación no regulada promueve un metabolismo acelerado, mediante la promoción de la transcripción de enzimas glucolíticas y un aumento en la toma de nutrientes y síntesis de biomoléculas [14]. Estas rutas también se conocen como rutas oncogénicas.

Adicionalmente, otra causa de esta remodelación metabólica puede ser la mutación directa de enzimas o sistemas claves en el buen funcionamiento de la respiración aerobia, como la piruvato quinasa [15], la isocitrato deshidrogenasa [15] o mutaciones en la mitocondria, como ya se ha comentado [10, 16].

Para finalizar, se ha observado que este aumento de la utilización de la ruta glucolítica por sí mismo también es capaz de inhibir la respiración [17]. Este efecto es conocido como el “efecto Crabtree”. Se ha sugerido que esto sucede debido a la competición entre enzimas de la glucólisis y de la ruta OXPHOS por el ADP y Pi cuando se estimula la ruta glucolítica [18].

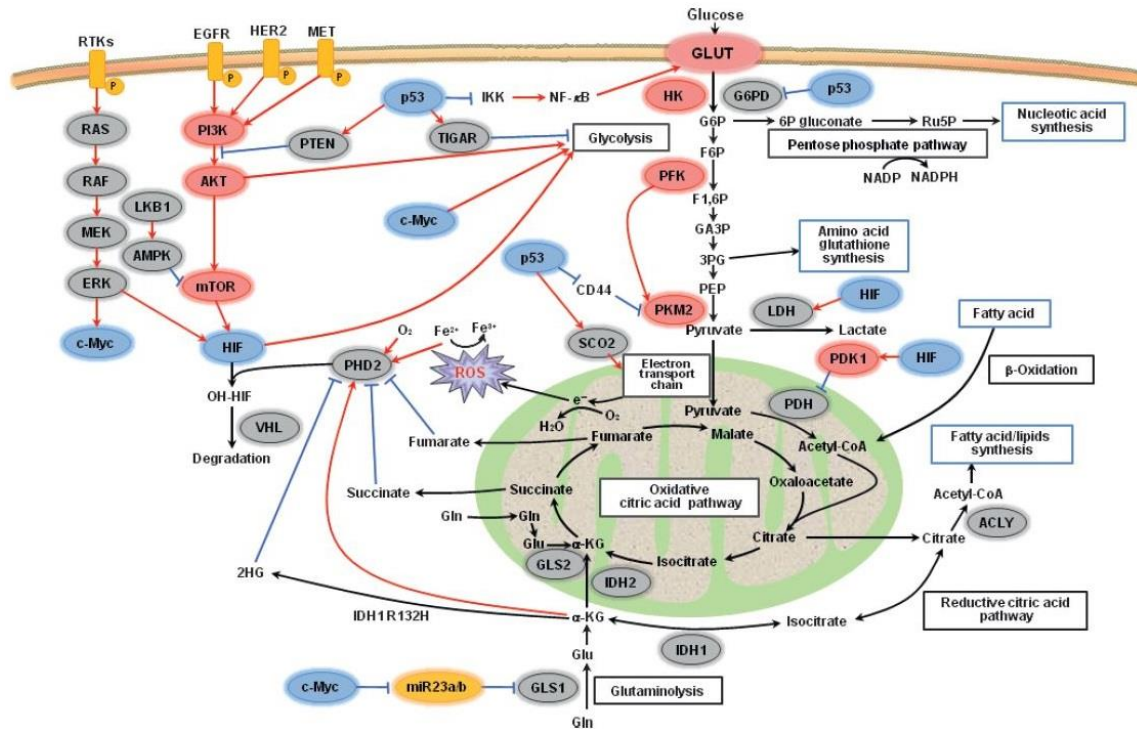


Figura 2.2. Rutas de señalización y su regulación en el metabolismo del cáncer [15].

2.1.2.2. Rutas alteradas en la síntesis de biomoléculas

Independientemente de las causas de esta transformación metabólica, la ruta glucolítica de obtención de energía no es la única en sufrir cambios. Con el fin de proliferar rápidamente, las células tumorales deben sintetizar rápida y continuamente biomoléculas para un adecuado crecimiento y división. Para ello, parte de la glucosa que entra en la glucólisis se utiliza regenerar el NAD^+ mediante fermentación láctica, mientras que la otra parte de esa glucosa se convierte en acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos [14]. Además de esto, los esqueletos carbonados de la glucosa y sus derivados son utilizados para la síntesis de aminoácidos no esenciales y ácidos nucleicos mediante la ruta de las pentosas fosfato (RPP) [14]. Por último, las células tumorales requieren aminoácidos como glutamina como fuente de nitrógeno para la síntesis de otros aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos [14].

Por tanto, observando el panorama general, se puede concluir que las células tumorales sufren una importante remodelación en su metabolismo respecto a las células normales, potenciando o inhibiendo rutas importantes para el crecimiento celular normal, con el objetivo de garantizar su supervivencia y una proliferación acelerada. Este hecho hace acrecentar el interés acerca del metabolismo cancerígeno como una posible diana terapéutica para combatir esta enfermedad. El uso de inhibidores de rutas metabólicas que están potenciadas en las células tumorales, o de potenciadores de rutas metabólicas que están inhibidas en ellas supone un acercamiento potencialmente prometedor [19].

2.1.3. Progresión tumoral y metástasis

Todos estos cambios descritos no son los únicos que sufren las células tumorales. Como ya se ha comentado anteriormente, conforme las células tumorales se van asentando en el tejido donde crecen, éstas comienzan a sufrir una serie de cambios en su fenotipo, de manera que se va formando un tumor secundario, diferente al de partida, con capacidad angiogénica e invasiva [20]. Las células que se forman de este modo reciben el nombre de células metastáticas. Dichas células poseen la capacidad de abandonar el tejido donde crece el tumor primario y viajar a través de los vasos sanguíneos hasta llegar a otro tejido del organismo, donde vuelven a adquirir la capacidad de adhesión y comienzan a proliferar en él.

Las células metastáticas poseen cierta predilección a crecer en determinados tejidos [21]. Este hecho ya fue observado a finales del siglo XIX por Stephen Paget, quien hipotetizó que, al igual que las semillas de una planta, las células metastáticas se reparten por todas las direcciones, sin embargo sólo podrán crecer en determinados ambientes [22]. Esta hipótesis se conoce como “*seed and soil*”, donde la semilla (*seed*) sería el tumor primario y el suelo (*soil*) sería el microambiente del órgano hospedador. Esta teoría fue discutida varios años después, argumentando que los patrones de circulación en la sangre de los tumores desde el tejido originario explicaba la especificidad de órgano en la metástasis [23]. Sin embargo, esta última hipótesis fue desmentida, ya que se demostró que aunque las células tumorales circulaban por todos los órganos, sólo se producía metástasis en algunos selectivamente [24, 25]. Por tanto, el crecimiento de una célula metastática en otro órgano depende de las interacciones que se produzcan entre dicho tumor y el tejido hospedador.

El proceso de metástasis tumoral sigue siendo objeto de controversia en la comunidad científica, y todavía quedan por aclarar los mecanismos internos precisos que suceden en la célula. A pesar de ello, la sucesión de eventos generalmente aceptada es la siguiente: primeramente, las células tumorales primarias sufren un cambio en su fenotipo y comienzan a secretar moléculas señal proangiogénicas, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en respuesta al ambiente hipóxico que las rodea. Estas señales provocan una vascularización progresiva alrededor del tumor [26]. Una vez que se encuentra vascularizado, las células tumorales adquieren la capacidad de atravesar la membrana basal. Esto lo logran mediante diversos mecanismos, como la pérdida de adhesión al tejido primario [27], la ganancia de motilidad celular [28, 29] y la secreción de proteasas [30]. Este proceso se conoce como transición epitelio-mesenquimal. Una vez que se encuentran en los vasos sanguíneos, pueden migrar a través de él hasta llegar a otro tejido del organismo. Allí, estas células metastáticas sufren un segundo cambio de fenotipo, donde vuelven a ser capaces de adherirse al epitelio y comienzan a crecer de nuevo [31].

Actualmente, no existen tratamientos específicos para detener la metástasis, si bien se han propuesto posibles dianas terapéuticas y terapias [21]. Además de esto, la falta de conocimiento sobre la rapidez de los eventos de progresión tumoral impiden definir en qué estadio sería relevante clínicamente administrar dicha terapia [32]. Por tanto, existe un gran interés en averiguar con mayor profundidad las bases moleculares del evento metastático para poder encontrar tratamientos más efectivos.

2.2. Organización de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC)

La cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC) está organizada como una serie de complejos respiratorios multiproteicos en la membrana interna mitocondrial que se encargan en conjunto de aceptar los electrones provenientes de moléculas donadoras como NADH [complejo I (CI)] o FADH₂ [complejo II (CII)], para la formación de H₂O y la creación de un gradiente electroquímico que desemboca en la síntesis de ATP por parte del complejo ATP sintasa [también llamado complejo V (CV)].

La forma en la que se asocian estos complejos en la mETC ha sido objeto de debate en la comunidad científica. Por un lado, existe el modelo clásico o fluido, que es

el que mayor aceptación ha tenido hasta estos últimos años. Este modelo argumenta que los complejos respiratorios se encuentran anclados a la membrana interna mitocondrial y el flujo de electrones entre ellos está conectado a través de las moléculas transportadoras citocromo c (cyt c) y coenzima Q (CoQ) [33]. El otro modelo aceptado es el sólido, que propone que los complejos respiratorios están organizados en estructuras supramoleculares o supercomplejos (SCs), interaccionando entre ellos para garantizar un transporte de electrones eficiente [34]. En concreto, identifica la formación de SCs que contienen los complejos I-III-IV (también llamado respirasoma) y los complejos III-IV, sin observarse asociación del CII con ninguno de ellos.

Estudios recientes proponen que ambos modelos pueden contemplarse como extremos de una situación intermedia en la que los complejos respiratorios, salvo el CII, pueden interactuar de forma dinámica, pudiendo coexistir ambos tipos de interacciones. Es decir, los complejos respiratorios pueden encontrarse en la mitocondria tanto formando SCs como en forma libre [35] y esta dinámica depende del tejido o de la disponibilidad de nutrientes. Este modelo es conocido como el modelo de plasticidad.

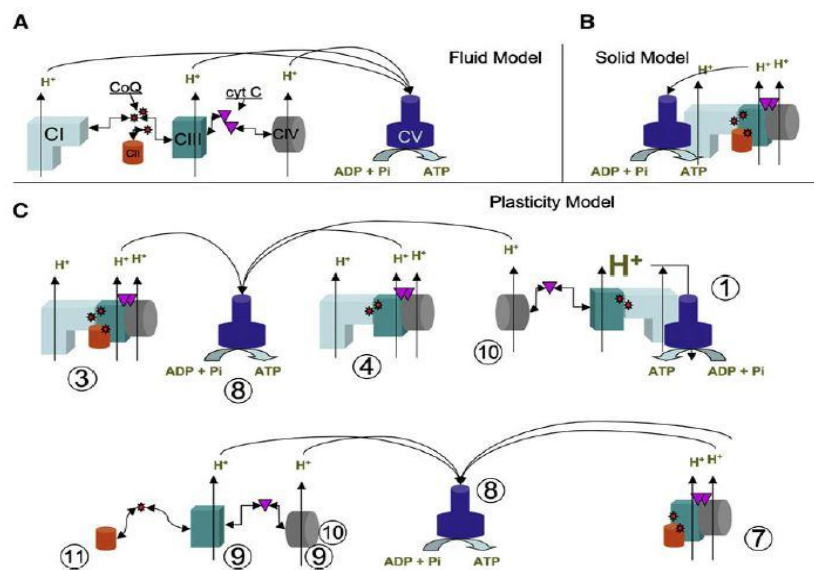


Figura 2.3. Principales modelos propuestos de la organización del sistema OXPHOS mitocondrial [35].

Durante los últimos años, el trabajo realizado por el grupo GENOXPHOS de nuestro departamento no sólo proporciona la evidencia genética de la existencia de SCs que sustentan el modelo de plasticidad, sino que además identifica el ensamblaje dinámico de SCs como un mecanismo por el que las células pueden adaptarse cambios en las fuentes de carbono disponibles para mejorar la eficiencia de la función OXPHOS [36].

2.3. Muerte celular programada o apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico por el que las células son capaces de inducir su propia muerte. Este tipo de muerte provoca en la célula un cambio en su morfología, pasando a formarse un cuerpo apoptótico. Las características fenotípicas consisten en el redondeamiento de las células, retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular, exposición de fosfatidil serina (PS) al exterior de la membrana plasmática, caída del potencial mitocondrial, formación de burbujas en el citoplasma, fragmentación del núcleo y condensación de la cromatina, sin pérdida de la integridad de la membrana plasmática [37]. Así pues, el contenido intracelular no se libera al exterior, evitando procesos inflamatorios incontrolados [38]. Los cuerpos apoptóticos formados son entonces reconocidos y fagocitados por células del sistema inmune innato, como los macrófagos.

La apoptosis es un fenómeno de gran relevancia biológica. Durante el desarrollo embrionario, la apoptosis es necesaria para la correcta formación de los tejidos [39]. En los linfocitos B y T, en sus procesos de maduración en la médula ósea y en el timo respectivamente, la apoptosis juega un papel importante en la eliminación de células autorreactivas. También, durante la etapa adulta, la apoptosis sucede continuamente para regular la homeostasis del organismo, renovando las células que forman parte de los tejidos [40].

Además de esto, la apoptosis es el mecanismo principal utilizado por las células del sistema inmunitario para eliminar células infectadas con un patógeno o tumorales. Para ello, estas células, principalmente linfocitos T citotóxicos (CTL) y células NK, son capaces de inducir estímulos en sus células diana, que sufren una cascada de señalización intracelular, culminando en los eventos fenotípicos descritos anteriormente.

Existen dos vías de activación de la apoptosis [41]:

- Vía intrínseca: sucede en respuesta de la propia célula a estímulos que generan alteraciones irreparables en ella, como daño al DNA, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o infecciones virales. Suele ser desencadenada por la mitocondria.

- Vía extrínseca: sucede en respuesta a un estímulo externo, a través de la unión de unos ligandos mortales (FasL, Apo2L/TRAIL, TNF- α) a unos receptores de membrana (Fas, DR4/DR5, TNFR), que transducen la señal de muerte al interior celular.

Ambas vías de señalización finalizan en la activación de unas enzimas proteolíticas llamadas caspasas, que median el desmantelamiento de la estructura celular.

2.3.1. Vía intrínseca

El orgánulo mediador central de esta vía es la mitocondria [42]. Una gran variedad de estímulos apoptóticos (estrés celular, drogas, radiaciones UV, daños en el DNA, agentes oxidantes, etc) desencadenan esta ruta apoptótica, la cual está regulada por proteínas de la familia Bcl-2.

La familia de proteínas de Bcl-2 regula procesos de permeabilización mitocondrial, con actividades opuestas entre ellas. Así pues, existen proteínas con actividad antiapoptótica (como Bcl-2, Bcl-X_L, o Mcl-1), que bloquean la salida de componentes internos de la mitocondria, y proteínas con actividad proapoptótica (como Bax, Bak, o las que sólo contienen el dominio BH3, llamadas *BH3 only*, como Bid o Bim), que fomentan la salida de los mismos.

La señal se inicia tras un estímulo apoptótico, que produce una activación y/o aumento de expresión de proteínas *BH3 only* [42]. Esto provoca la inhibición de proteínas antiapoptóticas y la activación de Bax y Bak, que provocan la caída de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la salida de diversos elementos pro-apoptóticos desde la matriz mitocondrial al citosol, como son el citocromo c, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) o Smac/DIABLO. La liberación del citocromo c es un evento crítico, ya que este interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*). Esta proteína actúa como molécula adaptadora de esta vía, con dATP y, posteriormente con la procaspasa-9, formándose un complejo heptamérico conocido como apoptosoma, que causa primero la activación de la caspasa 9, y luego de las caspasas ejecutoras 3 y 7, iniciando la apoptosis [43].

2.3.2. Vía extrínseca

La vía extrínseca de la apoptosis se inicia por la unión de uno de los ligandos extracelulares de muerte ya mencionados a sus respectivos receptores específicos de muerte. Los ligandos mortales pertenecen a la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). La mayoría de estos ligandos activan vías de señalización implicadas en respuestas proinflamatorias y de diferenciación celular, pero hay algunos, como TNF- α , FasL y Apo2L/TRAIL que son pro-apoptóticos.

El mecanismo de acción de esta vía comienza con la unión de un homotrímero del ligando a su receptor, lo que provoca a su vez la homotrimerización del mismo. De este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras, que son capaces de unirse a los dominios intracelulares de muerte del receptor (DD, *Death Domain*). Este proceso implica la interacción homofílica entre los DD de los receptores con los de las moléculas adaptadoras, como la proteína FADD (*Fas Associated Death Domain*). Estas moléculas adaptadoras poseen a su vez dominios efectores de muerte (DEDs, *Death Effector Domains*) capaces de interactuar homofílicamente con las procaspasas iniciadoras -8 y -10, provocando su activación. Así, se forma un complejo de señalización de muerte (DISC, *Death-Inducing Signaling Complex*) que contiene a la proteína FADD y las caspasas -8 o -10 activas. A partir de aquí, estas caspasas activas pueden por una parte procesar y activar directamente a las procaspasas ejecutoras (-3, -6 y -7), iniciando así la apoptosis, o procesar a Bid (una proteína de la familia *BH3 only*) [44, 45]. El procesamiento de esta proteína da como producto un fragmento corto de Bid llamado tBid, que es capaz de inducir oligomerización de Bax/Bak, promoviendo así la formación de poros en la membrana externa de la mitocondria y la salida de citocromo c, activando la vía intrínseca y amplificando la señal apoptótica.

3. ANTECEDENTES

3.1. La línea celular L929dt como modelo *in vitro* de células metastáticas

En un estudio anterior, nuestro grupo generó una línea celular derivada de los fibroblastos de ratón transformados L929, que perdía la adhesión a la placa de cultivo y que se denominaron L929dt (por *detached*). Se observó que estas células poseían un fenotipo más glucolítico que su línea celular parental, y que además perdían casi completamente la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) [46].

Este modelo *in vitro* mimetiza en cierta medida lo que ocurriría *in vivo* en situaciones de metástasis. De hecho, una de las características que se ha observado en los tumores metastáticos es que gran parte de ellos pierden en mayor o menor medida la expresión del MHC-I, haciéndose de esta manera más resistentes a la acción anti-tumoral de los CTL [47]. También se ha demostrado en estudios recientes que las células tumorales sufren una remodelación metabólica relacionada con el estrés cuando pierden la adhesión a la placa de cultivo [48], suceso que se puede asociar con el proceso de metástasis. Por último, en relación con el mayor metabolismo glucolítico, otros estudios han correlacionado defectos en la mitocondria de células tumorales con una mayor propensión a la progresión tumoral y al evento metastático [49-51], observando una mayor producción de ROS en mitocondrias de células con alto potencial metastático.

3.2. Dicloroacetato (DCA) como agente antitumoral

El dicloroacetato (DCA) es un fármaco inhibidor de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1). Esta inhibición de PDK1 desencadena la activación la piruvato deshidrogenasa (PDH), y por lo tanto fuerza a las células a realizar el ciclo del ácido cítrico (CAC) y la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), adquiriendo por tanto la energía desde la mitocondria y disminuyendo en gran medida la ruta fermentativa.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las células tumorales poseen un metabolismo preferentemente fermentativo incluso en presencia de oxígeno, lo que les permite obtener energía de una forma más rápida y por tanto un crecimiento acelerado respecto a las células no tumorales. Por tanto, la utilización del DCA sobre células tumorales inhibe en parte este metabolismo fermentativo, forzándolas a respirar a través de la mitocondria mediante OXPHOS y disminuyendo dicha ventaja en la proliferación celular. Este efecto sobre la inhibición del crecimiento ya se ha descrito, a concentraciones ≥ 25 mM de DCA y tras 48 horas de incubación, sobre varias líneas celulares *in vitro*, con un mayor efecto sobre aquellas que poseen defectos en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC) [52].

Además de esto, se ha observado en otros estudios que la inhibición de la vía OXPHOS, como por ejemplo en las células ρ^0 , que carecen de DNA mitocondrial, correlacionaba con una disminución en la expresión del MHC-I, mientras que la estimulación de la vía OXPHOS, utilizando DCA, resultaba en un aumento en la expresión del MHC-I [46, 53]. Otros estudios clínicos han demostrado la eficacia del DCA como medicamento reductor de lactato [54], que puede ser utilizado para el tratamiento de la acidosis láctica con una dosis oral relativamente alta de 25-100 mg/kg de peso corporal. Estos ensayos deberían asegurar también que los efectos secundarios sean tolerables a las dosis utilizadas [55]. El DCA se utiliza desde hace años para el tratamiento de varias enfermedades metabólicas, y su uso para el tratamiento de cánceres como el glioblastoma ha entrado ya en ensayos clínicos [56]. Por otra parte, ya se ha mostrado por lo menos la curación de un paciente con linfoma no Hodgkin con DCA como auto-medicación [57], aunque sería necesario la realización de ensayos clínicos controlados para verificar la potencia de esta droga.

3.3. Liposomas decorados con Apo2L/TRAIL como inmunoterapia antitumoral

Apo2L/TRAIL es una proteína que forma parte de la superfamilia TNF, cuya función consiste en la inducción de apoptosis en una gran variedad de células tumorales, sin afectar a células normales [58]. Su expresión se ha detectado en macrófagos, células dendríticas, células NK y linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ activados [59]. Se trata de una proteína de membrana de tipo II, sin embargo sólo se ha detectado en la superficie de estos tipos celulares cuando se encuentran en presencia de $IFN-\gamma$. En linfocitos T

humanos activados, Apo2L/TRAIL se encuentra almacenado en el interior de cuerpos multivesiculares citoplasmáticos asociado preferentemente con las membranas internas [60]. Tras un estímulo adicional, estas vesículas internas o exosomas son secretadas al exterior celular, donde son capaces de interactuar con receptores de membrana específicos, que se encargarán de transducir la señal de muerte al interior de la célula, induciendo así apoptosis en células adyacentes mediante la vía extrínseca [60, 61]. Apo2L/TRAIL es capaz de interactuar con 4 receptores de membrana: DR4 (*Death Receptor 4*, ó TRAILR1), DR5 (*Death Receptor 5*, ó TRAILR2) [62], DcR1 (*Decoy Receptor 1*), DcR2 (*Decoy Receptor 2*) [63] y uno soluble, la osteoprogesterina [64]. De todos ellos, tan sólo DR4 y DR5 son capaces de transducir la señal apoptótica [59].

Desde su descubrimiento, se ha tratado de utilizar a Apo2L/TRAIL desde distintos enfoques como posible tratamiento biológico contra el cáncer debido al potencial antitumoral que presenta esta proteína [45]. En uno de los estudios realizado por nuestro grupo de investigación se han generado vesículas lipídicas artificiales (*Large Unilamellar Vesicles*, LUVs) recubiertas de Apo2L/TRAIL soluble recombinante [65], mimetizando de esta manera a los exosomas que se generan en los linfocitos T. Se ha demostrado que estos liposomas, llamados LUV-TRAIL, son un tratamiento eficaz contra la artritis reumatoide en un modelo *in vivo* de conejos [65]. Por otra parte, se ha demostrado que aumenta muy significativamente su actividad respecto a Apo2L/TRAIL soluble sobre células de tumores hematológicos humanos [66, 67]. Sin embargo, hay tumores que han demostrado ser resistentes a la acción de Apo2L/TRAIL, tanto en fase soluble como asociado a liposomas (De Miguel, D. y Martínez-Lostao, L., comunicación personal).

En relación con el metabolismo de la glucosa, se ha descrito que en determinados tumores resistentes a Apo2L/TRAIL en forma soluble, se podía aumentar su sensibilidad inhibiendo la glucólisis con 2-deoxiglucosa y forzando la utilización de la vía OXPHOS mitocondrial [68]. Este efecto era debido a una reducción en la expresión de c-FLIP (*cellular Flice Like Inhibitory Protein*), un inhibidor de la vía extrínseca de la apoptosis. En estos experimentos se utilizó la 2-deoxiglucosa como inhibidor de la glucólisis, aunque se trata de un compuesto con baja potencialidad para su uso clínico dado que inhibe todos los efectos de la glucosa. Por tanto, una posible alternativa para sensibilizar a tumores resistentes a Apo2L/TRAIL sería utilizar otro fármaco inhibidor de la glucólisis con menores efectos secundarios, como el DCA.

3.4. Ibrutinib

El ibrutinib (o PCI-32765) es un fármaco inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK). Esta quinasa juega un papel crucial durante la maduración y señalización de los linfocitos B, así como de los tumores asociados a dichas células B, donde su señalización constitutivamente activa fomenta la patogenicidad de estos tumores.

Este fármaco ha demostrado ser efectivo en ensayos clínicos para el tratamiento del linfoma de células de manto (MCL) y de leucemia linfocítica crónica (CLL) [69, 70], siendo aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos estadounidense (*Food and Drug Administration*, o FDA) para el tratamiento de dichos cánceres en pacientes ya tratados con anterioridad.

También se ha propuesto el uso de ibrutinib para el tratamiento del mieloma múltiple [71, 72], una neoplasia hematológica de células plasmáticas diferenciadas que proliferan en la médula ósea. Esta enfermedad se desarrolla de forma heterogénea, de manera que la esperanza de vida puede variar desde pocas semanas hasta más de 10 años desde su diagnóstico [73], siendo en cualquier caso una enfermedad actualmente incurable [74].

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

El presente trabajo ha partido de las siguientes hipótesis:

1. La acción del dicloroacetato (DCA), que modifica la forma de obtener energía en las células tumorales y posee baja toxicidad, puede sensibilizar a dichas células tumorales a la acción citotóxica de los fármacos:
 - a) Liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL), a través de la pérdida de la expresión de la proteína antiapoptótica c-FLIP.
 - b) Ibrutinib, sobre líneas celulares derivadas de mieloma múltiple, en vista del potencial antitumoral de ambos fármacos sobre este tipo de cáncer.
2. La línea celular L929dt, derivada de la línea celular de fibroblasto de ratón L929, debe su mayor fenotipo glucolítico, al menos en parte, a defectos en su capacidad respiratoria mitocondrial.

4.2. Objetivos

Los objetivos propuestos para este trabajo son los siguientes:

1. Ensayar la capacidad sinérgica anti-tumoral del fármaco DCA, en combinación con:
 - a) LUV-TRAIL, en líneas celulares resistentes a este fármaco.
 - b) Ibrutinib, en líneas celulares de mieloma múltiple.
2. Caracterizar el metabolismo glucolítico y la capacidad respiratoria mitocondrial de la línea celular L929dt.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivos celulares

5.1.1. Líneas celulares

En este trabajo se han empleado las siguientes líneas celulares:

- Adenocarcinoma humano de pulmón (A549), adenocarcinoma humano de colon (HT29), cáncer de mama humano (MCF7) y mieloma múltiple humano (MM.1S y U266) para los estudios de la acción antitumoral de DCA con LUV-TRAIL o ibrutinib.
- Fibroblasto de ratón (L929), así como la sublínea L929dt para los estudios de la capacidad respiratoria de la línea L929dt. Las L929dt han perdido la capacidad de adhesión a la placa de cultivo [46].

5.1.2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon a partir de los medios comerciales DMEM ó RPMI (*Gibco*) que se suplementaron con suero fetal bovino (SFB, *Sigma*) a distintas concentraciones, GlutaMax (L-alanil-L-glutamina: 2mM, NaCl: $8,3 \times 10^{-3}\%$ (v/v), *Gibco*) y antibióticos (penicilina: 10000 U/ml y estreptomocina: 10 mg/ml) (*Pan Biotech*). La relación de los medios utilizados para cada línea celular se recoge en *Anexo 1*.

5.1.3. Mantenimiento de los cultivos celulares

Todas las líneas celulares se cultivaron de manera rutinaria en frascos de cultivo de 25, 75 o 150 cm² con tapón con filtro a una densidad de 3×10^5 cél/ml. Las células se mantuvieron en un incubador termostatzado (*Heraeus Cell*), a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂. Cada 2 ó 3 días se realizaron los pases de los cultivos, determinando el número de células y su viabilidad mediante la exclusión por el colorante azul *Trypan* (*Sigma*) (*apartado 5.1.4*). Todas las manipulaciones con las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (*Telstar*) y en condiciones estériles.

5.1.4. Contaje y determinación de la viabilidad celular

La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante recuento en cámara de Neubauer tras tinción con azul Trypan (*Sigma*). Este colorante es capaz de teñir las células muertas que han perdido la integridad de su membrana, dándoles una tonalidad azulada. Las células vivas o apoptóticas, al mantener íntegra su membrana plasmática excluyen el colorante azul Trypan. Para el contaje se mezclaron 50 μ l de suspensión celular, previamente homogeneizada, y 50 μ l de una solución de azul Trypan al 0,4% en NaCl 0,15 M que se depositaron sobre una cámara Neubauer y se observaron al microscopio óptico (*Optiphot, Nikon*). La densidad celular se calculó como el número de células viables multiplicado por la dilución de la suspensión celular y por el ajuste del tamaño de la cámara (10^4) y dividido por el número de cuadrantes contados. La viabilidad celular se evaluó considerando el número de células no coloreadas (viables) respecto al número de células totales.

5.1.5. Congelación y descongelación de células

Para la congelación de líneas celulares se utilizaron tubos criogénicos resistentes a N_2 líquido. En cada criotubo se congelaron aproximadamente 5×10^6 de células en 500 μ l de medio suplementado con 10% de DMSO (*Sigma*). Tras la resuspensión en el medio de congelación las células se guardaron lo más rápidamente posible en un congelador a -80°C , durante 48 horas. Posteriormente se almacenaron en contenedores de N_2 líquido.

La descongelación se realizó mediante la adición rápida del medio correspondiente, atemperado a 37°C , sobre el contenido del criotubo. Seguidamente, la suspensión celular se trasvasó a un tubo de fondo cónico hasta completar 10 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 524 g y las células se resuspendieron en 5 ml de medio completo y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm^2 .

5.2. Análisis de proteínas

5.2.1. Purificación de mitocondrias para análisis de complejos por “Blue Native-PAGE”

Para la extracción y purificación de mitocondrias para análisis por *Blue-Native* (BN), se partió de, al menos, 5 placas de 150 mm de diámetro al 80% de confluencia. Las células se recogieron en PBS suplementado al 10 % con SFB y se mantuvieron siempre en hielo a partir de este momento. Tras centrifugar las células a 1500–2000 rpm

durante 10 minutos, el pellet celular fue lavado 2 veces con NKM 1x frío (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 7,5 mM, Tris 1 mM, pH 7,4). A continuación, el pellet de células se congeló a -70° C durante, como mínimo, 10 minutos para facilitar la ruptura celular. El proceso puede pararse en este momento dejando las células a -70°C.

Después, el pellet celular congelado se resuspendió en tampón hipotónico (sacarosa 83 mM, MOPS 10 mM, pH 7,2), en una proporción aproximada de volúmenes *tampón:pellet* celular de 7:1. La suspensión de células se incubó durante 2 minutos en hielo y se transfirió a un homogeneizador *Potter-Dounce* con émbolo de teflón. A continuación, la mezcla se homogeneizó mediante 8-10 pases (“*pops*”, 600 rpm). Rápidamente, se le añadió 1 volumen de tampón hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH 7,2) y, tras mezclar bien, se centrifugó a 1000 g, en el *rotor SS34* durante 5 minutos a 4° C, para eliminar los núcleos y las células que no se han roto.

Los sobrenadantes se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos a 4° C en el mismo rotor. El pellet de mitocondrias obtenido se resuspendió en medio A (sacarosa 0,32 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) y la suspensión de mitocondrias se transfirió a tubos eppendorf. Seguidamente, estos tubos eppendorf se centrifugaron en una microcentrífuga a 12000 rpm durante 2 minutos, a 4°C. Los pellets mitocondriales resultantes se resuspendieron en medio A, juntando las mitocondrias de 2 tubos eppendorf en uno y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones que la primera vez. Este paso de lavado y centrifugación se repitió hasta tener todas las mitocondrias en un único tubo.

El pellet de mitocondrias resultante se resuspendió en 500 µl de medio A, de los que se tomaron 4 µl para medir la concentración de proteínas de la muestra por duplicado mediante el método Bradford [75]. A continuación, se volvió a sedimentar la muestra a 12000 rpm durante 2 minutos y a 4° C, y se resuspendió en el volumen necesario de solución de resuspensión (ácido aminocaproico, 1 M, Bis-Tris 50 mM pH 7,0) para tenerlas a una concentración de 10 µg/µl. A continuación, las mitocondrias se lisaron utilizando digitonina, que permite que los complejos se mantengan intactos y no se disgreguen las proteínas que los componen. La digitonina se utiliza a una concentración de 4 g/g proteína mitocondrial. Las muestras se incubaron en hielo durante 5 minutos para favorecer su ruptura y se centrifugaron durante 30 minutos a 13000 rpm, 4°C. Finalmente, se recogió el sobrenadante en alícuotas que se congelaron a -80°C hasta su utilización.

5.2.2. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida “Blue Native”

Los geles nativos en gradiente de poliacrilamida, descritos por primera vez por Schägger en 1991 [76], permiten la resolución electroforética de complejos proteicos formados por más de una proteína. Esta metodología se puso a punto en 1996 para separar los complejos que integran la cadena de transporte electrónico [77].

Existen dos tipos de gradientes para la formación de los geles de *Blue Native-PAGE*, del 5 al 13% y del 3 al 13%, siendo este último el que se utilizó en este proyecto para la resolución de SCs. Para la preparación de dichos geles se utilizó el sistema *Mini Protean III* de *Biorad* con dos cristales (uno de 10,1 x 8,3 cm y otro de 10,1 y 7,3 cm) y espaciadores unidos al cristal más alto de 1,5 mm.

Para la preparación de estos geles fueron necesarias unas disoluciones cuya descripción se detalla en *Anexo I*.

Para la preparación del gel en gradiente lineal del 3% al 13%, se utilizó un formador de gradientes de metacrilato (compuesto por dos cámaras conectadas entre sí) conectado a una bomba peristáltica de una sola vía, que bombea la disolución hasta la abertura superior entre los cristales. Una vez preparadas las mezclas de gel del 3% (5 ml) y del 13% (3.33 ml) de acrilamida (ver *Anexo I*), se vertieron en las cámaras del formador de gradientes, de forma que mientras la mezcla del 13% tenía salida directa hacia los cristales, la mezcla del 3% se conectaba (mediante una llave) con la cámara que contenía la mezcla del 13%. Además, en la cámara que contenía la mezcla del 13% se introdujo un pequeño imán, para que la disolución se mezclase continuamente, y el formador de gradientes se colocó sobre una placa agitadora que hacía girar dicho imán.

Una vez vertidas ambas mezclas en sus respectivas cámaras, se puso en marcha la bomba peristáltica. Cuando la mezcla de 13% hubo avanzado unos 3 cm del recorrido hasta los cristales (1 ml, aproximadamente) se abrió la llave que comunicaba ambas cámaras para que empezase a formarse el gradiente. El imán de la cámara de salida mezclaba las soluciones de acrilamida conforme estas entraban en contacto.

Una vez vertido el gel entre los cristales, se detuvo su bombeo y se añadió una fina capa de isopropanol para evitar la formación de menisco en el gel. En este momento se dejó polimerizar el gel. Cuando hubo polimerizado, se eliminó el isopropanol, se lavó con agua, se cubrió con tampón de BN 1x, se tapó con film de plástico y se mantuvo a 4° C hasta el día siguiente.

Al día siguiente, antes de iniciar la electroforesis, se sacó el gel de la cámara fría y, una vez atemperado, se retiró el tampón 1x que lo cubría y se vertió el gel de

apilamiento (*stacking*) del 5% de acrilamida. Rápidamente, se introdujo el peine y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Para la preparación de 3 ml de gel stacking se mezclaron:

- 0,250 ml de la disolución stock de acrilamida-bisacrilamida
- 1,0 ml de tampón de BN 3x
- 1,75 ml de agua destilada
- 3 µl de TEMED
- 25 µl de APS 10%

Tras montar el gel en el soporte adecuado, en la cámara fría, se añadieron los tampones del cátodo A y del ánodo y se limpiaron los pocillos. Las mitocondrias permeabilizadas con digitonina, se mezclaron con 1/3 de su volumen de tampón de carga (Blue G 5%) y se cargaron en el gel. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 100 V hasta que las muestras hubieron entrado completamente en el gradiente del gel (~30 minutos). En ese momento, se limitó la corriente a 300 V y 15 mA, y se mantuvo así hasta que el colorante azul llegó hasta el final del gel. Transcurridos otros 30 minutos desde, se cambió el tampón del cátodo A por el B para poder apreciar mejor las bandas de los complejos proteicos a lo largo del recorrido electroforético.

5.2.2.1. Determinación de la actividad del complejo I en gel

Una vez finalizada la electroforesis se preparó una disolución de Tris-HCl 0,1 M pH 7,4, NADH 10 mM y NBT 1 mg/ml, que se vertió sobre el gel para observar la actividad del complejo I, que se pone de manifiesto por la aparición de un precipitado azulado en la banda correspondiente.

5.2.3. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares

Para cada línea celular se recogieron 3×10^6 o 10×10^6 células y se lavaron con 1 ml de PBS. Posteriormente, se les añadió 60 µl de tampón de lisis 1X para la extracción de proteínas citoplasmáticas (Triton-X-100 al 1%, *Sigma*; NaCl 150 mM, *Merck*; Tris/HCl 50 mM pH 7,6, *Sigma*; glicerol 10% v/v, *Scharlau*; EDTA 1 mM, *Sigma*; ortovanadato sódico 1 mM, *Sigma*; pirofosfato sódico 10 mM, *Sigma*; leupeptina 10 µg/ml, *Sigma*; fluoruro de sodio 10 mM, *Sigma*; fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, *Sigma*) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. A continuación, los lisados se centrifugaron 20 minutos a 14000 rpm en un rotor *FA 45-30-11 (Eppendorf)* a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo sobre el que se añadió 30 µl de tampón de carga 3X

(Tris/HCl 150 mM pH 7,4, *Sigma*; 3% dodecilsulfato de sodio, SDS, *Merck*; molibdato de Sodio 0,3 mM, *Sigma*; pirofosfato de sodio 30 mM, *Sigma*; fluoruro de sodio 30 mM, *Sigma*; glicerol 30% v/v, *Scharlau*; 2-β-mercaptoetanol 30% v/v, *Sigma*; azul de bromofenol 0,06% p/v). Estos lisados celulares se calentaron a 100°C durante 5 minutos en un baño seco (*Selecta*) para ser cargados en los geles de electroforesis o bien fueron conservados a -20°C para su uso posterior.

5.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS se realizó en geles verticales discontinuos de 0,2 mm de espesor, compuestos por dos tipos de geles de la misma composición pero en distinta proporción: gel de *stacking* (gel superior, de alrededor de 2 cm de longitud) y gel separador o “*resolving gel*” (gel inferior, de alrededor de 10 cm de longitud). La composición de los geles se recoge en *Anexo 1*.

Las electroforesis se realizaron en cubetas de *Hoefler miniVE (GE Healthcare)* en un tampón de carrera de electroforesis de la siguiente composición: Trizma 19 mM (*Sigma*), glicina 192 mM (*Panreac*), 0,01% SDS (*Merck*). Los lisados celulares, una vez hervidos, se centrifugaron 60 segundos a 12000 rpm a temperatura ambiente antes de cargarlos en el gel concentrador. También se aplicó una muestra de marcador de pesos moleculares (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*). La electroforesis se realizó a 180 V y 20 mA durante 90 minutos.

5.2.5. Transferencia de proteínas a membranas

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de polivinil difluoruro (PVDF) (*Amersham Hybond™-P, GE Healthcare*) según el método descrito previamente [78], salvo por activación previa de la membrana en metanol durante 2 minutos. La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca (*BioRad*) a 20 V y 400 mA durante una hora en tampón de transferencia (Tris/HCl 48 mM pH 8,3, *Sigma*; glicina 39 mM, *Sigma*; 0,0373% SDS, *Merck*; 20% metanol grado HPLC, *Panreac*).

5.2.6. Análisis de proteínas mediante inmunoblot (Western-Blotting) y detección de los inmunocomplejos

Las membranas de PVDF con las proteínas celulares fijadas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en tampón B (Tris/HCl 10 mM, pH 8, *Sigma*; NaCl 0,12 M, *Sigma*; Tween-20 0,1%, *Sigma*; timerosal, *Merck* 0,1 g/L) durante al menos 30 minutos. Después de esto, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante varios lavados con tampón B.

La incubación con el anticuerpo primario correspondiente (ver *Anexo I*), se llevó a cabo diluyéndolo en una disolución de tampón B con un 2% de leche en polvo, a 4°C con agitación durante toda la noche. Pasado este tiempo, se le realizaron varios lavados a la membrana con tampón B. El anticuerpo secundario (anti IgG de ratón o de conejo conjugado con peroxidasa de rábano) se diluyó a una proporción de 1:5000, 1:10000 o 1:20000 (en función de la eficiencia del anticuerpo primario) en 2% de leche desnatada en polvo disuelta en tampón B y se incubó la membrana con él durante una hora. Finalmente, se eliminó esta última disolución y se procedió a varios lavados con tampón B antes de la detección de los inmunocomplejos.

La detección de la proteína de interés se realizó mediante la reacción de la enzima peroxidasa de rábano, conjugada al anticuerpo secundario, al entrar en contacto con el luminol como sustrato quimioluminiscente (*Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific*). La membrana se incubó durante dos minutos con el sustrato quimioluminiscente y la luz emitida en dicha reacción se detectó, tras envolver la membrana en film transparente de plástico, exponiendo dicha membrana sobre una película fotográfica (*High performance chemiluminescence film, GE HealthCare*) en oscuridad, dentro de un cassette de revelado radiológico (*Hypercassette™, Amersham Bioscience*). El tiempo de exposición de la película a la membrana osciló entre 30 segundos y varios minutos. Las películas se revelaron, tras la exposición, mediante inmersión en soluciones de revelador - agua destilada - fijador, variando el tiempo en solución de revelador según la señal obtenida. La preparación de las soluciones de revelador (*Sigma*) y fijador (*Kodak*) se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se utilizó como control de carga inmunoblots anti- β -actina sobre las mismas muestras, siguiendo el mismo protocolo. La β -actina es una proteína estructural, abundante en todos los tipos celulares. Para el caso de la detección de los complejos respiratorios, se utilizó alternativamente el complejo II como control de carga, dado que

todas sus subunidades son de origen nuclear y por tanto su expresión no está condicionada por el estado de la mitocondria.

5.3. Medidas de la actividad enzimática

Las actividades enzimáticas de la citrato sintasa (CS) y de los complejos I, I+III, II, II+III y IV se evaluaron en mitocondrias de la línea celular L929dt, derivada de fibroblasto de ratón, y su línea celular parental de control L929. Estas mitocondrias fueron extraídas tal como se describe en el apartado 5.2.1, se resuspendieron en medio MAITE (sacarosa 25 mM; sorbitol 75 mM; KCl 100 mM; EDTA-Na 0,05 mM; MgCl₂ 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,4 y Fosfato Potásico 10 mM, pH=7,4) y se congelaron rápidamente en N₂(l) para favorecer la ruptura de las membranas y la entrada de sustratos, antes de almacenarlas a -80°C. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible UV 500 (Unicam) termostatzado mediante un sistema Peltier PCB150 de DBS y los datos se registraron utilizando el software Vision 32.

La fórmula que se usó para calcular las actividades, en UI, fue la siguiente:

$$UI = \frac{\frac{\Delta Abs}{min} \cdot 10^3 (\mu M / mM) \cdot Dilución}{\epsilon (mM^{-1} cm^{-1}) * L(cm)}$$

- $\Delta A/min$: variación de la absorbancia por minuto
- ϵ : coeficiente de extinción molar
- L : anchura del paso de luz (1 cm)
- UI : micromoles de sustrato transformados en un minuto

Para calcular la actividad enzimática específica, se dividió UI entre la cantidad de proteína de cada línea celular, obtenida con anterioridad por el método de Bradford.

5.3.1. Medida de la actividad de la citrato sintasa

La actividad citrato sintasa se mide por el incremento de la absorbancia a 412 nm producido por la formación de la forma aniónica del DTNB (Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), Sigma) ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras añadir 250 μ moles de oxalacetato (OAA) como iniciador de la reacción. La medida se lleva a cabo a 30°C durante 2 minutos.

Preparación de reactivos:

- Tampón de medida: Tris-HCl 10 mM, pH=8

- Acetil-CoA: 7mg/ml en agua destilada
- DTNB: 1 mM en tampón de medida
- OAA: 50mM en agua destilada
- Tritón X-100: al 10 %, en agua destilada

La mezcla de reacción se preparó como se indica en *Anexo 1*.

5.3.2. Medida de la actividad del complejo I

La actividad de complejo I se midió como la disminución de la absorbancia a 340 nm que se produce debido a la oxidación del NADH ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por parte de la preparación mitocondrial. Para descartar la acción de otras NADH deshidrogenasas, la muestra se inhibe con rotenona y se registra la disminución de su absorbancia. En este caso, la $\Delta A/\text{min}$ es igual a la diferencia entre las actividades en ausencia y presencia de rotenona ($(\Delta A/\text{minuto})_{\text{CI}} = (\Delta A/\text{minuto})_1 - (\Delta A/\text{minuto})_{\text{rot}}$). La medida se lleva a cabo a 30°C durante 4 minutos.

Preparación de reactivos:

- Buffer C1/C2: 25 mM fosfato potásico (K_2HPO_4), 5 mM MgCl_2 , 3 mM KCN, 2,5 mg/ml BSA. Ajustar el pH a 7,2
- NADH: 13 mM en H_2O
- UQ₁: 10 mM en etanol
- Antimicina A: 1 mg/ml en etanol
- Rotenona: 500 μM en etanol

Para la *preparación de la muestra*, se tomó una alícuota de 40 μl de suspensión de mitocondrias, se añadieron 160 μl de buffer C1/C2 y se incubó durante 5 min a T^a ambiente. Después se centrifugó la muestra durante 10 min a 13000 rpm en una microfuga. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 80 μl de buffer C1/C2. Tras incubar 5 min a T^a ambiente, se procedió a medir la actividad del complejo I.

La mezcla de reacción se preparó como se indica en *Anexo 1*.

Tras registrar la disminución de absorbancia durante 4 minutos, se añadieron 6 μl de rotenona 500 μM , se incubó la mezcla un par de minutos y se volvió a medir la actividad de igual manera que antes.

5.3.3. Medida de la actividad de los complejos I+III

En el ensayo para medir la actividad de los complejos I+III se siguió la reducción del citocromo c por parte de la preparación de mitocondrias al añadir NADH como sustrato de la reacción, como aumento de la absorbancia a 550 nm ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La reacción se llevó a cabo durante 2 minutos a 30°C.

Preparación de reactivos:

- Buffer C1/C2 (*apartado 5.3.3*)
- KCN: 10 mM en agua
- Citocromo c oxidado: 1mM en agua
- NADH: 1 mM en agua

La *mezcla de reacción* se preparó como se indica en *Anexo 1*.

Opcionalmente se inhibió la reacción con Antimicina A. Para ello, se añadieron 10 μl de antimicina A (1 mg/ml en etanol) y se incubó la mezcla durante 3 minutos aprox. antes de realizar la medida de absorbancia.

5.3.4. Medida de la actividad del complejo II

La actividad de complejo II se midió como el incremento de la absorbancia a 600 nm que se produce debido a la reducción del diclorofenol-indofenol ($\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por la preparación mitocondrial. La actividad succinato deshidrogenasa se registró durante 4 minutos a una temperatura de 30°C.

Preparación de reactivos:

- Buffer C1/C2 (*apartado 5.3.3*)
- DCPIP: 5 mM
- Succinato: 1M
- UQ₁: 10 mM en etanol
- Antimicina A: 1 mg/ml en etanol
- Rotenona: 500 μM en etanol

Preparación de la muestra: la muestra se preparó de la misma forma que en el *apartado 5.3.3*. La *mezcla de reacción* se preparó como se indica en *Anexo 1*.

5.3.5. Medida de la actividad de los complejos II+III

De forma similar al ensayo para medir la actividad de los complejos I+III se siguió la reducción del citocromo c como aumento de la absorbancia a 550 nm ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), cuando se añadió succinato como sustrato de reacción. Para que la señal registrada represente exclusivamente a la actividad II+III se inhibió la actividad del complejo I con rotenona. La reacción se llevó a cabo durante 2 minutos a 30°C.

Preparación de reactivos: los reactivos fueron los mismos que en el caso de la medida de CI+III a excepción del sustrato:

- Succinato: 30 mM en agua (8,1 mg/ml)
- Rotenona: 500 μM en etanol

La *mezcla de reacción* se preparó como se indica en *Anexo 1*.

La inhibición con antimicina A se llevó a cabo de igual forma que en el *apartado 5.3.4*.

5.3.6. Medida de la actividad del complejo IV

La actividad citocromo c oxidasa (COX) se mide como disminución de la absorbancia a 550 nm debido a la oxidación del citocromo c reducido ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La reacción se siguió durante 2 minutos a 38°C.

Preparación de reactivos:

- Buffer KP, 100 mM pH=7: para preparar 100 ml de tampón se añadieron 38,5 ml de K_2HPO_4 100 mM y se completó el volumen con KH_2PO_4 100 mM, ajustando el pH.
- Citocromo C reducido 1% (10 mg/ml). El citocromo c se disolvió en tampón fosfato potásico 0,1 M pH=7 a una concentración de 10 mg/ml. A continuación, se añadió una punta de espátula de ditionito sódico y se mezcló con ayuda de un vórtex. La reducción completa del citocromo c se midió a 550 nm ($\text{Abs } 550 \text{ nm} = 2,0 \pm 0,1$). El citocromo c reducido se mantuvo al menos 30 minutos en hielo antes de su uso.

La *mezcla de reacción* se preparó como se indica en *Anexo 1*.

5.4. Medida de la funcionalidad OXPPOS

5.4.1. Electrodo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en un electrodo tipo Clark termostatzado (*Oxytherm, Hansatech Instruments*) compuesto por un cátodo de platino (Pt) y un ánodo de plata-cloruro de plata (Ag-AgCl), inmersos en una solución de cloruro potásico saturado al 50% y separados por una membrana de teflón permeable al oxígeno. Sobre la pieza que contiene los electrodos se coloca una pieza que incluye la cámara de reacción rodeada por otra cámara termostatzada que mantiene la reacción a la temperatura deseada, en nuestro caso 37°C. La cámara se cierra con un émbolo provisto de una abertura capilar en su centro para permitir la salida de aire y la adición de los reactivos durante el experimento. El contenido de la cámara de reacción se mantiene constantemente con agitación magnética. Los datos obtenidos en cada experimento se registraron en un PC con el programa *Oxygraph Plus VI.00* de *Hansatech Instruments*.

Antes de empezar cada sesión de trabajo con el electrodo, se fijó la temperatura del *Oxytherm*, a 37°C y se calibró el aparato estableciendo el cero mediante adición de un agente oxidante como el ditionito de sodio. La adición de sustratos se realizó usando jeringas Hamilton de 10 o 25 µl. Después de cada medida, la cámara de reacción se lavó con agua y con albúmina sérica bovina, (BSA) al 10%, para eliminar los restos de inhibidores.

5.4.2. Medida de respiración endógena y desacoplada en células intactas

La respiración endógena consiste en la capacidad de las células de producir oxígeno en estado basal. Cuando se desacopla el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP, se obtiene la tasa de respiración máxima. Esto se consigue mediante la adición de un desacoplante, que rompe el gradiente electroquímico de la membrana interna mitocondrial y las células se ven forzadas en contrapartida a bombear el mayor número de H⁺ posibles para tratar de restablecer el gradiente.

Preparación de reactivos:

El dinitrofenol (DNP) usado como desacoplante se preparó a una concentración de 6.5 mM. Para preparar 10 ml, se pesaron 12 mg de DNP (184,1 g/mol) y se disolvieron en 4 ml de NaOH 1M. La mezcla se calentó durante 20 minutos a 50°C y se ajustó su pH a 7,0 añadiendo HCl 1M (aprox. 3 ml). El volumen final se ajustó a 10 ml con H₂O, se

alicuotó y se congeló a -20°C . El KCN usado como inhibidor se preparó a una concentración de 400 mM en agua.

Procedimiento experimental:

Para las medidas de respiración endógena, se utilizaron 5×10^6 células para cada medida. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo completo (5×10^6 cél/ml) y se introdujeron en la cámara del electrodo para registrar su tasa de respiración endógena, es decir, cuando la respiración está acoplada a la síntesis de ATP. Transcurridos 2-3 minutos, se añadieron 10 μl de una solución de DNP 6,5 mM, para desacoplar la cadena respiratoria y detectar la máxima capacidad OXPHOS de las células. Transcurridos otros 2-3 minutos, se añadieron 10 μl de KCN 400 mM para inhibir el consumo de oxígeno asociado a la cadena de transporte electrónico.

5.4.3. Curvas de crecimiento

Para determinar la velocidad de crecimiento celular en glucosa (Glu) y galactosa (Gal) se hicieron curvas de crecimiento en las que se evaluó el tiempo de duplicación celular en cada uno de los medios utilizados. La Gal debe transformarse en glucosa-6-fosfato para entrar en glucólisis y poder metabolizarse en las células; sin embargo, la tasa de conversión Glu-Gal es lenta, por lo que la glucólisis se ve ralentizada. Para contrarrestar esto, las células tumorales son forzadas a cambiar su metabolismo glucolítico hacia OXPHOS y así obtener más rendimiento (en forma de ATP) de la menor Glu entrante. Si las células ensayadas poseen defectos en la mETC, su crecimiento en presencia de Gal se verá disminuido.

En este experimento, se utilizaron placas de microcultivo de 12 o 6 pocillos y, en ocasiones, placas de Petri de 60 mm para los últimos días del estudio. Se sembraron 5 pocillos o placas con 5×10^4 células de las líneas L929 y L929dt en Glu (4,5 g/l) o Gal (0,9 g/l). A las dos horas de haber realizado la siembra, tiempo óptimo para asegurar que las células se hubiesen adherido a la placa, se tripsinizó un pocillo de cada uno de los medios y se procedió al recuento celular para poder estimar el número de células pegadas a tiempo cero. El proceso de tripsinización y recuento se realizó de igual forma cada 24 horas y el medio de las placas restantes fue cambiado por medio fresco cada 48 horas hasta finalizar el experimento a las 96 horas.

Para calcular el tiempo de duplicación celular o tiempo de doblaje, se representó en una gráfica el número de células frente al tiempo transcurrido y se ajustó a una curva exponencial del tipo $N = a \times 10^{bt}$, de forma que el tiempo de doblaje se obtuvo utilizando la fórmula: $D_T = \text{Log } 2/b$.

5.5. Determinación de la proliferación celular

Se utilizó el método de Mosmann modificado [79] para determinar la proliferación celular tras tratamiento con dicloroacetato (DCA, *Sigma-Aldrich*), ibrutinib (*Selleckchem*) y LUV-TRAIL. Este último fármaco fue generado y cedido amablemente por el grupo del Dr. Martínez Lostao.

El método de Mosmann modificado relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul formazan insolubles en medio acuoso, producidos por oxidación del MTT (bromuro de dimetil-tiazoliltetrazolio, *Sigma*) preparado como una disolución de 5 mg/ml en PBS. Los resultados de este método dan idea de la disminución de la proliferación celular producida por un estímulo citotóxico que produce inhibición del crecimiento e indirectamente, de la muerte celular.

Las células se cultivaron a una concentración variable (entre 7×10^4 - 3×10^5 en función de la velocidad de crecimiento de cada línea celular) en placas de 96 pocillos de fondo plano y se dejaron crecer en presencia del fármaco correspondiente el tiempo requerido para cada experimento (ver *Resultados*). Una vez finalizado el tiempo de incubación, se añadió a cada pocillo 10 μ l de una disolución de MTT (5mg/ml), preparada en PBS. Las placas se incubaron 2-3 horas a 37°C y se centrifugaron 10 minutos, a 4000 rpm y se eliminó el sobrenadante de los pocillos por inversión rápida. Los cristales de formazan formados se disolvieron añadiendo a cada pocillo 70 μ l de isopropanol y agitando en una placa vibradora (*Bioblock*). Se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas *ELISA MR5000* (*Dynatech*). Como blanco se empleó medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones de la(s) droga(s) respecto al control de células no tratadas.

5.6. Citometría de flujo

Se utilizó la citometría de flujo para observar la inducción de apoptosis, la expresión de los receptores mortales DR4 y DR5, la expresión del MHC-I y la formación de ROS en diversas líneas celulares. El instrumento utilizado fue el citómetro *BD FACSCalibur* (*BD Biosciences*) y los datos obtenidos se procesaron mediante el programa informático *CellQuest Pro*.

5.6.1. Inducción de apoptosis

La exposición de fosfatidilserina es un evento temprano indicador de apoptosis. Para medir la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática se utilizó anexina V (Ann-V), una proteína que se une específicamente a este fosfolípido. La Ann-V está unida a su vez a la molécula fluorescente verde FITC (isotiocianato de fluoresceína, $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}$: 494/518 nm).

Para realizar este marcaje, las células a analizar (al menos 10^5 células) se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadió a cada punto 100 μl de ABB (*Annexin Binding Buffer*) conteniendo 1,5 μl de Ann-V. Las células se incubaron durante 15 minutos en oscuridad, se resuspendieron y se trasvasaron a un tubo de citometría. Por último, se añadieron otros 200 μl de ABB (sin fluoróforos) a cada tubo y se analizaron en el citómetro de flujo.

5.6.2. Expresión de DR4 y DR5 en superficie

Para observar la expresión en superficie de los receptores mortales DR4 y DR5 en varias líneas celulares tras incubación con DCA, se utilizaron los anticuerpos PE-Conjugated Anti-Human DR4 (*eBioscience*), PE Anti-Human CD262 (DR5) (*eBioscience*) y Pierce Mouse IgG1 (PE) Isotype Control (*Thermo Scientific*) como control de isotipo. Después del tiempo de incubación de interés con DCA, se recogieron al menos 10^5 células y se lavaron una vez con PBS + SFB (5%). Seguidamente, se procedió al marcaje de las muestras, utilizando las diluciones que especificaba el fabricante, en PBS + SFB (5%), durante 30 minutos a 4°C. Tras el marcaje, se lavó una vez más con PBS + SFB (5%) y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

5.6.3. Expresión del MHC-I

Para observar la expresión del MHC-I se utilizó un anticuerpo específico anti-H-2K^k (FITC Mouse Anti-Mouse H-2K^k, *BD Biosciences*) para las líneas celulares L929 y L929dt; y un anticuerpo específico anti-H-2K^b (FITC Mouse Anti-Mouse H-2K^b, *BD Biosciences*) para las líneas celulares: EL4, EG7, EL4-p0 y EL4 A6M. Además, se utilizó como control negativo un anticuerpo del mismo isotipo que los anticuerpos de interés marcado con el mismo fluorocromo (FITC Mouse IgG1 k Isotype, *BD Biosciences*).

Para realizar el marcaje de las muestras, se recogieron 10^5 células para cada una de las parejas de cada línea celular y tras centrifugar a 3500 rpm durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante, se lavaron las células con 100 μ l de PBS con SFB al 10%. Se volvió a centrifugar a 3500 rpm durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 μ l de la misma mezcla de PBS y SFB al 10% con el anticuerpo para el marcaje al 2%. Se dejó marcando durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Después de esto, se centrifugó a 3500 rpm durante 2 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó de nuevo con 100 μ l de PBS con SFB al 10%. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y finalmente se adicionaron 300 μ l de PBS con SFB al 10% y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

5.6.4. Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para observar la formación de ROS en el interior celular de las células L929 y L929dt, se utilizaron los siguientes reactivos: dihidroclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, *Invitrogen*), capaz de detectar los niveles de ión superóxido (O₂²⁻) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (entre otros radicales) por la formación de diclorofluoresceína (DCF); y dihidroetidio (DHE, *Life Technologies*), capaz de detectar los niveles de O₂²⁻ por la formación de 2-hidroetidio (2HE).

Para realizar el marcaje de las muestras, se recogieron 10^5 células y tras un lavado con PBS, se incubaron con H₂DCF-DA o DHE a 20 y 2 μ M respectivamente en PBS durante 30 minutos a 37°C. Tras el marcaje, se llevó a cabo un lavado con PBS y se pasaron las muestras por el citómetro de flujo.

5.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos se realizó mediante el programa *StatView 5.0*. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Para encontrar diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) se utilizó el *Post-hoc Fisher's PLSD test*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

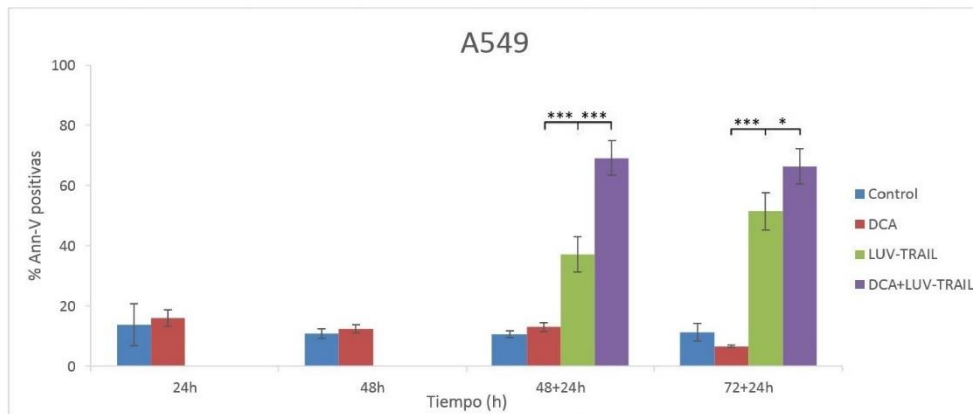
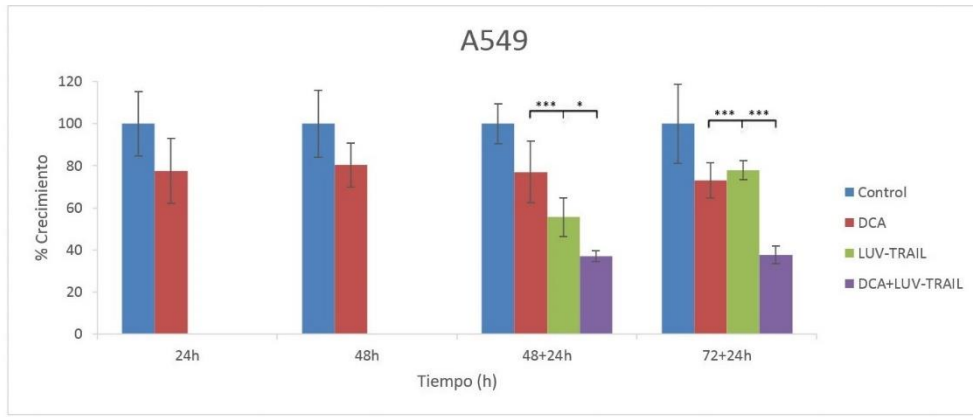
6.1. Efecto sinérgico entre el DCA y LUV-TRAIL

El primer objetivo de este trabajo fue el uso del fármaco de acción metabólica DCA para intentar sensibilizar varias líneas celulares tumorales ante la acción citotóxica de LUV-TRAIL. Para ello, se ensayó la influencia del DCA sobre el crecimiento celular y su capacidad de inducir apoptosis en combinación con LUV-TRAIL en dichas líneas celulares tumorales. Además, se estudió también el cambio en la expresión de c-FLIP, DR4 y DR5 tras incubación con DCA. Estas proteínas están involucradas en la apoptosis inducida por TRAIL, favoreciendo (DR4 y DR5) o inhibiendo (c-FLIP) dicha ruta.

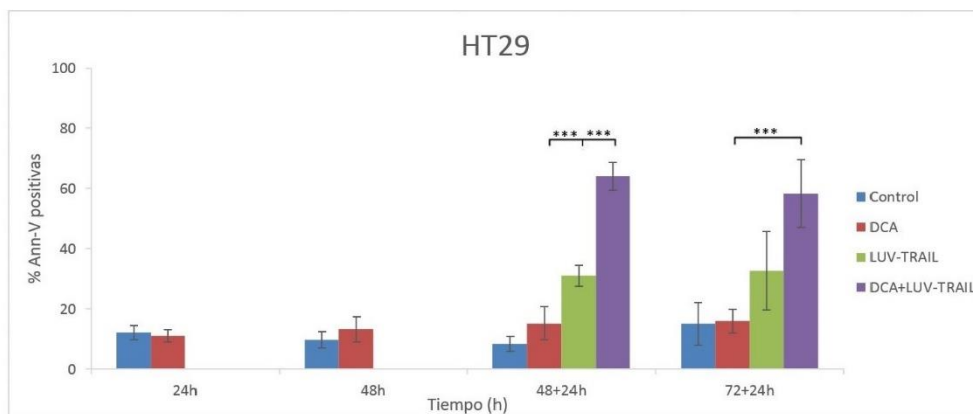
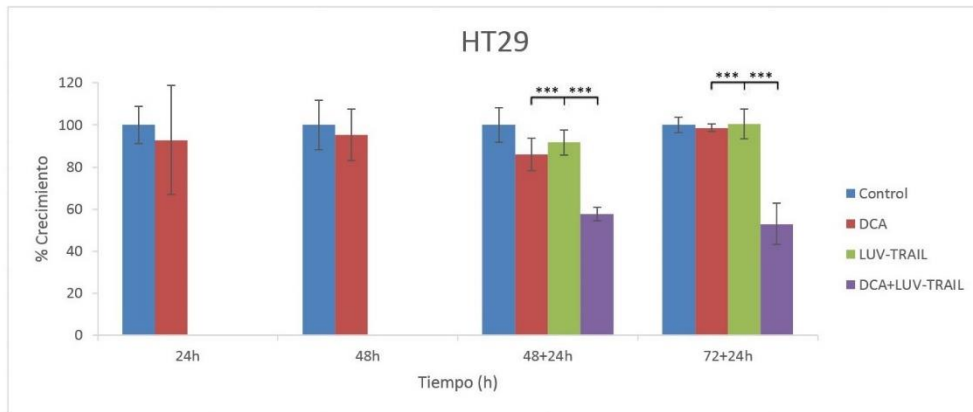
En estos experimentos, se trabajó con las líneas celulares tumorales A549 (pulmón), HT29 (colon), MCF7 (mama) y U266 (mieloma), todas ellas resistentes a la acción de LUV-TRAIL. Para ello, se incubaron estas células a 37°C con DCA entre 24-96 horas, a una concentración de 25 mM. Al cabo de 48 y 72 horas, se adicionó al medio de incubación LUV-TRAIL a una concentración de 1000 ng/ml y se incubó durante 24 horas más. Tras finalizar cada punto experimental, se determinó el crecimiento celular mediante el método de *Mosmann* modificado, y la muerte celular mediante citometría de flujo tras marcaje con Anexina-V-FITC (Ann-V-FITC).

El crecimiento de las líneas celulares está representado como porcentaje de crecimiento de cada una de ellas respecto a las células control en cada tiempo (*Fig. 6.1*). La muerte celular está representada como porcentaje de células Ann-V-FITC positivas (*Fig. 6.1*). En la *Fig. S1* del *Anexo 2* se recogen histogramas representativos de las citometrías de Ann-V-FITC de los puntos correspondientes a las 48+24 y 72+24 horas de incubación para los diferentes tipos celulares empleados.

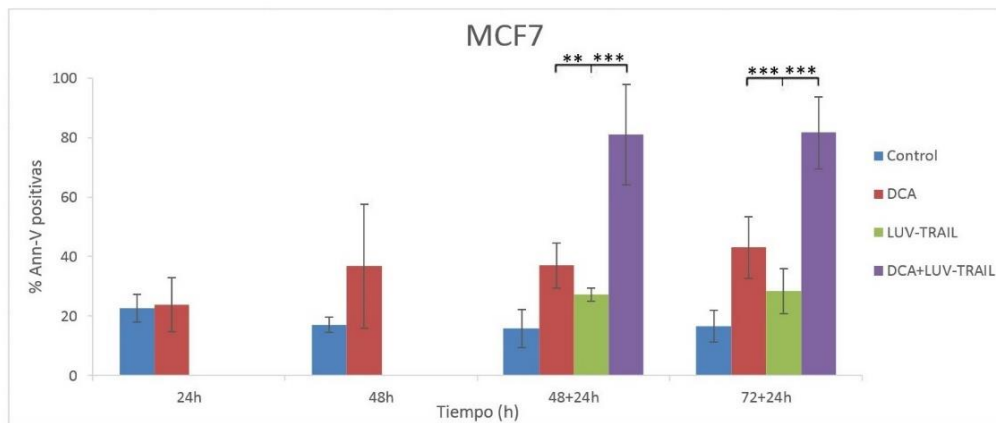
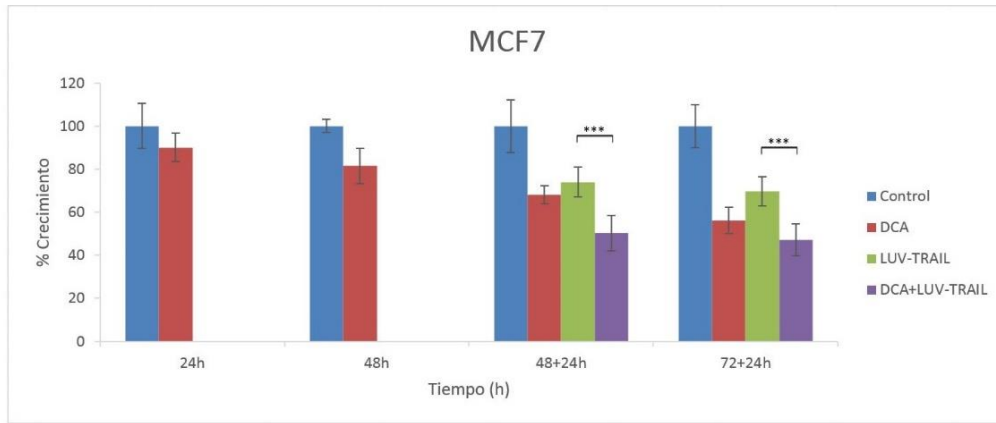
A



B



C



D

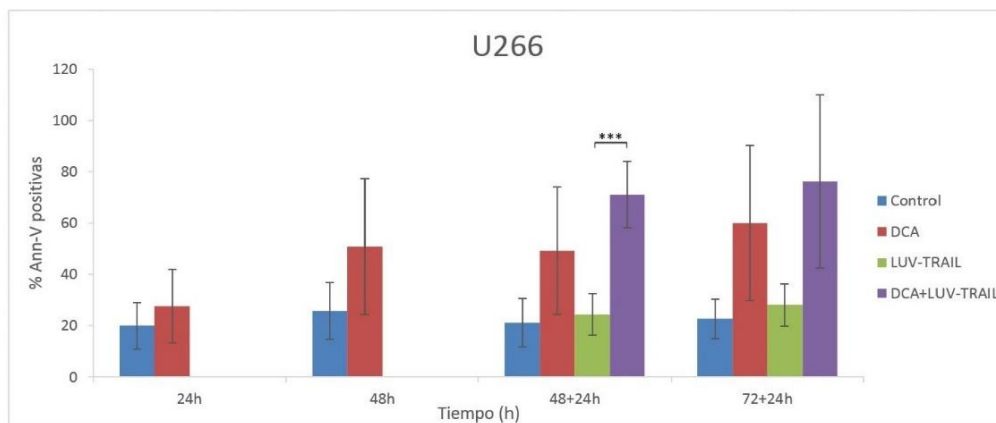
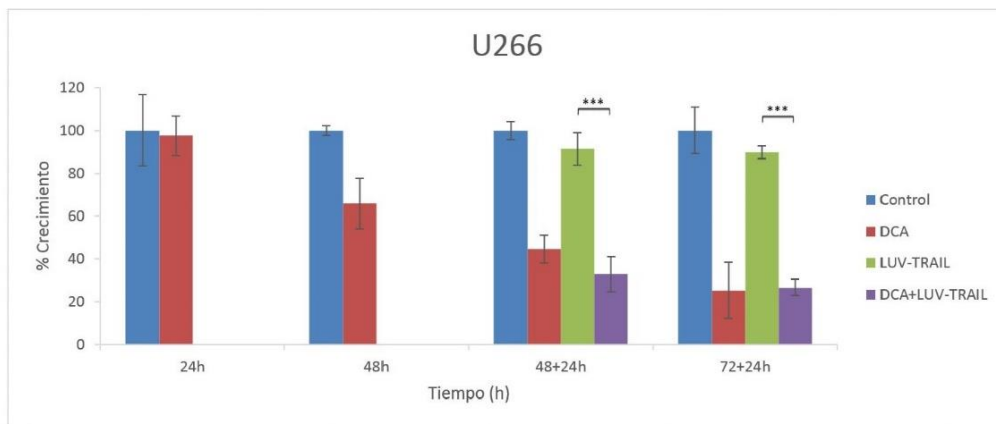


Figura 6.1. Efecto de la combinación de DCA con LUV-TRAIL sobre el crecimiento y la viabilidad celular. Los resultados se muestran como la media +/- desviación estándar de n=4 para las gráficas de crecimiento y n=3 para las gráficas de Ann-V positivas. Las líneas celulares ensayadas fueron: (A) A549; (B) HT29; (C) MCF7 y (D) U266. *p<0,05; **p<0,03; ***p<0,01.

En líneas generales, se puede observar que la acción del DCA es capaz de sensibilizar a las líneas celulares ensayadas a la inducción de apoptosis por parte de LUV-TRAIL. Esta sensibilización se induce ya tras 48 horas de incubación con DCA, siendo los resultados tanto o más significativos que los obtenidos tras la incubación con DCA a 72 horas. Asimismo, el crecimiento celular se ve generalmente disminuido cuando las células se encuentran en presencia de los dos fármacos en comparación con los fármacos en solitario. No se observó ningún efecto del DCA sobre el crecimiento y la viabilidad celular hasta las 48 horas de incubación, de acuerdo con la cinética y el mecanismo de acción *in vitro* descrito para este fármaco [52].

En el caso de las células U266, sin embargo, el efecto antiproliferativo o de inducción de muerte es debido solamente al DCA, y no se puede afirmar que haya habido un efecto sinérgico con LUV-TRAIL.

6.1.1. Efecto del DCA sobre la expresión de c-FLIP, DR4 y DR5

Una vez observado el efecto sinérgico de DCA en combinación con LUV-TRAIL en la apoptosis de las líneas celulares utilizadas, se quiso caracterizar cómo el DCA produce este efecto sensibilizador. Para ello, se determinó el cambio en la expresión de la proteína antiapoptótica de la vía extrínseca c-FLIP mediante *Western-Blot* y la expresión en superficie de DR4 y DR5 mediante citometría de flujo.

Estos experimentos se ensayaron sobre las mismas líneas celulares del apartado anterior. El tiempo de incubación de estas células con DCA se fijó en 48 horas, dado que el efecto sensibilizador del fármaco ya se observa a este tiempo y apenas varía a tiempos más largos de incubación.

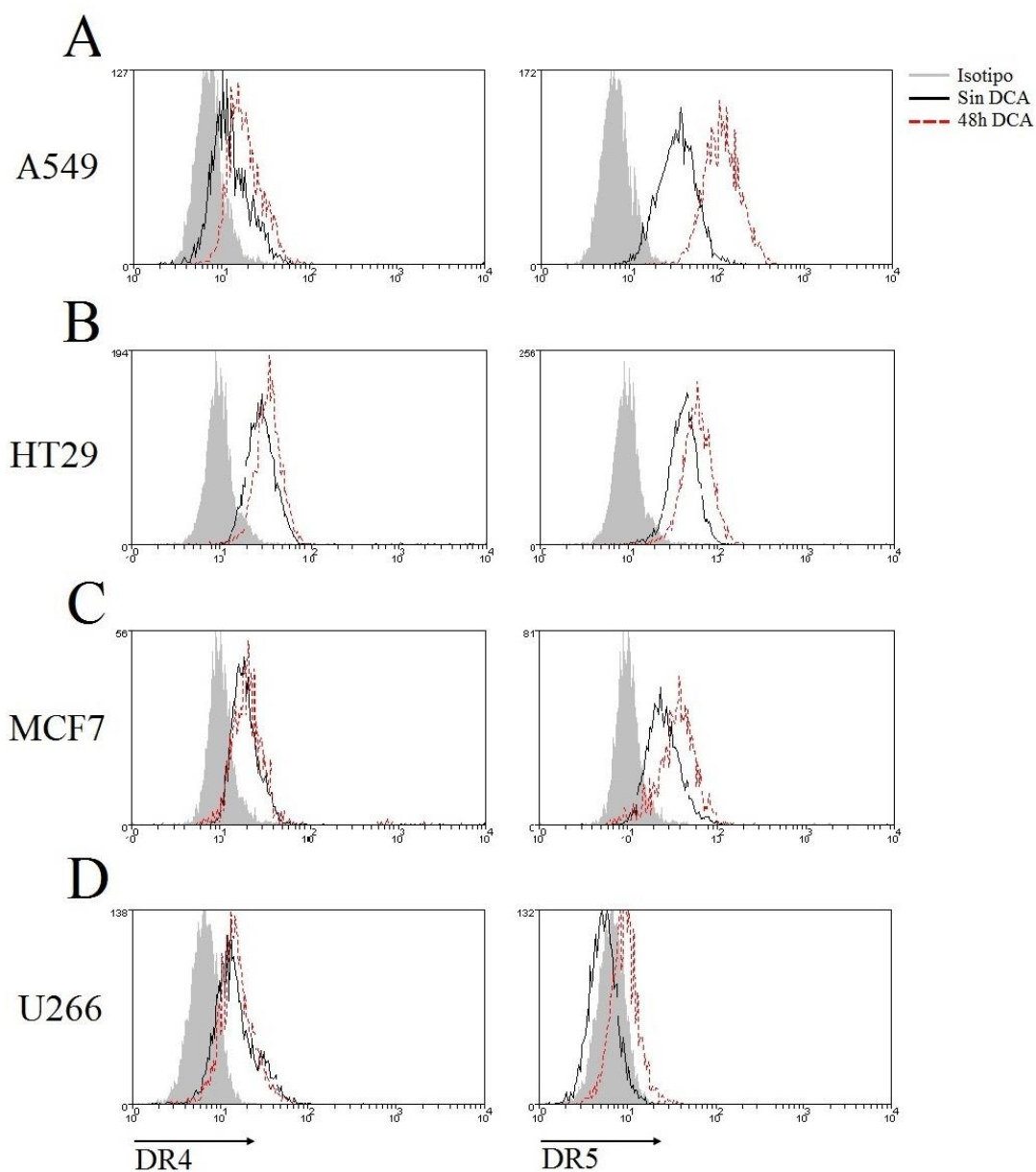


Figura 6.2. Expresión de DR4 y DR5 en superficie. Las células fueron analizadas por citometría flujo en estado basal o tras 48 horas de incubación con DCA. (A) A549; (B) HT29; (C) MCF7 y (D) U266.

Los resultados de las citometrías mostrados en la *Fig. 6.2* indican que el DCA apenas influye en la expresión en superficie de DR4, mientras que la expresión de DR5 se ve aumentada en todos los casos excepto en las células U266, siendo especialmente evidente en las células A549. Este resultado se correlaciona con el hecho de que la línea celular A549 es donde mayor efecto sinérgico se ha observado, mientras que en las células U266 no se puede hablar de efecto sinérgico.

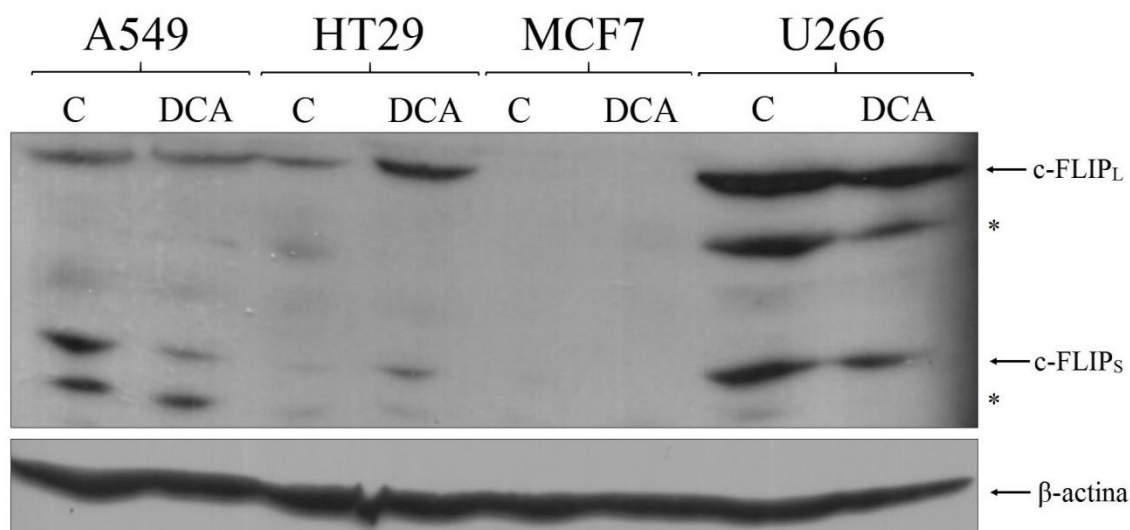


Figura 6.3. Expresión de c-FLIP de las células A549, HT29, MCF7 y U266 mediante *Western-Blotting*. Las células se lisaron en estado basal (C) o tras 48 horas de incubación con DCA a 25 mM (DCA). La posición de c-FLIP_L y c-FLIP_S se indica con flechas. La expresión de β-actina sirvió como control de carga de los lisados en el gel. *, bandas inespecíficas.

En cuanto a la expresión de c-FLIP, el efecto del DCA que se observa es muy variado. Tanto la expresión de c-FLIP_L como de c-FLIP_S disminuye en las células A549 y U266, correlacionando con la hipótesis inicial [68]. Sin embargo, en las células HT29 aumenta, mientras que las células MCF7 no parecen expresar ninguna de estas dos proteínas.

6.2. Efecto sinérgico de la combinación de DCA con ibrutinib

Paralelamente a los ensayos del uso combinado de DCA con LUV-TRAIL, se quiso observar si el DCA podía ejercer citotoxicidad de forma sinérgica con ibrutinib, un fármaco utilizado como tratamiento en diversos cánceres de origen hematológico [69, 70]. Estos ensayos se realizaron sobre las líneas celulares derivadas de mieloma múltiple U266 y MM.1S. Para ello, se realizaron en primer lugar ensayos preliminares para optimizar las concentraciones de ambos fármacos que debían ser utilizados en estos experimentos (datos no mostrados). Se decidió utilizar una concentración de DCA de 10 mM para las células MM.1S y 25 mM para las U266, mientras que para el ibrutinib se fijó la concentración en 10 μM para ambas líneas celulares. Al igual que en los experimentos de DCA + LUV-TRAIL, se ensayó el efecto de estos fármacos sobre el crecimiento y la muerte celular cada 24 horas hasta las 96 horas, mediante el método de *Mosmann* modificado (crecimiento) y citometría de flujo por marcaje con Ann-V-FITC (muerte celular) (*Fig. 6.4*). El fármaco ibrutinib se adicionó a las células tras 48 ó 72 horas de incubación en la placa de cultivo con o sin DCA, y se observó su efecto tras 24 horas adicionales de incubación.

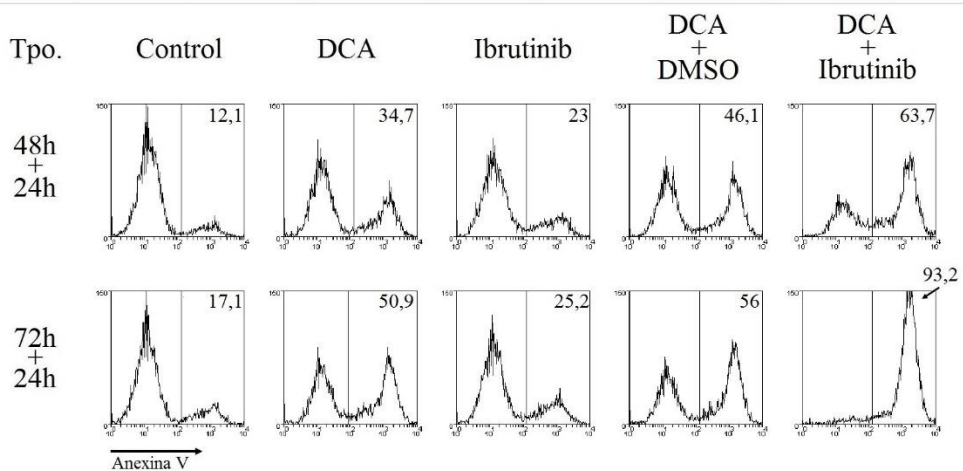
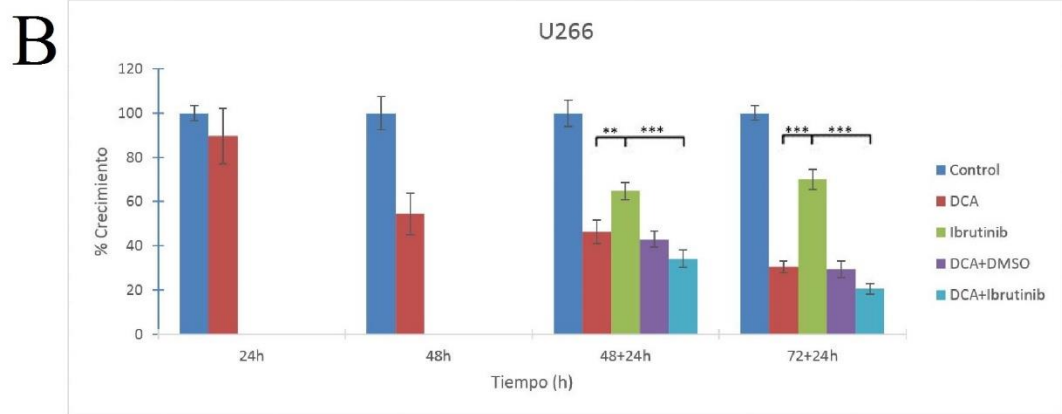
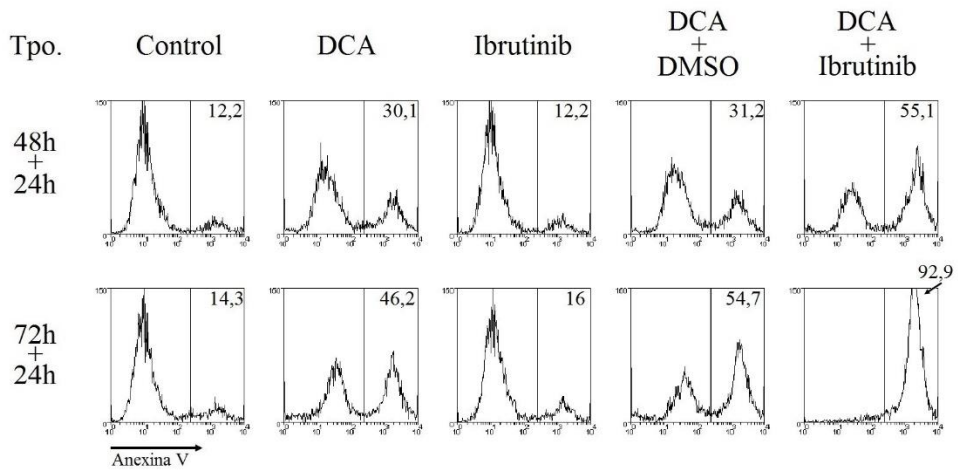
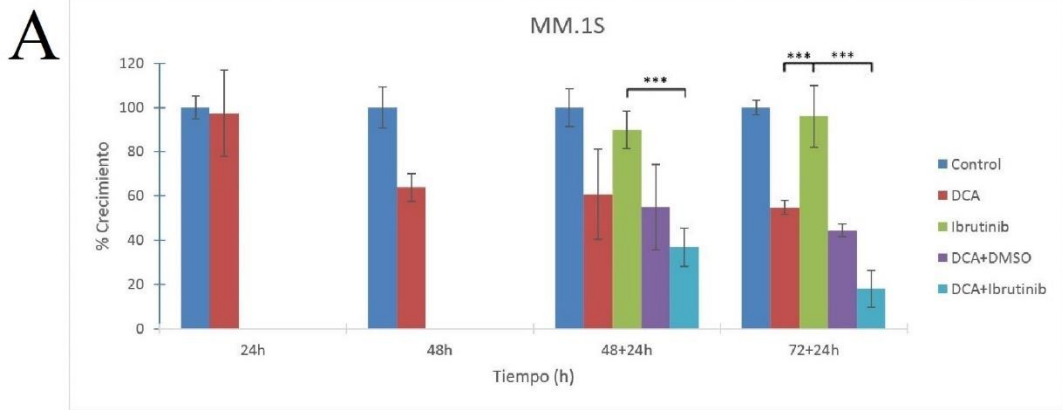


Figura 6.4. Efecto de la combinación de DCA con ibrutinib sobre el crecimiento y la viabilidad celular. Los resultados se muestran como la media +/- desviación estándar de n=4 para las gráficas de crecimiento. La muerte celular se muestra en forma de histogramas representativos de citometría de flujo tras el marcaje de las células con Ann-V-FITC. Las líneas celulares ensayadas fueron: (A) MM.1S y (B) U266. **p<0,03; ***p<0,01.

Tal como se observa en la *Fig. 6.4*, la acción conjunta del DCA con ibrutinib produce un efecto sinérgico tanto antiproliferativo como citotóxico sobre las líneas celulares tumorales ensayadas. Este efecto se observa ya tras 72 horas totales de incubación, si bien se acentúa al dejar actuar el DCA durante 72 horas antes de la adición de ibrutinib. No obstante, serían necesarios más experimentos de la inducción de apoptosis para asegurar estos resultados.

6.2.1. Discusión

El fármaco LUV-TRAIL, generado en nuestro laboratorio, ha demostrado tener un alto efecto citotóxico sobre células tumorales [66, 67], algunas de ellas con resistencia a la apoptosis inducida a través de la vía intrínseca o extrínseca. No obstante, este alto efecto citotóxico no se ha podido reproducir en algunas líneas celulares especialmente resistentes (datos no mostrados). Estudios previos han demostrado que el uso de inhibidores de la glucólisis es capaz de sensibilizar a células tumorales a la acción de ligandos mortales, a través de una disminución de la expresión de c-FLIP [68]. En este trabajo, se ha propuesto el uso del DCA, que reduce el uso de la glucólisis en las células forzando la función OXPHOS, como fármaco sensibilizador para la acción de LUV-TRAIL sobre algunas de estas células.

Los resultados muestran que el DCA sinergiza con LUV-TRAIL la mayor parte de las líneas celulares ensayadas, aumentando la capacidad citotóxica del último. En el caso de las células U266, especialmente resistentes a LUV-TRAIL, el DCA es capaz de ejercer un potente efecto citostático y citotóxico por sí solo. La expresión de c-FLIP disminuye en las células A549 y U266. Sin embargo, su expresión aumenta en las células HT29, mientras que las células MCF7 no lo expresan. Se investigó también la expresión de los receptores de TRAIL DR4 y DR5 en la superficie celular tras la incubación con DCA. Mientras que la expresión de DR4 apenas varía, la de DR5 sí aumenta en todos los casos en los que se observó sinergia.

En relación con esto, ya se ha descrito que LUV-TRAIL induce apoptosis en las células diana principalmente a través de la multimerización de DR5, al menos en la línea celular de linfoma histiocítico U937 [80]. Este hecho concuerda con el aumento de la citotoxicidad observada en este trabajo tras el aumento de DR5 inducido por el DCA, si bien este efecto no es igualmente pronunciado en todas las células ensayadas. La manera en la que el DCA es capaz de alterar la expresión de DR5 no se conoce todavía con certeza. Estudios previos han descrito que la expresión de los receptores mortales de TRAIL pueden ser modulados por el factor de transcripción NF- κ B [81], por lo que podría ser que el DCA, mediante la remodelación metabólica que induce en las células, pudiera afectar la actividad de este factor de transcripción. En este sentido, se ha descrito que la vía OXPHOS favorece la activación de ERK5 [53] y que esta quinasa regula positivamente a NF- κ B [82].

Según los datos obtenidos, el efecto sensibilizador del DCA a la acción de LUV-TRAIL se correlaciona mejor con el aumento en la expresión de DR5, aunque en algunas líneas celulares este efecto puede verse acentuado por la reducción en la expresión de c-FLIP.

En cuanto a los resultados obtenidos con la combinación de DCA con ibrutinib sobre las líneas celulares derivadas de mieloma múltiple ensayadas, se observó también un efecto sinérgico de ambos fármacos. Si bien se ha observado que la acción antitumoral de ambos fármacos es efectiva en las líneas celulares ensayadas, no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual sinergizan. El DCA fuerza a las células tumorales a realizar OXPHOS, en detrimento de la fermentación láctica. Esto permite a las células obtener energía de manera más eficiente, y por tanto disminuir así el consumo de glucosa. Del mismo modo que la privación de glucosa del medio es capaz de alterar los niveles de ciertas proteínas implicadas en la apoptosis de las células [68], es posible que el cambio metabólico desencadenado por el DCA pueda alterar la expresión de otras proteínas que favorezcan la acción del ibrutinib. Además de esto, ya se ha observado que el ibrutinib es un fármaco capaz de sinergizar con otros agentes, tales como inhibidores de la ruta de la PI3K, inhibidores de las proteínas de la familia de Bcl-2 y otros agentes quimioterapéuticos [83]. No obstante, es necesario un mayor conocimiento sobre la acción del DCA en las células ensayadas para caracterizar el efecto sinérgico observado.

6.3. Caracterización de la capacidad respiratoria mitocondrial de la línea celular L929dt e influencia sobre su metabolismo glucolítico

El siguiente objetivo de este trabajo fue el de investigar las posibles causas que pudieran provocar el mayor metabolismo glucolítico que presenta la línea celular L929dt, respecto a la línea celular parental L929 [46]. En primer lugar, se realizaron experimentos preliminares para confirmar el cambio metabólico observado previamente. Seguidamente, investigamos en mayor detalle su capacidad respiratoria. Dado que el principal orgánulo celular cuya función está alterada en este cambio de metabolismo es la mitocondria, evaluamos los posibles cambios que se hubieran podido producir en la vía OXPHOS mitocondrial.

6.3.1. Metabolismo glucolítico de la línea celular L929dt

Para comprobar el aumento en el metabolismo glucídico de la línea celular L929dt, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

6.3.1.1. Tiempo de duplicación en medio de galactosa

El primer paso consistió en medir la tasa de crecimiento de las células L929dt respecto a sus células parentales (L929). Para ello, se incubaron estas células durante 96 horas en presencia de glucosa (Glu) y galactosa (Gal), realizando contajes del crecimiento cada 24 horas. Se representó la curva de crecimiento respecto al tiempo (datos no mostrados) y se calculó el tiempo de duplicación (D_T , horas) tal como se describe en el apartado 5.4.3 (Fig. 6.5).

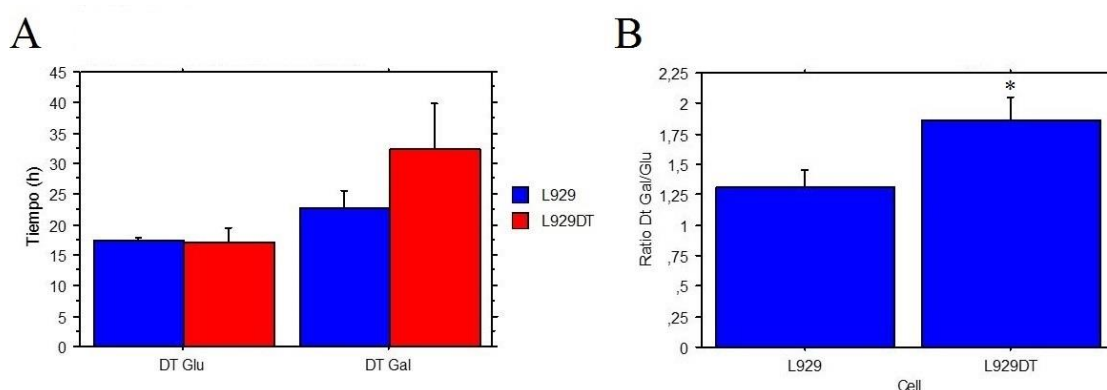


Figura 6.5. Tiempos de duplicación de las células L929 y L929dt, en presencia de (A) Glu, Gal y (B) calculado como el ratio D_T Gal/Glu, expresado como la media \pm desviación estándar de $n=3$ (L929) y $n=2$ (L929dt). * $p<0,05$.

Las gráficas muestran que las células L929dt presentan una mayor dificultad para crecer en presencia de Gal respecto a sus células parentales. Esto implica que su capacidad

de realizar OXPHOS es significativamente menor, y que por tanto muestran una mayor preferencia a realizar la fermentación láctica en lugar de OXPHOS. Dado que el tiempo de duplicación de ambos en presencia de Glu es similar, los resultados en conjunto indican además que el consumo de Glu de las células L929dt es mayor respecto sus células parentales. Este cambio de metabolismo puede estar desencadenado por una reordenación metabólica o alguna mutación que afecte al rendimiento energético de sus mitocondrias.

6.3.1.2. Respiración endógena y desacoplada

El siguiente paso consistió en medir la capacidad respiratoria de estas células. Este experimento se llevó a cabo midiendo el consumo de oxígeno con un electrodo de oxígeno (Fig. 6.6).

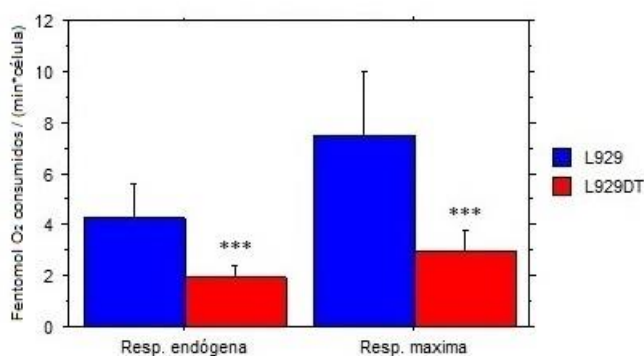


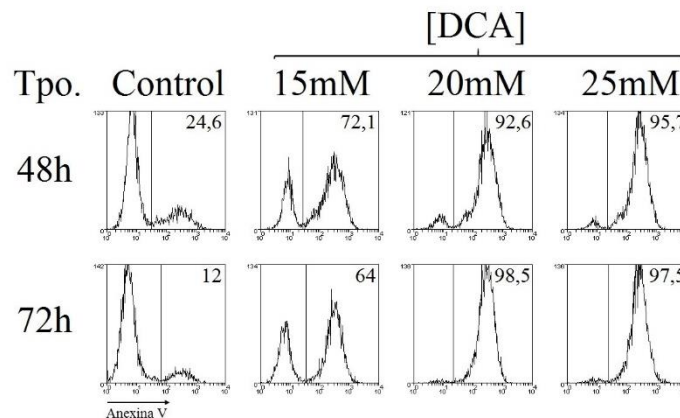
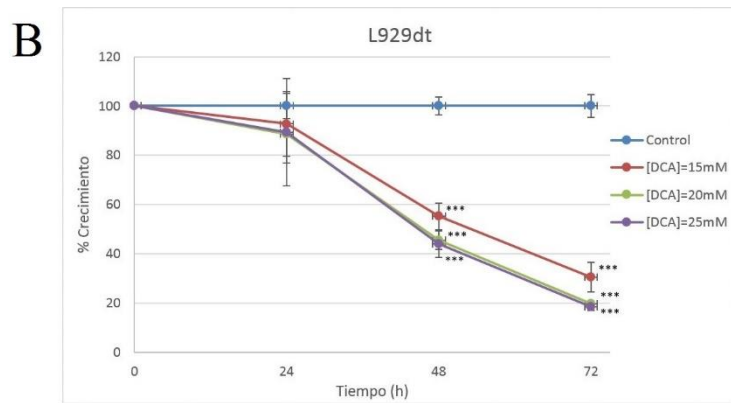
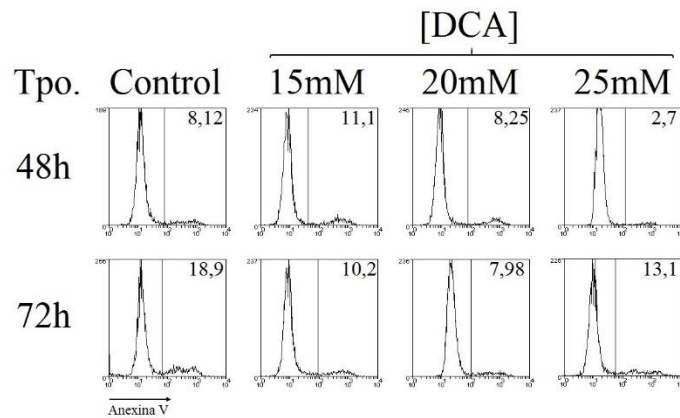
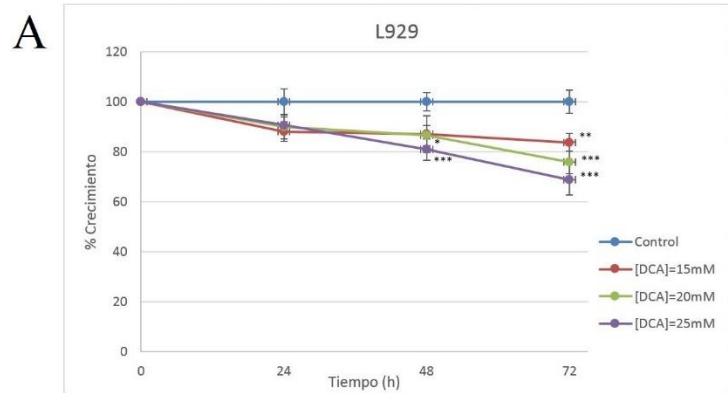
Figura 6.6. Consumo de oxígeno endógeno y desacoplado de las líneas celulares L929 y L929dt. Los datos mostrados corresponden a la media +/- desviación estándar de n=6 (resp. Endógena de L929), n=7 (resp. máxima de L929) y n=8 (L929dt). ***p<0,01.

La línea celular L929dt exhibe una capacidad respiratoria significativamente menor respecto a su línea celular parental, tanto endógena como desacoplada (o máxima). Estos resultados señalan que la remodelación metabólica sufrida por estas células es debida, al menos en parte, a defectos en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC). Estos defectos provocan la salida del piruvato formado en la glucólisis en forma de lactato mediante fermentación, obteniendo un menor rendimiento energético que en la respiración aerobia. Esto provoca en contrapartida un mayor gasto de glucosa para compensar dicha pérdida de rendimiento energético.

6.3.1.3. Efecto del DCA sobre el crecimiento, la viabilidad y la expresión del MHC-I

En vista de los resultados, dado que las células L929dt presentan limitaciones en su capacidad respiratoria, se quiso analizar el efecto del DCA sobre estas células. Para ello, se incubaron estas células y las células parentales en presencia de DCA a concentraciones entre 15-25 mM, de 24 a 72 horas y se observó su efecto sobre el crecimiento y viabilidad celular, así como sobre la expresión del MHC-I [46]. Para

obtener el valor numérico de la expresión del MHC-I en cada punto, se calculó la diferencia entre la intensidad media de fluorescencia del H-2K^k y el isotipo (ver Anexo 2).



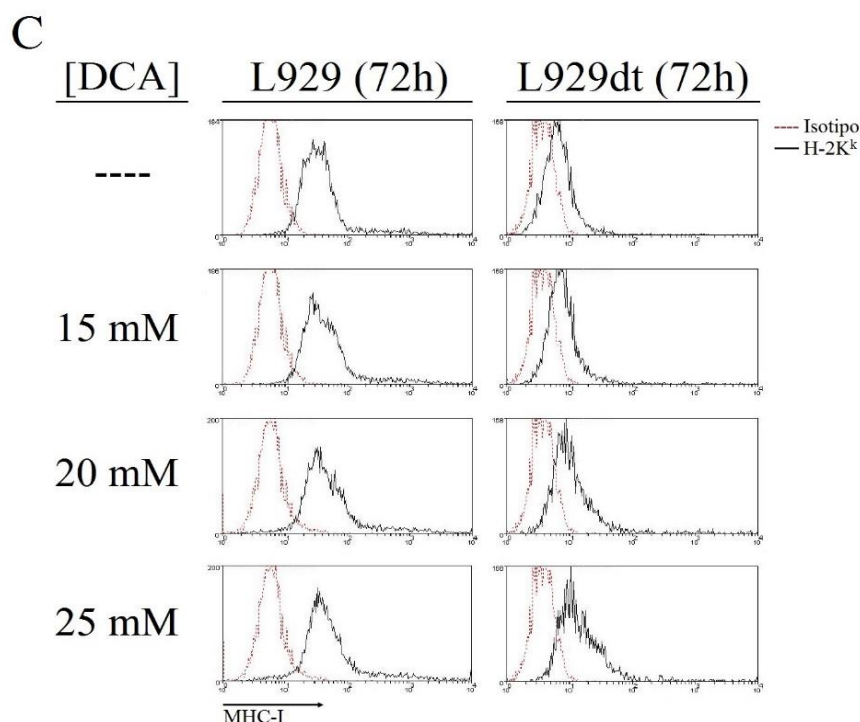


Figura 6.7. Análisis de la influencia del DCA a varias concentraciones sobre el crecimiento, viabilidad y expresión del MHC-I en las células L929 y L929dt. Los resultados de los MTT se muestran como la media +/- desviación estándar de n=4. La muerte celular se representa en los histogramas obtenidos por citometría de flujo tras marcaje con Ann-V-FITC, siendo el valor numérico de cada uno el porcentaje de muerte. La expresión del MHC-I se representa en los histogramas obtenidos por citometría de flujo por marcaje con un Ab-anti-H-2K^k. (A) Crecimiento y muerte de las células L929; (B) Crecimiento y muerte de las células L929dt; (C) Expresión del MHC-I de las células L929 y L929dt. *p<0,05; **p<0,03; ***p<0,01.

Las células L929dt presentan una alta sensibilidad a la acción citostática y citotóxica del DCA en comparación con sus células parentales, observándose este efecto incluso a concentraciones bajas (*Fig. 6.7 A,B*). Además de esto, el DCA es capaz de inducir un claro aumento en la expresión del MHC-I en las células L929dt que habían perdido su expresión (*Fig. 6.7 C y Tabla S12, en Anexo 2*), confirmando datos anteriores [46]. El DCA es capaz de inducir apoptosis en aquellas células que poseen un sistema OXPHOS deteriorado [52], por lo que estos resultados, junto con los de los apartados anteriores, afirman que las células L929dt poseen defectos en la mETC.

6.3.2. Funcionalidad de los complejos respiratorios

Tras comprobar el mayor metabolismo glucolítico de esta línea celular en los experimentos anteriores, se quiso caracterizar en mayor detalle los defectos existentes en la mETC.

6.3.2.1. Expresión y asociación de los complejos respiratorios

Se extrajeron las mitocondrias de las líneas celulares L929 y L929dt y se llevó a cabo una electroforesis en gel nativo de poliacrilamida “Blue Native” (BNGE). Este tipo de electroforesis permite no sólo separar los complejos respiratorios libres sino también observar su asociación en forma de supercomplejos (SCs) [35]. Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF y se realizaron *immunoblots* para los complejos I-IV (Fig. 6.8). Las bandas correspondientes al CII, el cual es incapaz de formar SCs, sirvieron como control de carga dado que las proteínas que forman este complejo son todas de origen nuclear.

Adicionalmente, se calculó el porcentaje de aumento o disminución del ensamblaje de cada una de las especies de complejos y SCs obtenidos para la línea celular L929dt en comparación con las L929 por densitometría. Para ello, Se obtuvieron las intensidades de todas las bandas utilizando el *software* informático *ImageJ*, y se normalizaron dividiéndolas entre la intensidad de banda del CII. Finalmente, se calcularon los porcentajes de variación de la intensidad de cada banda de la línea celular L929dt comparada con la de las L929 (ver *Tabla S13*, en *Anexo 2*).

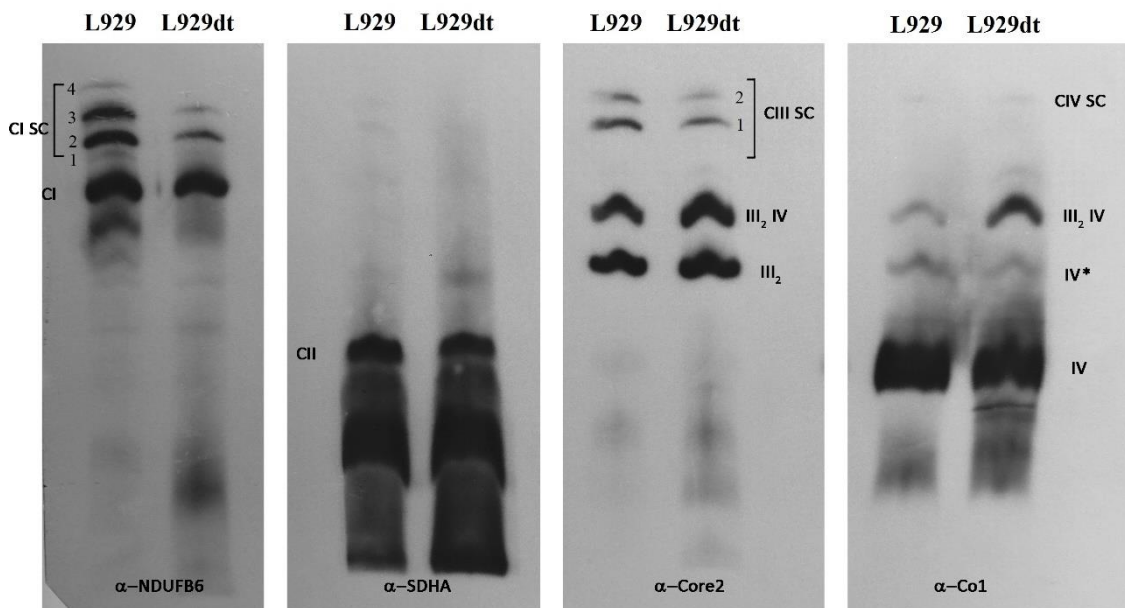


Figura 6.8. Western-Blotting de los complejos I (α -NDUFB6), II (α -SDHA), III (α -Core2) y IV (α -Co1) de la mETC de las líneas celulares L929 y L929dt. Se extrajeron las mitocondrias de ambas líneas celulares y se realizó un BNGE; después, se transfirieron las proteínas separadas a una membrana y se realizaron los inmunoblots.

Como puede verse en la *Fig. 6.8* y en la cuantificación de la *Tabla S13*, los resultados obtenidos muestran una disminución significativa del ensamblaje del CI en la línea celular L929dt, sobre todo en su forma asociada a SCs. Esta menor asociación del

CI con el resto de complejos (III y IV) provoca en consecuencia el aumento de la formación del SC III₂IV, así como de la forma libre del CIII. Esto se confirma a su vez observando la pérdida de intensidad de las bandas del CIII asociado al CI (CIII SC). Finalmente, los niveles del CIV libre parecen disminuir, posiblemente debido al aumento de la asociación de este complejo con el CIII.

6.3.2.2. Actividad de los complejos respiratorios

Paralelamente al estudio del ensamblaje de los complejos respiratorios, se llevó a cabo el estudio de su actividad enzimática. Al igual que en el apartado anterior, se partieron de mitocondrias aisladas de las líneas celulares L929 y L929dt. Por una parte, se realizó un BNGE y se adicionó el reactivo descrito en el apartado 5.2.2.1 sobre el gel para observar la actividad NADH deshidrogenasa (NADH-DH) en ambas muestras (Fig. 6.9). Los porcentajes de variación de la intensidad de cada banda de la línea celular L929dt comparada con la de las L929 de la actividad NADH-DH en gel se encuentran recogidas en Anexo 2 (Tabla S14). Por otra parte, se llevaron a cabo las medidas de las actividades enzimáticas de las mitocondrias aisladas mediante espectrofotometría. Los valores mostrados corresponden al porcentaje relativo de actividad específica de cada complejo de las células L929dt respecto a las L929 (Fig. 6.10).

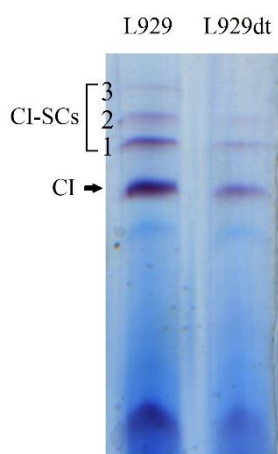


Figura 6.9. Actividad NADH-DH en gel de las mitocondrias de las células L929 y L929dt tras realizar un BNGE.

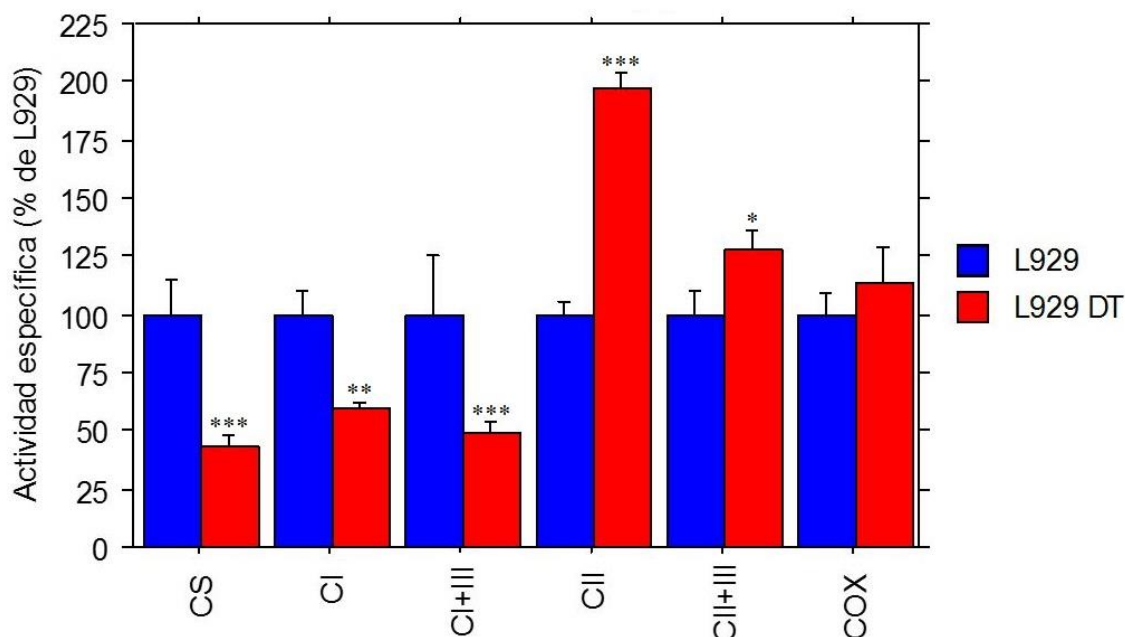


Figura 6.10. Actividad específica de la citrato sintasa (CS) y de los complejos respiratorios I (CI), I+III (CI+III), II (CII), II+III (CII+III) y IV (COX) de las células L929 y L929dt mediante espectrofotometría; $n \geq 2$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,03$; *** $p < 0,01$.

Como se observa en la *Fig. 6.10*, las células L929dt sufren una bajada significativa de la actividad del CI. En relación con este resultado, el ensayo de la actividad NADH-DH en gel confirma esta bajada en su actividad (*Fig. 6.9*), observándose disminuciones muy significativas (*Tabla S14*, en *Anexo 2*). A su vez, la actividad combinada de los CI y III está disminuida, de acuerdo con lo observado en la inmunodetección anterior (*Fig. 6.8*). Los resultados muestran, por tanto, que esta disminución en el ensamblaje de los SCs I+III induce una bajada en su actividad. Además de esto, la actividad del CII, tanto aislada como combinada con el CIII, aumenta sensiblemente. Este es probablemente un efecto de compensación frente a la falta de actividad del CI. La menor transferencia de electrones del CI al CIII provoca que quede una mayor cantidad del CIII disponible para recibir electrones desde el $FADH_2$, observándose así un aumento de la actividad de los complejos II+III. La actividad del CIV no varía de una manera significativa. Finalmente, en cuanto a la actividad de la citrato sintasa (CS), se observa una clara disminución de las células L929dt respecto a sus parentales. Esto puede indicar que, además del CI, las células L929dt pueden tener defectos en la expresión o en la actividad de alguna enzima del ciclo del ácido cítrico.

6.3.3. Análisis comparativo de la formación de ROS

Por último, se quiso analizar la cantidad de ROS producidas en las células L929dt en estado basal, en comparación con las células parentales L929. Las células se marcaron con DHE y DCF-DA, que en presencia de ROS reaccionan y se forman los productos 2HE y DCF, cuyas intensidades de fluorescencia se pueden detectar por citometría de flujo (Fig. 6.11). El DCF-DA es capaz de detectar varios tipos de ROS, tales como O_2^{2-} , radical hidroxilo y varios peróxidos, mientras que el DHE sólo detecta los niveles de O_2^{2-} .

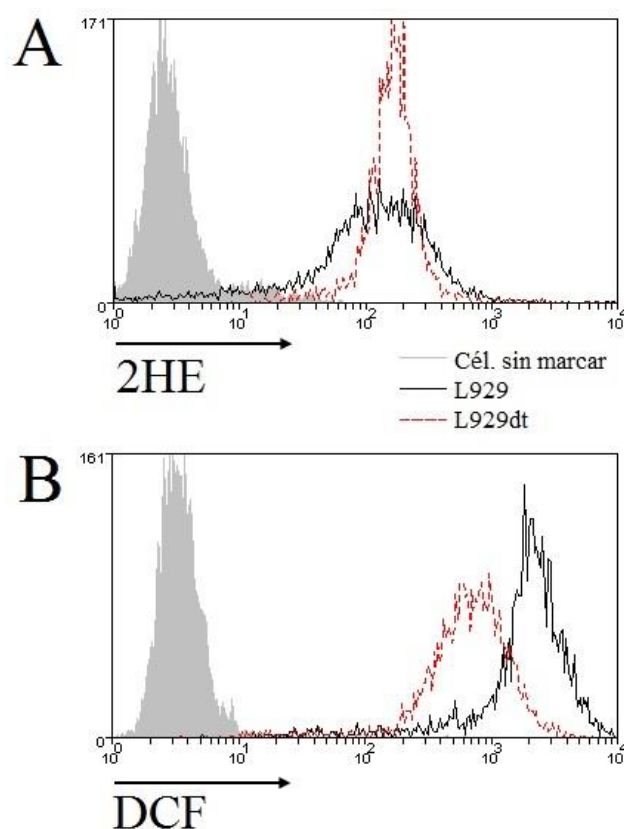


Figura 6.11. Formación de ROS de las células L929 y L929dt en estado basal, analizado mediante citometría de flujo. (A) Formación de 2HE tras marcaje con DHE; (B) Formación de DCF tras marcaje con DCF-DA.

Los resultados obtenidos indican que las células parentales L929 generan una mayor cantidad de ROS en estado basal respecto a las L929dt (Fig. 6.11, B). Este aumento no es debido a la especie O_2^{2-} , dado que los niveles de formación de este radical libre son similares en ambas líneas celulares (Fig. 6.11, A).

6.3.4. Discusión

En vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la línea celular L929dt posee defectos en el ensamblaje y en la actividad del complejo I de la mETC, lo cual le provoca una pérdida en la asociación en forma de SCs con el resto de complejos y una deficiencia en la capacidad de llevar a cabo el ciclo del ácido cítrico y la vía OXPHOS. Al no poder respirar de una manera correcta, el piruvato obtenido de la glucólisis deriva hacia la fermentación láctica y de esta manera, el rendimiento de la obtención de energía se ve comprometido. Para compensarlo, estas células consumen una mayor cantidad de glucosa del medio. La propia fermentación láctica le permite a su vez regenerar el NAD⁺ necesario para la glucólisis. Parece ser que para tratar de compensar la pérdida de actividad del CI, las células L929dt sufren un aumento en la actividad del CII.

En relación con la pérdida de la formación de SCs, se ha sugerido una implicación de la estabilidad de los SCs como nexo que une el estrés oxidativo con este cambio del metabolismo energético [51]. En esta revisión, se propone que el estrés oxidativo, provocado por una mayor formación de ROS, provocaría una desestabilización de los SCs que contienen el complejo I. Esta menor asociación desembocaría en una pérdida de la capacidad respiratoria de la mitocondria. Si bien no se ha estudiado en profundidad la implicación de la estabilidad de los SCs en la progresión tumoral, todo lo comentado anteriormente parece indicar que podría tener cierta importancia durante este proceso.

En cuanto al proceso de progresión tumoral y metástasis, se ha comenzado a señalar en los últimos años cierta relación entre defectos en la mitocondria con una mayor propensión al evento metastático [84]. De hecho, se ha demostrado que mitocondrias con mutaciones en el complejo I de células tumorales con alto potencial metastático inducen dicho mayor potencial metastático al transferirlas a células tumorales con menor potencial metastático [49]. Aunque todavía no se han caracterizado bien todos los eventos que se producen durante el cambio de fenotipo de una célula tumoral primaria a una célula metastática, la pérdida de la funcionalidad de la respiración mitocondrial podría ser un factor importante en este evento que merece la pena explorar.

Los resultados mostrados en este trabajo muestran que las células L929dt producen una menor cantidad de ROS respecto a sus células parentales. Estos datos no concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios, donde se ha observado que células tumorales con deficiencias en el CI poseen una mayor formación de ROS [49]. Una posibilidad para explicar los datos obtenidos podría ser que las células L929dt

tuvieran una mayor expresión y/o actividad de oxidorreductasas que eliminen los ROS formados, como la catalasa; o que las células parentales L929 tuvieran una mayor actividad de la enzima superóxido dismutasa, que reacciona con O_2^{2-} para formar H_2O_2 , disminuyendo la fluorescencia del marcaje con DHE y aumentando el de DCF-DA.

La línea celular L929dt ha sufrido un proceso espontáneo de pérdida de adhesión a la placa de cultivo, suceso que ocurre durante la metástasis tumoral. Este hecho, junto con su historial previo [46] y los experimentos realizados en este Trabajo de Fin de Máster parecen indicar que esta línea celular podría ser un buen modelo para estudiar la posible relación entre el metabolismo glucídico y la metástasis. No obstante, estos estudios deberían ampliarse y estudiar otros parámetros. Como primera aproximación, se debería demostrar su capacidad de inducir tumores *in vivo*. Las células L929 no son capaces de generar tumores en ratones singénicos a menos que éstos sean irradiados previamente para debilitar su sistema inmunitario [85, 86], sin embargo se ha descrito la formación de tumores en ratones atímicos inmunodeprimidos [87]. Utilizando este modelo experimental, se podría observar si las células L929dt poseen un mayor potencial tumorigénico y/o metastático respecto a las células parentales.

Además de esto, sería interesante poder relacionar el metabolismo glucídico con la pérdida de adhesión, así como con la pérdida de expresión del MHC-I, característico tanto de las metástasis como de las células L929dt. Por ello, se pretende realizar un estudio comparativo del quinoma de las células L929 y L929dt, con el objeto de encontrar una posible alteración en el patrón de las quinasas activadas en cada célula que dé pistas sobre el cambio fenotípico que se produce durante el evento metastático.

7. CONCLUSIONES

- El fármaco dicloroacetato (DCA) es capaz de sinergizar con el fármaco ibrutinib y con TRAIL asociado a liposomas (LUV-TRAIL), aumentando la citotoxicidad y el efecto antiproliferativo en diversas líneas celulares tumorales.
 - El DCA sensibiliza a las células ensayadas junto con LUV-TRAIL, al menos en parte, a través del aumento en la expresión en la superficie celular de DR5.
 - Las células L929dt poseen defectos en la respiración aerobia y presentan una tendencia hacia la fermentación, siendo muy sensibles a los efectos citostáticos y citotóxicos del DCA.
 - Las células L929dt presentan un defecto en la formación de supercomplejos por parte del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC), así como en su actividad.
-
- Dichloroacetate (DCA) is a drug which synergizes with two different drugs: ibrutinib and liposome-bound TRAIL (LUV-TRAIL), enhancing their antiproliferative and cytotoxic effect in several tumor cell lines.
 - DCA sensitizes cells, at least partially, through an increase in DR5 expression on the cell surface in DCA + LUV-TRAIL experiments.
 - L929dt cells have defects in aerobic respiration and show a tendency towards fermentation, which make them very sensitive against the cytostatic and cytotoxic effects of DCA.
 - L929dt cells show a reduction in the assembly of complex I (CI)-containing respiratory supercomplexes, as well as in both CI and CI + complex III activity.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *The multistep nature of cancer*. Trends Genet, 1993. **9**(4): p. 138-41.
2. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
3. Grizzi, F. and M. Chiriva-Internati, *Cancer: looking for simplicity and finding complexity*. Cancer Cell Int, 2006. **6**: p. 4.
4. Wang, Y., et al., *Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing*. Nature, 2014. **512**(7513): p. 155-60.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
7. Hayflick, L., *Mortality and immortality at the cellular level. A review*. Biochemistry (Mosc), 1997. **62**(11): p. 1180-90.
8. Shay, J.W. and S. Bacchetti, *A survey of telomerase activity in human cancer*. Eur J Cancer, 1997. **33**(5): p. 787-91.
9. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 269-70.
10. Brandon, M., P. Baldi, and D.C. Wallace, *Mitochondrial mutations in cancer*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4647-62.
11. Ward, P.S. and C.B. Thompson, *Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 297-308.
12. Ramjaun, A.R. and J. Downward, *Ras and phosphoinositide 3-kinase: partners in development and tumorigenesis*. Cell Cycle, 2007. **6**(23): p. 2902-5.
13. Gottlieb, E. and K.H. Vousden, *p53 regulation of metabolic pathways*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(4): p. a001040.
14. Jones, R.G. and C.B. Thompson, *Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth*. Genes Dev, 2009. **23**(5): p. 537-48.
15. Soga, T., *Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming*. Cancer Sci, 2013. **104**(3): p. 275-81.
16. Gallardo, M.E., 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, 2006. **27**(6): p. 575-82.
17. Crabtree, H.G., *Observations on the carbohydrate metabolism of tumours*. Biochem J, 1929. **23**(3): p. 536-45.
18. Ibsen, K.H., *The Crabtree effect: a review*. Cancer Res, 1961. **21**: p. 829-41.
19. Munoz-Pinedo, C., N. El Mjijad, and J.E. Ricci, *Cancer metabolism: current perspectives and future directions*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e248.

20. Ross, R., *Angiogenesis. Successful growth of tumours*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 16-7.
21. Mathot, L. and J. Stenninger, *Behavior of seeds and soil in the mechanism of metastasis: a deeper understanding*. Cancer Sci, 2012. **103**(4): p. 626-31.
22. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. Cancer Metastasis Rev, 1989. **8**(2): p. 98-101.
23. Ewing, J., *Neoplastic Disease: A Treatise On Tumors*. Philadelphia & London: WB Saunders Co, 1928: p. 77-89.
24. Fidler, I.J. and M.L. Kripke, *Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor*. Science, 1977. **197**(4306): p. 893-5.
25. Hart, I.R. and I.J. Fidler, *Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma*. Cancer Res, 1980. **40**(7): p. 2281-7.
26. Kaplan, R.N., et al., *VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 820-7.
27. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell, 2004. **117**(7): p. 927-39.
28. Huijbers, I.J., et al., *A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9808.
29. Clark, E.A., et al., *Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC*. Nature, 2000. **406**(6795): p. 532-5.
30. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 9-34.
31. Valiente, M., et al., *Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis*. Cell, 2014. **156**(5): p. 1002-16.
32. Steeg, P.S., *Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 895-904.
33. Hackenbrock, C.R., B. Chazotte, and S.S. Gupte, *The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport*. J Bioenerg Biomembr, 1986. **18**(5): p. 331-68.
34. Schagger, H. and K. Pfeiffer, *Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria*. Embo j, 2000. **19**(8): p. 1777-83.
35. Acin-Perez, R., et al., *Respiratory active mitochondrial supercomplexes*. Mol Cell, 2008. **32**(4): p. 529-39.
36. Lapuente-Brun, E., et al., *Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain*. Science, 2013. **340**(6140): p. 1567-70.
37. Gulbins, E., et al., *Physiology of apoptosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(4): p. F605-15.
38. Savill, J. and V. Fadok, *Corpse clearance defines the meaning of cell death*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 784-8.
39. Meier, P., A. Finch, and G. Evan, *Apoptosis in development*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 796-801.
40. Brunner, T. and C. Mueller, *Apoptosis in disease: about shortage and excess*. Essays Biochem, 2003. **39**: p. 119-30.

41. Ouyang, L., et al., *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Prolif, 2012. **45**(6): p. 487-98.
42. Wang, C. and R.J. Youle, *The role of mitochondria in apoptosis**. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 95-118.
43. Yuan, S. and C.W. Akey, *Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation*. Structure, 2013. **21**(4): p. 501-15.
44. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo j, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
45. Martinez-Lostao, L., et al., *Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(11): p. 1475-83.
46. Catalán, E., et al., *MHC-I modulation due to changes in tumor cell metabolism regulates tumor sensitivity to CTL and NK cells*. OncoImmunology, 2015. **4**(1): p. e985924-1-13.
47. Garrido, F., I. Algarra, and A.M. Garcia-Lora, *The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(10): p. 1601-6.
48. Jeon, S.M., N.S. Chandel, and N. Hay, *AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress*. Nature, 2012. **485**(7400): p. 661-5.
49. Ishikawa, K., et al., *ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis*. Science, 2008. **320**(5876): p. 661-4.
50. Kulawiec, M., K.M. Owens, and K.K. Singh, *Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(14): p. 1378-85.
51. Gasparre, G., et al., *Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).
52. Stockwin, L.H., et al., *Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC*. Int J Cancer, 2010. **127**(11): p. 2510-9.
53. Charni, S., et al., *Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3498-503.
54. Stacpoole, P.W., et al., *Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(13-14): p. 1478-87.
55. Kaufmann, P., et al., *Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial*. Neurology, 2006. **66**(3): p. 324-30.
56. Michelakis, E.D., et al., *Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate*. Sci Transl Med, 2010. **2**(31): p. 31ra34.
57. Flavin, D.F., *Non-Hodgkin's Lymphoma Reversal with Dichloroacetate*. J Oncol, 2010. **2010**.
58. Ashkenazi, A., et al., *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. J Clin Invest, 1999. **104**(2): p. 155-62.

59. Almasan, A. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 337-48.
60. Monleon, I., et al., *Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6736-44.
61. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1274-81.
62. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
63. Merino, D., et al., *Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(19): p. 7046-55.
64. Emery, J.G., et al., *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14363-7.
65. Martinez-Lostao, L., et al., *Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rabbit model of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(8): p. 2272-82.
66. De Miguel, D., et al., *Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells*. Mol Pharm, 2013. **10**(3): p. 893-904.
67. De Miguel, D., et al., *Immunotherapy with liposome-bound TRAIL overcomes partial protection to soluble TRAIL-induced apoptosis offered by down-regulation of Bim in leukemic cells*. Clin Transl Oncol, 2015.
68. Munoz-Pinedo, C., et al., *Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 12759-68.
69. Advani, R.H., et al., *Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies*. J Clin Oncol, 2013. **31**(1): p. 88-94.
70. McDermott, J. and A. Jimeno, *Ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma*. Drugs Today (Barc), 2014. **50**(4): p. 291-300.
71. Murray, M.Y., et al., *Ibrutinib inhibits BTK-driven NF-kappaB p65 activity to overcome bortezomib-resistance in multiple myeloma*. Cell Cycle, 2015: p. 0.
72. Yang, Y., et al., *Bruton tyrosine kinase is a therapeutic target in stem-like cells from multiple myeloma*. Cancer Res, 2015. **75**(3): p. 594-604.
73. Fonseca, R., et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*. Leukemia, 2009. **23**(12): p. 2210-21.
74. Ashjian, E. and K. Redic, *Multiple myeloma: Updates for pharmacists in the treatment of relapsed and refractory disease*. J Oncol Pharm Pract, 2015.

75. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
76. Schagger, H. and G. von Jagow, *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Anal Biochem, 1991. **199**(2): p. 223-31.
77. Schagger, H., et al., *Electrophoretic separation of multiprotein complexes from blood platelets and cell lines: technique for the analysis of diseases with defects in oxidative phosphorylation*. Electrophoresis, 1996. **17**(4): p. 709-14.
78. Anel, A. and A.M. Kleinfeld, *Tyrosine phosphorylation of a 100-kDa protein is correlated with cytotoxic T-lymphocyte function. Evidence from cis unsaturated fatty acid and phenylarsineoxide inhibition*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17578-87.
79. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
80. De Miguel, D., et al., *Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells*. Leuk Res, 2015.
81. Ravi, R., et al., *Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 409-16.
82. Garaude, J., et al., *ERK5 activates NF-kappaB in leukemic T cells and is essential for their growth in vivo*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7607-17.
83. Mathews Griner, L.A., et al., *High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(6): p. 2349-54.
84. Chen, E.I., *Mitochondrial dysfunction and cancer metastasis*. J Bioenerg Biomembr, 2012. **44**(6): p. 619-22.
85. Sanford, K.K., G.L. Hobbs, and W.R. Earle, *The tumor-producing capacity of strain L mouse cells after 10 years in vitro*. Cancer Res, 1956. **16**(2): p. 162-6.
86. Selinsky, C.L. and M.D. Howell, *Soluble tumor necrosis factor receptor type I enhances tumor development and persistence in vivo*. Cell Immunol, 2000. **200**(2): p. 81-7.
87. Blackburn, R.V., et al., *Comparison of tumor growth between hsp25- and hsp27-transfected murine L929 cells in nude mice*. Int J Cancer, 1997. **72**(5): p. 871-7.

9. ANEXOS

Anexo 1: Tablas de Materiales y Métodos

A. Medios de cultivo utilizados

Tabla S1

Medio de cultivo	Líneas celulares
DMEM + 10% SFB + GlutaMax + Antibióticos	A549, HT29, MCF7, L929, L929dt
RPMI + 10% SFB + GlutaMax + Antibióticos	U266, MM.1S

Tabla S1: Relación de los medios de cultivo utilizados para las líneas celulares ensayadas en este trabajo.

B. Composición de las disoluciones necesarias para una electroforesis nativa en gradiente de poliacrilamida (“Blue Native”)

Tabla S2

Disoluciones necesarias	Composición	Observaciones
Tampón de gel 3x	Bis-Tris 150 mM, ácido aminocaproico 1.5 M, pH 7,0	----
Disolución <i>stock</i> de acrilamida:bisacrilamida	Acrilamida:bisacrilamida (48:1.5) (p/v)	Filtrada y almacenada, protegida de la luz a 4° C.
APS	Persulfato de amonio al 10 % (p/v)	Preparado en el momento
Tampón del cátodo A	Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM pH 7,0, <i>Serva blue G</i> 0.02 %	----
Tampón del cátodo B	Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM pH=7.0, <i>Serva blue G</i> 0.002 %	----
Tampón del ánodo	Bis-Tris 50 mM, pH 7,0	----
Tampón de carga BN		----

Tabla S2. Relación de las disoluciones preparadas para una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida.

C. Composición de las disoluciones preparadas para BNGE

Tabla S3

Componente	Acrilamida 3%	Acrilamida 13%
AA:BA (48.5:1.5)	305 μ l	866 μ l
Tampón BN (3X)	1.667 ml	1.111 ml
H ₂ O destilada	3 ml	796 μ l
Glicerol	-	560 μ l
APS 10%	40 μ l	14 μ l
TEMED	4 μ l	3 μ l

Tabla S3. Composición de las disoluciones para la preparación de un gel de Blue Native para la separación de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

D. Composición del gel separador (resolving gel) y concentrador (stacking gel)

Tabla S4

	Stacking Gel	Resolving Gel 12%
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0,65 ml	4 ml
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,26 ml	-
Tris-HCl 0,5M pH 8,8	-	2,5 ml
SDS 10%	50 μ l	100 μ l
Agua destilada	3 ml	3,35 ml
APS 10%	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l
Volumen total	5,07 ml	10,06 ml

Tabla S4. Composición de los geles utilizados para realizar electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS.

E. Anticuerpos empleados en los inmunoblots

Tabla S5

	Ab Primario (dilución)	Proteína	Ab Secundario (dilución)	Origen
Complejo I	Anti-17 KDa (1/10000)	NDUFB6	Anti-ratón (1/5000)	<i>Molecular Probes</i>
Complejo II	Anti-70 KDa (1/5000)	SDHA	Anti-ratón (1/5000)	<i>Molecular Probes</i>
Complejo III	Anti-Core2 (1/5000)	UQCRC2	Anti-ratón (1/5000)	<i>Mitosciences</i>
Complejo IV	Anti-COI (1/5000)	MT-CO1	Anti-ratón (1/5000)	<i>Mitosciences</i>
c-FLIP (clon NF6)	Anti-c-FLIP (1/500)	c-FLIP	Anti-ratón (1/5000)	<i>Enzo Life Sciences</i>

Tabla S5. Relación de anticuerpos primarios empleados.

F. Reacción citrato sintasa

Tabla S6

	Concentración stock	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón de medida	10 mM	861,7	~10 mM
Acetil-CoA	7 mg/ml	3,3	0,023 mg/ml
DTNB	1 mM	100	0,1 mM
Muestra	----	20	----
Tritón X-100	10%	10	0.1%
OAA	50 mM	5	0,25 mM

Tabla S6. Mezcla de reactivos para la medida de la actividad de la citrato sintasa.

G. Reacción complejo I

Tabla S7

	Concentración stock	Volumen (µl)	Concentración final
Buffer C1/C2	1x	955	~1x
UQ₁	10 mM	13	0.13 mM
NADH	13 mM	10	0.13 mM
Antimicina A	1 mg/ml	2	2 µg/ml
Muestra	----	20	----

Tabla S7. Mezcla de reactivos para la medida de la actividad del complejo I.

H. Reacción complejo I+III

Tabla S8

	Concentración stock	Volumen (µl)	Concentración final
Buffer C1/C2	1x	745	~1x
KCN	10 mM	50	0.2 mM
Cit. C oxidado	1mM	100	0.1 mM
Muestra	----	5	----
NADH	1 mM	100	0.1 mM

Tabla S8. Mezcla de reactivos para la medida de la actividad de los complejos I+III.

I. Reacción complejo II

Tabla S9

	Concentración stock	Volumen (µl)	Concentración final
Buffer C1/C2	1x	939	~1x
Succinato	1 M	10	10 mM
Muestra	----	20	----

DCPIP	5 mM	6	30 µM
Antimicina A	1 mg/ml	2	2 µg/ml
Rotenona	500 µM	10	5 µM

UQ ₁	10 mM	13	0,13 mM
-----------------	-------	----	---------

Tabla S9. Mezcla de reactivos para la medida de la actividad del complejo II.

J. Reacción complejo II+III

Tabla S10

	Concentración stock	Volumen (µl)	Concentración final
Buffer C1/C2	1x	735	~1x
KCN	10 mM	50	0.2 mM
Cit. C oxidado	1mM	100	0.1 mM
Rotenona	500 µM	10	5 µM
Muestra	----	5	----
Succinato	30 mM	100	3 mM

Tabla S10. Mezcla de reactivos para la medida de la actividad de los complejos II+III.

K. Reacción complejo IV

Tabla S11

	Concentración stock	Volumen (μ l)	Concentración final
H ₂ O destilada	----	795	----
KP(pH=7.0)	100 mM	100	10 mM
Muestra	----	5	----
Cit. C red. 1%	10 mg/ml	100	1 mg/ml

Tabla S11. Mezcla de reactivos para la medida de la actividad del complejo IV.

Anexo 2: Figuras y Tablas de Resultados

A. Efecto combinatorio de DCA + LUV-TRAIL sobre la muerte celular

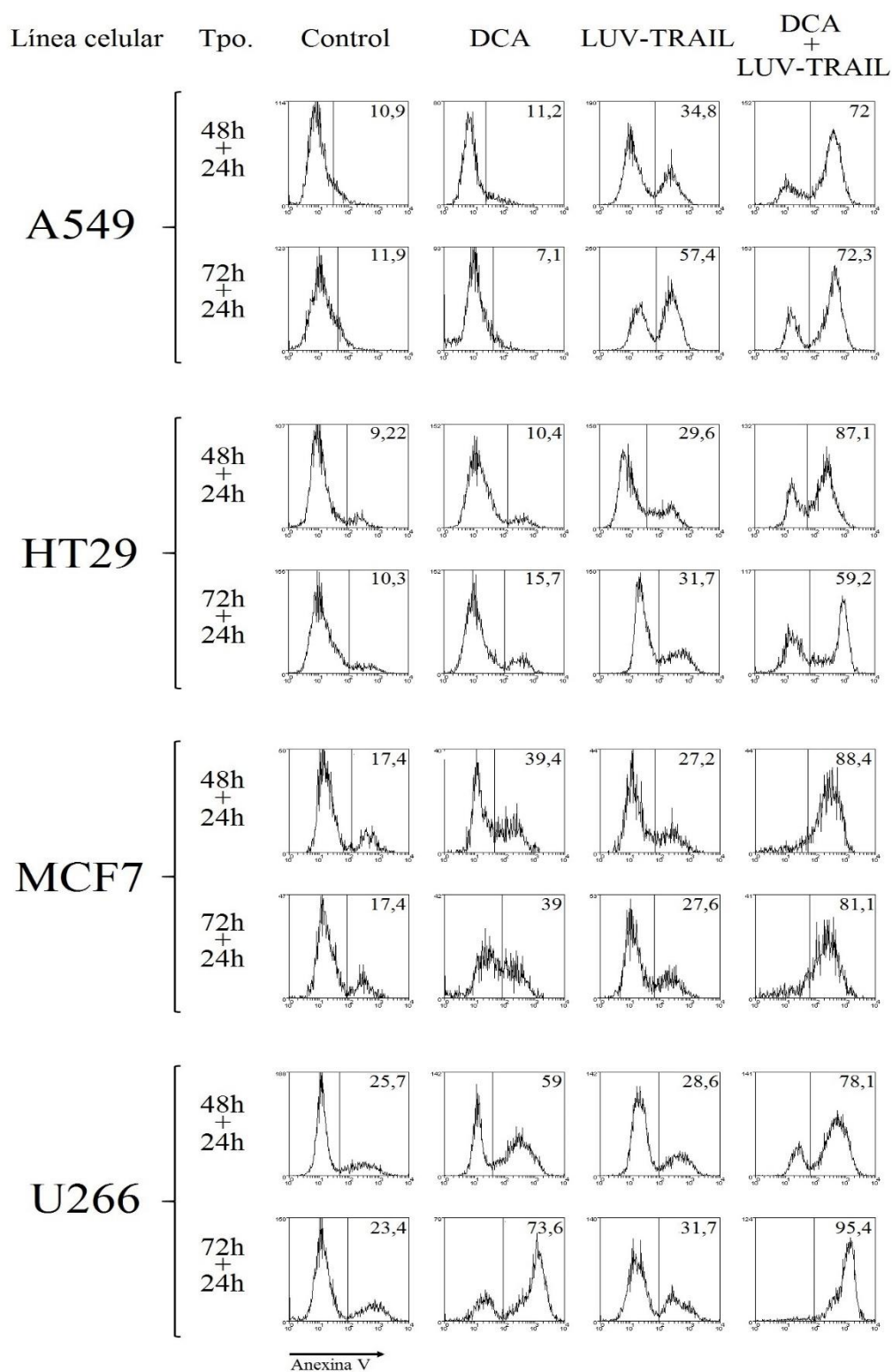


Figura S1. Histogramas representativos de la inducción de muerte celular de la combinación de DCA + LUV-TRAIL, mediante citometría de flujo tras marcaje con Ann-V-FITC.

B. Expresión del MHC-I tras incubación con DCA en las células L929 y L929dt**Tabla S12**

Condiciones del cultivo	L929	L929dt
Control	110,3	15,1
[DCA] = 15 mM (72 h)	145,9	30,8
[DCA] = 20 mM (72 h)	168,5	63,8
[DCA] = 25 mM (72 h)	197,7	76,9

Tabla S12. Expresión del MHC-I en las células L929 y L929dt tras 72 horas de incubación con DCA a varias concentraciones. Los valores se expresan como la diferencia entre la intensidad media de fluorescencia del H-2K^k y el isotipo.

C. Expresión de los complejos respiratorios**Tabla S13**

Banda	Variación de la expresión (%)
CII	-9,12
CI	-10,27
CI SC -- 1	-100
CI SC -- 2	-54,70
CI SC -- 3	-78,14
CI SC -- 4	-100
III	35,54
III ₂ +IV	52,08
CIII SC -- 1	-36,42
CIII SC -- 2	-39,71
IV	-5,22
IV*	-23,84
III ₂ +IV	184,43
CIV SC	128,39

Tabla S13. Porcentaje de variación de la intensidad de banda obtenida de los *immunoblots* de los CI-IV mitocondriales de la línea celular L929dt respecto a la línea celular L929.

D. Actividad NADH deshidrogenasa (NADH-DH)

Tabla S14

Banda	% Intensidad de banda de L929dt respecto a L929
CI	-44,33
CI-SCs (banda 1)	-53,82
CI-SCs (banda 2)	-49,19
CI-SCs (banda 3)	-100

Tabla S14. Variación de la intensidad de las bandas de las mitocondrias de las células L929dt respecto a L929 al observar la actividad NADH-DH en gel de BN.

