



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Estudio del papel de los supercomplejos respiratorios y los ROS en los procesos de tumorigénesis y metástasis

Role of respiratory supercomplexes and ROS in the processes of tumorigenesis and metastasis

Autora

Inés Aznar Peralta

Directores

Raquel Moreno Loshuertos

Patricio Fernández Silva

Grupo GENOXPHOS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza
2019

ABREVIATURAS

- 2HE: 2-hidroetidio
- BN-PAGE: *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*; Electroforesis nativa en gel en gradiente de poliacrilamida
- BSA: Albúmina sérica bovina
- Cat: Catalasa
- CS: Citrato sintasa
- Ct: *Cycle threshold*; ciclo umbral
- CoQ: Coenzima Q
- COX2: Citocromo c oxidasa
- DAB: Diaminobencidina
- DCF: Diclorofluoresceína
- DHE: Dihidroetidio
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO: Dimetilsulfóido
- DNP: Dinitrofenol
- dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato
- Dt: Tiempo de duplicación
- DTNB: Ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzóico
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- H₂DCF-DA: Dihidrodiclorofluoresceína diacetato
- IGA: *In Gel Activity*; Actividad en gel
- KCN: Cianuro de potasio
- mETC: Cadena de transporte electrónico mitocondrial
- mtDNA: DNA mitocondrial
- NBT: Nitroazul de tetrazolio
- NRF1: Factor respiratorio nuclear 1
- OAA: Oxalacetato
- OXPHOS: Fosforilación oxidativa
- PBS: Tampón fosfato salino
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno
- ROS: *Reactive Oxygen Species*; Especies reactivas de oxígeno
- SC: Supercomplejo
- SDS: Dodecilsulfato sódico
- SFB: Suero fetal bovino

SHDA: Succinato deshidrogenasa

SOD2: Manganeso superóxido dismutasa

WB: *Western-Blot*

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Oncogénesis y metástasis	2
2.2. Mitocondrias y su metabolismo en el cáncer	3
2.3. Sistema de fosforilación oxidativa OXPHOS.....	4
2.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	5
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Cultivos celulares.....	8
4.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo.....	8
4.1.2. Cultivo y siembra celular.	8
4.1.3. Congelación y descongelación de líneas celulares.	8
4.1.4. Recuento celular.....	9
4.1.5. Curvas de crecimiento	9
4.2. Extracción de ácidos nucleicos	9
4.2.1. Extracción de DNA de células en cultivo	9
4.2.2. Extracción de RNA de células en cultivo	10
4.2.3. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría.....	10
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	10
4.3.1. Obtención de cDNA monocatenario	10
4.3.2. Real-time PCR	11
4.4. Purificación de mitocondrias para análisis por Blue Native – PAGE.....	11
4.5. Análisis de proteínas.....	12
4.5.1. Cuantificación de proteínas por método de Bradford.	12
4.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida “Blue Native”	12
4.5.3. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.	13
4.5.4. Inmunodetección de proteínas por Western-blot.	13
4.5.5. Reutilización de las membranas	13
4.5.6. Ensayos de actividad en gel (IGA).....	14
4.6. Medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante citometría de flujo	14
4.7. Medida de función de la enzima citrato sintasa.....	14
4.8. Medida de la funcionalidad de la cadena de transporte electrónico.....	15
4.9. Análisis estadístico	15

5. RESULTADOS.....	16
5.1. Funcionalidad del sistema OXPHOS.....	16
5.2. Organización de los complejos y supercomplejos respiratorios	18
5.3. Especies reactivas de oxígeno.....	19
5.4. Diferencias en la masa, biogénesis y DNA mitocondriales.....	20
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	22
7. CONCLUSIONES.....	23
8. BIBLIOGRAFÍA.....	24
9. ANEXOS	26

1. RESUMEN

El sistema de fosforilación oxidativa, presente en la membrana interna de la mitocondria, es el encargado de producir la mayor parte de la energía metabólica en células eucariotas. En el proceso de transformación tumoral, las células modifican su metabolismo hacia la degradación anaeróbica de glucosa en detrimento de la respiración mitocondrial. Esto suele ir acompañado de un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), que actúan como mutágenos y mitógenos. Estos ROS presentan una clara relación recíproca con los SCs respiratorios, que ha comenzado a estudiarse recientemente en los procesos oncogénicos y metastásicos.

En este contexto, nos proponemos estudiar el papel de los SCs y los ROS en los procesos tumorales y metastásicos, trabajando con tres líneas celulares de cáncer de mama con diferentes capacidades de invasión. Con este objetivo principal hemos estudiado la funcionalidad de su sistema OXPHOS y el patrón de ensamblaje de los supercomplejos respiratorios. También se determinaron los niveles de ROS y la capacidad detoxificadora de las células y, por último, se evaluaron los efectos en el mtDNA y la biogénesis mitocondrial.

Los resultados indican que las células más invasivas tienen una deficiencia en la funcionalidad de su sistema OXPHOS y una menor formación de supercomplejos, siendo el patrón de organización distinto en cada línea celular. La línea más metastásica también presenta unos elevados niveles de ROS, mientras que las células de estadio intermedio cuentan con una mayor defensa antioxidante. Además, conforme aumenta la capacidad de invasión de las células observamos una disminución del número de copias de mtDNA y de biogénesis mitocondrial.

1. ABSTRACT

The oxidative phosphorylation system, located in the mitochondrial inner membrane, is responsible of producing most metabolic energy in eukaryotic cells. In the process of tumor transformation, cells modify their metabolism towards anaerobic degradation of glucose in detriment of mitochondrial respiration. This change is usually accompanied by an increase in the levels of reactive oxygen species (ROS), which act as mutagens and mitogens. ROS have a clear reciprocal relationship with respiratory SCs, which has recently begun to be studied in oncogenic and metastatic processes.

In this context, we propose to study the role of respiratory SCs and ROS in tumour and metastatic processes, working with three metastatic breast cancer cell lines with different invasion capabilities. With this main objective, we have analysed their OXPHOS system functionality and the respiratory supercomplexes assembly pattern. ROS levels and the detoxifying capacity of cells were also determined and, finally, the effects on mtDNA and mitochondrial biogenesis were evaluated.

The results indicate that highly-invasive cells show OXPHOS deficiency and lower formation of supercomplexes, with the complex organization pattern being different in each cell line. Highly-metastatic cell line also shows increased ROS levels, while intermediate-stage cells have a greater antioxidant defence. As the tumour cells invasion capacity increases, the mtDNA copy number and mitochondrial biogenesis decreases.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Oncogénesis y metástasis

'Cáncer' es un término muy amplio que engloba un gran conjunto de enfermedades cuya característica principal es una proliferación celular descontrolada. Cada uno de los tipos celulares del organismo puede desarrollar un determinado tipo de cáncer, llegando a existir más de 200, con notables diferencias entre ellos.

La oncogénesis o carcinogénesis comienza con la transformación de una célula normal en una tumoral debido a la acumulación de mutaciones en su DNA. Estas células pierden el control de su ciclo vital y comienzan a proliferar de forma autónoma, generando un nuevo tumor o neoplasia. Las mutaciones genéticas "fundadoras" que dan origen al crecimiento tumoral producen la pérdida de actividad de genes supresores de tumores y de reparación del DNA, o la ganancia de función de oncogenes y la enzima telomerasa. Conforme el tumor va evolucionando, aumenta la inestabilidad genética y se van acumulando nuevas mutaciones "accesorias" que ayudan a su progresión (1).

Se habla de tumores benignos cuando se produce un crecimiento anormal, pero sin capacidad de invadir otros tejidos, transformándose en malignos cuando adquieren la capacidad de metastatizar. El proceso de metástasis es complicado y normalmente ocurre en fases avanzadas del tumor. En el caso de los carcinomas, que corresponden al 80-90% de tumores clínicos, como el cáncer de mama, las células tienen que realizar la transición epitelio-mesénquima, convirtiéndose en células mesenquimales con capacidad de hidrolizar la matriz extracelular, invadir los vasos sanguíneos y viajar hasta los capilares de otro tejido u órgano, donde extravasan y forman un núcleo de crecimiento secundario. Allí realizan la transición inversa mesénquima-epitelio, convirtiéndose de nuevo en células epiteliales que invaden el tejido (2).

A pesar de ser una enfermedad altamente heterogénea, hay unas características que se consideran generales en todos los casos: evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento y capacidad de invasión de los tejidos y metástasis (3). Posteriormente se añadieron otras cuatro características: inflamación, inestabilidad genómica, evasión de la respuesta inmunitaria y desregulación del metabolismo energético. En esta revisión queda plasmada la importancia del metabolismo energético en el desarrollo del cáncer, dando un papel esencial a la mitocondria (4)



Figura 1. Características principales del cáncer.
Imagen adaptada de (4).

2.2. Mitocondrias y su metabolismo en el cáncer

Las mitocondrias son orgánulos celulares esenciales en la mayoría de las células eucariotas. Su origen es endosimbiótico, tienen un genoma propio y una maquinaria de traducción distinta a la encargada de la expresión del genoma nuclear, y son muy dinámicas, encontrándose en constante fisión y fusión en respuesta a diferentes estímulos. La mitocondria presenta dos membranas, la externa es permeable gracias a las porinas, mientras que la interna es altamente selectiva, quedando entre ambas el espacio intermembrana. La membrana interna forma unas invaginaciones que constituyen las crestas mitocondriales, en las cuales se encuentran los componentes de la fosforilación oxidativa o sistema OXPHOS.

El DNA mitocondrial (mtDNA) es circular, poliploide, sin intrones, y se transmite por vía maternal y no de forma mendeliana. En humanos, consta de 16569 pares de bases que codifican 13 proteínas del sistema OXPHOS, además de 2 rRNAs y 22 tRNAs, localizándose la información para el resto de las proteínas mitocondriales en el DNA nuclear.

Las mitocondrias son cruciales en muchas funciones celulares, principalmente la generación de energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa, siendo los integradores principales del metabolismo energético. Otros muchos parámetros celulares están controlados por la mitocondria, como el estado de oxidación-reducción (redox), los niveles de calcio citosólico (Ca^{2+}), la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS), la generación de precursores biosintéticos para diferentes rutas bioquímicas, y la iniciación de la apoptosis por la salida del citocromo c. Cambios en estos parámetros pueden alterar el estado celular y están relacionados con diversas patologías, incluida la transformación tumoral (5).

En el estudio del metabolismo mitocondrial, Otto Warburg describió una elevada tasa glucolítica en células tumorales, independientemente de los niveles de oxígeno disponible, que llevan a cabo principalmente la fermentación láctica como fuente de energía, lo que se denominó «efecto Warburg» (6). Al mismo tiempo, en estas células disminuye la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa. De esta manera, las células obtienen energía a la vez que generan metabolitos destinados a otras rutas biosintéticas para continuar con su elevada tasa de proliferación. Muchas células tumorales presentan otros cambios, como disminución de sustratos de oxidación, alteraciones funcionales y estructurales en los complejos respiratorios, mutaciones en el mtDNA, sobreproducción de ROS, y desregulación de la apoptosis (5,7). Aunque la glucólisis anaerobia se considera una característica general de todos los tumores, hay excepciones en las que aumenta la respiración mitocondrial (8).

A lo largo del tiempo, se ha trabajado con las hipótesis contradictorias de que la disfunción mitocondrial promueve el desarrollo del cáncer, o que es la mitocondria en sí misma, esencial para este (9). Por una parte, las células tumorales requieren mitocondrias funcionales, lo cual se estudió mediante la eliminación de su mtDNA, que resultó en un crecimiento celular reducido y menor formación de tumores (10). Sin embargo, mutaciones en el mtDNA o reducciones en su número de copias son características comunes en el cáncer. Además, se ha demostrado que las mitocondrias de células tumorales están alteradas tanto genética como funcionalmente estudiando cíbridos transmitocondriales (11).

La disfunción mitocondrial puede ser causada por defectos en genes nucleares o mitocondriales que codifican proteínas implicadas en rutas metabólicas, potencial de membrana, la biogénesis mitocondrial, el sistema OXPHOS, o vías de transducción de señales. Normalmente la transformación comienza con una desregulación causada por oncogenes o genes supresores de tumores, pero las condiciones del microambiente tumoral también afectan al metabolismo y pueden potenciar este proceso.

Por tanto, se considera que las alteraciones mitocondriales tienen un papel en el desarrollo del cáncer importante pero complejo y diferente en cada tipo de tumor y estadio. Debido a la multitud de estudios que atribuyen un papel esencial a la mitocondria, se han ensayado y aprobado inhibidores del metabolismo mitocondrial como terapia anticancerígena. Estos se dirigen contra el ciclo de Krebs, la cadena de electrones, la fisión mitocondrial, o inducen la apoptosis por la vía mitocondrial (9).

2.3. Sistema de fosforilación oxidativa OXPHOS

El sistema de fosforilación oxidativa o sistema OXPHOS está compuesto por la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC) y la ATP-sintasa, tratándose de dos tipos de reacciones diferentes acopladas entre sí. Se produce un flujo de electrones desde donantes hasta aceptores a través de la mETC, proceso en el cual los complejos respiratorios llevan a cabo reacciones redox en las que se libera energía, empleándola para el bombeo protones al espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico. Esta energía se libera seguidamente por quimiosmosis cuando la ATP-sintasa permite el paso de protones de nuevo hacia el interior de la mitocondria, y la utiliza para sintetizar ATP.

Los componentes del sistema OXPHOS son cuatro complejos respiratorios (CI-IV), más los transportadores de electrones coenzima Q (CoQ) o ubiquinona y citocromo C, y la ATP-sintasa, también denominada complejo CV. También existen otros factores y proteínas mitocondriales con funciones estructurales, regulatorias o de ensamblaje que contribuyen al funcionamiento de dicho sistema.

El proceso comienza con la entrada de electrones a través de nucleótidos de nicotinamida (NADH) o flavina (FADH_2) reducidos, que provienen de diferentes rutas metabólicas (principalmente ciclo de Krebs y/o beta-oxidación). El CI o NADH-ubiquinona reductasa cataliza la oxidación del NADH y transfiere dos electrones en forma de ion hidruro a la ubiquinona, translocando cuatro protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El CII o succinato-coenzima Q reductasa es el único que forma parte del ciclo de Krebs, oxida succinato a fumarato reduciendo la ubiquinona a ubiquinol a través de su cofactor FAD reducido, sin translocación de protones. El CIII o ubiquinol-citocromo c reductasa cataliza la oxidación de una molécula de ubiquinol y la reducción de dos moléculas de citocromo c mediante un mecanismo de reducción denominado ciclo Q. En este caso también se translocan cuatro protones al espacio intermembrana. El CIV es la enzima citocromo c oxidasa, que transfiere los electrones transportados por los citocromos al oxígeno, el acceptor final, reduciéndolo a H_2O . En este caso se translocan cuatro y se utilizan otros cuatro en la generación de dos moléculas de agua contribuyendo al gradiente electroquímico.

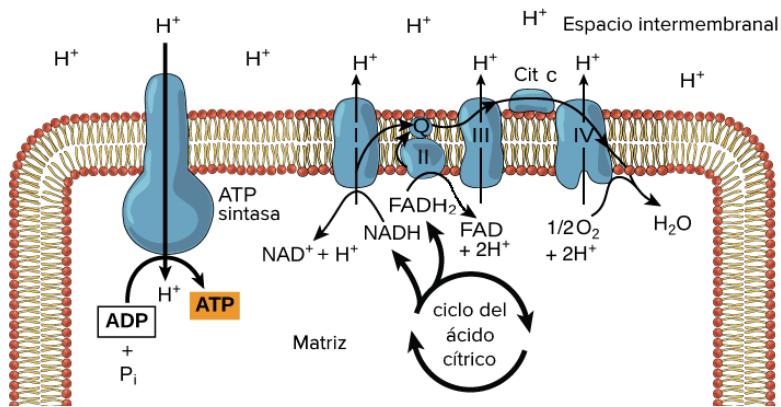


Figura 2. Sistema OXPHOS.

La organización de los componentes del sistema OXPHOS ha sido objeto de un extenso debate, existiendo principalmente dos modelos que tratan de explicarla. El primer modelo de organización de la mETC o modelo rígido propuesto en 1947, la describe como una entidad fija compuesta por los diferentes complejos respiratorios, en la que estos permanecen unidos, permitiendo una cadena catalítica altamente eficiente (12).

El modelo rígido se consolidó hasta 1961, con la propuesta del modelo quimiosmótico, que dio origen al modelo fluido o de colisión al azar. Este describía la mETC como una secuencia funcional de los 4 complejos, distribuidos al azar y con libertad de movimiento por la membrana interna mitocondrial (13).

Este nuevo modelo fue aceptado hasta que se publicó el análisis de los complejos respiratorios en geles de BN-PAGE (*Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), en los que se veía, además de los complejos individuales, asociaciones entre ellos creando los llamados supercomplejos (SCs), recuperando el modelo rígido (14). El CI se encuentra mayoritariamente asociado al CIII o al CIII y CIV a la vez, formando el respirasoma. El CIII también se encuentra mayormente asociado con el CI, mientras que el CIV esta principalmente en forma libre y una parte asociado al CIII o al CI y al CIII. El CII no forma parte de ninguno de estos supercomplejos. La proporción de supercomplejos y complejos libres depende del tipo y estado metabólico de la célula.

En 2008 el grupo de investigación en el que se desarrolla este trabajo demostró la actividad del respirasoma aislado probando que los supercomplejos son funcionales (15), aunque eso no excluye la posibilidad de otras asociaciones o de que los complejos funcionen también en forma libre. Así, se propuso un nuevo modelo de organización de la mETC, el modelo de plasticidad, que integra ambos modelos anteriores (16,17).

2.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La mitocondria, además de generar ATP y precursores biosintéticos, también es responsable de la producción de especies reactivas de oxígeno o ROS a partir de los electrones liberados en la cadena de transporte electrónico. Estas moléculas incluyen iones, radicales libres y peróxidos de oxígeno, que tienen distintas propiedades y se producen en diferentes condiciones.

Los ROS llevan a cabo importantes funciones celulares actuando como mensajeros intracelulares, con especial importancia en la biogénesis mitocondrial. Por otra parte, son moléculas inestables de vida corta y alta reactividad que reaccionan con proteínas, lípidos y nucleótidos causando daños oxidativos, siendo su exceso notablemente perjudicial para la célula y sobre todo para su DNA, ya que pueden provocar mutaciones que contribuyen al desarrollo de patologías, como la oncogénesis y el desarrollo tumoral. Además de ser agentes mutágenos, también actúan como mitógenos contribuyendo a la progresión del tumor (18). El estrecho balance de los niveles celulares de ROS es controlado por enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, además de antioxidantes de bajo peso molecular como vitaminas y oligo-elementos.

Una de las funciones propuestas para los supercomplejos respiratorios es la prevención del exceso de ROS, encontrándose una relación entre alteraciones en su formación y diversas patologías en las cuales se encuentran elevados niveles de ROS (17). Entre estas enfermedades se encuentra el cáncer, siendo el aumento en la producción de ROS una propiedad general de las células tumorales con mitocondrias disfuncionales, debido a un descenso de la actividad de la cadena de transporte electrónico, ya sea por mutaciones en mtDNA y por tanto daños en los complejos respiratorios, o como consecuencia de la hipoxia.

Diversos estudios apuntan que los ROS tienen un doble papel antagónico en el desarrollo tumoral, contribuyendo tanto a la proliferación como a la apoptosis de células tumorales, y se ha propuesto que su concentración y por tanto su papel cambie conforme evoluciona la enfermedad. En los primeros estadios del cáncer, los ROS tendrían un papel pro-oncogénico al producir daño en el DNA y promover el cambio metabólico, llevando a la vascularización y metástasis del tumor. La evolución de un estado neoplásico a uno más avanzado se asocia con el aumento progresivo de ROS, por lo que en estadios más avanzados la excesiva acumulación de ROS podría promover la muerte celular, y éstos tomarían un papel de supresor de tumores induciendo apoptosis. Relacionado con ello, en algunos cánceres como el de mama, la expresión y actividad de enzimas antioxidantes disminuyen durante los estados neoplásicos, favoreciendo el daño oxidativo y la oncogénesis, pero aumentan en estados malignos e invasivos, ayudando así a los tumores a escapar de la apoptosis (19,20).

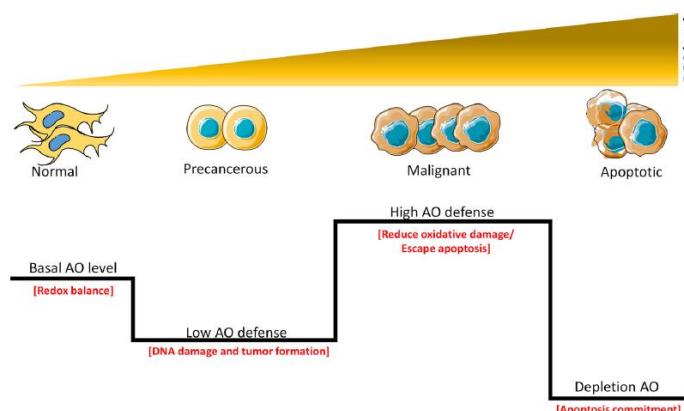


Figura 3. Niveles de ROS y defensas antioxidantes en la progresión tumoral (19)

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La relación entre la mitocondria, la producción de ROS y el desarrollo tumoral es compleja y los mecanismos implicados no están claros o son contradictorios en muchos casos. Sin embargo, estas asociaciones se muestran cada vez más evidentes, siendo necesarios estudios que profundicen en sus características y su regulación.

Concretamente, existe una clara relación recíproca entre los supercomplejos respiratorios (SCs) y ROS: los ROS afectan a la función de los complejos y SCs causando daño oxidativo, y la organización en SCs puede afectar a la producción de ROS, cuyos niveles aumentan en ausencia del ensamblaje de SCs (16). Estudios *in vitro* han demostrado que la producción de ROS a nivel del CI aumenta cuando la formación del supercomplejo I+III se altera o se impide (21).

Analizando esta relación bidireccional en procesos de tumorigénesis, se ha observado un incremento en la producción de ROS asociado a una alteración en el patrón de SCs (22). Siguiendo esta línea de investigación, estudios recientes del grupo han demostrado una variación en la organización de SCs en líneas celulares con diferente capacidad metastásica (23).

Este proyecto se enmarca en el contexto general de una investigación en curso para tratar de dilucidar el papel de los supercomplejos respiratorios en situaciones que modifican el metabolismo celular y la producción de ROS, en particular en los procesos de tumorigénesis y metástasis.

Los objetivos concretos que se plantean para este TFG son los siguientes:

- Evaluar la funcionalidad del sistema OXPHOS de líneas celulares tumorales con distinta capacidad metastásica.
- Estudiar el patrón de organización de los complejos respiratorios en procesos tumorales y metastásicos.
- Analizar los niveles de producción de ROS y su detoxificación en líneas celulares con diferente capacidad de invasión.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivos celulares

4.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo.

Las líneas celulares utilizadas son MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7, células epiteliales humanas de cáncer de mama metastásico, con una capacidad de invasión decreciente en ese orden. Como control de los experimentos se usó la línea 613, células transmitocondriales obtenidas por la fusión de células 143p0 (osteosarcoma carente de mtDNA) con plaquetas de un donante sano de haplogrupo H.

Las células se sembraron en medio DMEM (GIBCO™) con glucosa (4.5 g/l) y piruvato (0.11 g/l), al que se le añadió un 10% suero fetal bovino (SFB) y un 1% de una mezcla de antibióticos compuesta por 10000 unidades/mL de penicilina G sódica y 10000 µg/mL de sulfato de estreptomicina (Invitrogen). El medio de galactosa utilizado en las curvas de crecimiento se preparó a partir de medio DMEM sin glucosa ni piruvato (GIBCO™), al que se le añadió 0.9 g/l de galactosa y 0.11 g/l de piruvato de sodio (SIGMA), además de 10% de SFB y 1% de antibióticos.

4.1.2. Cultivo y siembra celular.

Las células se sembraron en placas petri de 100 o 150 mm de diámetro con una densidad de 10^4 - 10^5 cél/mL de medio, añadiendo 0.2 mL de medio/cm² de superficie. Estas placas de cultivo se mantuvieron en una estufa a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo regularmente cada dos o tres días.

Al alcanzar la confluencia las células fueron replicadas, para lo cual se elimina el medio por succión, se lavan las células con PBS (0.05 mL/cm²) (GIBCO™) y se incuban durante 2-3 minutos con tripsina pancreática (0.033 mL/cm² de una mezcla 0.05% tripsina (SIGMA) y 0.02% EDTA preparada en PBS y esterilizada por filtración). Las células se recogen con PBS, suplementado con 10% de SFB para inhibir la tripsina, en un tubo falcon de 15 mL. Estas se centrifugan 5 minutos a 1750 xg y el precipitado celular se resuspende en volumen adecuado de medio de cultivo.

Todo los medios usados se precalentaron antes de su uso en un baño de agua a 37°C, y toda la manipulación de las placas se realizó en campana de flujo de aire laminar.

4.1.3. Congelación y descongelación de líneas celulares.

Para la congelación, las células recogidas de una placa de cultivo se centrifugan y resuspenden en 450 µL de medio de cultivo, traspasándolas a un tubo criogénico en el cual se añaden 50 µL del compuesto crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA). Rápidamente se introducen en un contenedor para congelación que permite una tasa de enfriamiento de 1°C/min y se llevan a un congelador a -80°C, pasándolas al día siguiente a un tanque de N₂ líquido.

A la hora de descongelarlas, se recupera el vial del N₂ líquido y se descongela manteniéndolo pocos segundos en un baño de agua a 37°C. Rápidamente se pasa la suspensión celular a un tubo falcon con 8 mL de PBS suplementado con 10% de SFB y se centrifuga 5 minutos a 1000 xg para eliminar el DMSO. El precipitado se resuspende en medio de cultivo y se siembra en una placa.

4.1.4. Recuento celular.

Para el recuento celular, tomamos una alícuota de 50 µL en un tubo *eppendorf* de la suspensión celular homogénea previamente recogida (ver apartado 4.1.2.), diluyéndola en un volumen igual de colorante azul trypan (Fluka, 0.4% en NaCl 0.15 M). El contaje se realiza con una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, colocando un cubreobjetos sobre ella, y depositando una gota de la mezcla celular con el colorante, que penetrará entre ambos por capilaridad. La concentración celular se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Nº de cél.}}{\text{mL}} = \frac{\text{Nº de cél. totales contadas} * 10^4 * \text{dilución}}{\text{Nº de cuadrantes contados}}$$

4.1.5. Curvas de crecimiento

Se realizan curvas de crecimiento para determinar la velocidad de crecimiento celular en distintos medios de cultivo (glucosa y galactosa). Se utilizan placas de 12 o 6 pocillos, y se siembran 5 pocillos con 50.000 células/pocillo por cada línea celular en cada uno de los medios. A las dos horas de la siembra, se tripsiniza un pocillo de cada uno de los medios y líneas, se recogen las células en tubos *eppendorf* y se realiza su contaje. Este corresponde al tiempo cero, repitiéndose el contaje cada 24 horas hasta las 96 horas.

Para evaluar la velocidad de crecimiento se calcula el tiempo de duplicación celular o tiempo de doblaje, representando en una gráfica el número de células frente al tiempo, y ajustándolo a una curva exponencial tipo $N=ax10^{bt}$, en la que el tiempo de doblaje se obtiene por la fórmula $D_T = \log 2/b$.

4.2. Extracción de ácidos nucleicos

4.2.1. Extracción de DNA de células en cultivo

Las células en cultivo son recogidas por tripsinización seguida de centrifugación como se indica en el apartado 4.1.2. El pellet celular se resuspende en 250 µL de TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, pH=7.5; EDTA 1 mM), y se añade 1.25 µL de proteinasa K (20 mg/mL), que digiere las proteínas, 5 µL de SDS al 25%, que solubiliza las membranas celulares, y 5 µL de ribonucleasa A (10 mg/mL) para eliminar el RNA. La preparación se incuba a 37°C durante toda la noche.

Seguidamente se realiza una doble extracción de DNA añadiendo 1.5 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, saturado con una disolución de Tris-HCl 10 mM pH=8, EDTA 1 mM), centrifugando 5 minutos a 15700 xg, y recogiendo la fase acuosa. Para aumentar la pureza de la preparación se realiza otra extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). A continuación, se precipita el DNA añadiendo 50 µL de acetato amónico (7.5 M) y dos volúmenes de etanol frío. Se mezcla por inversión y se deja precipitar al menos 3 horas a -20°C. Tras esto, se centrifuga 30 minutos a 15700 xg y 4°C. Se elimina el etanol y se deja secar el pellet de DNA, siendo finalmente resuspendido en Tris-HCl 10 mM; pH=8.

4.2.2. Extracción de RNA de células en cultivo

En la extracción de RNA se trabaja en campana de flujo laminar para evitar la contaminación de RNAsas. Se parte de un pellet celular (ver apartado 4.1.2.) que se lisa con 500 µL de TRIzol®, resuspendiendo fuertemente e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 100 µL de cloroformo, invirtiendo e incubando 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga 15 minutos en una microcentrífuga a 11600 xg y 4°C. De las tres fases obtenidas se aísla la orgánica, a la cual se añaden 250 µL de isopropanol, se invierte, incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 10 minutos a 11600 xg y 4°C.

Se retira el sobrenadante, se añaden 500 µL de etanol al 75% en agua y se centrifuga 5 minutos a 7200 xg y 4°C. Se retira todo el sobrenadante posible y se deja el tubo abierto hasta que se evapore todo el etanol. Finalmente, se disuelve el RNA en 100 µL de agua libre de RNAsas y se incuba 10 minutos a 55-60°C con agitación.

4.2.3. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos previamente extraídos se utiliza el espectrofotómetro microgota NanoDrop®, que da directamente la concentración de la muestra, así como la relación entre absorbancias A_{260}/A_{280} , que se relaciona con el grado de pureza de la muestra, considerándose pura cuando se obtienen valores $\approx 1,8$ para RNA y $\approx 2,0$ para DNA.

4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.3.1. Obtención de cDNA monocatenario

Para obtener cDNA se parte de RNA total aislado de células en cultivo como molde, y se utiliza el kit “*Transcriptor First Strand cDNA Síntesis Kit*” de Roche, en un termociclador T300 de Biometra. Los reactivos utilizados se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Reactivos para la síntesis de cDNA.

	Concentración inicial	Volumen (µL)	Concentración final
Oligo(dT)₁₈	50 mM	1	2.5 mM
RNA	Depende de la muestra	Depende de la muestra	1 µg (0.05 µg/µL)
Tampón	5x	4	1x
Inhibidor de RNAsas	40 U/µL	0.5	20 U
dNTPs	10 mM	2	1 mM
Transcriptasa inversa	20 U/µL	0.5	10 U
H₂O	-	Hasta 20	-

En primer lugar, se prepara la mezcla de RNA, oligos y agua (hasta 13 µL) y se desnaturaliza manteniéndolo a 65°C durante 10 minutos. A continuación, se mezclan con el resto de los reactivos y se lleva a cabo la reacción de retrotranscripción en el termociclador, incubando a 25°C durante 10 minutos y después a 42°C durante 60 minutos. El cDNA obtenido se almacena a -20°C.

4.3.2. PCR en tiempo real

Partiendo tanto de DNA genómico como de cDNA, se realiza PCR en tiempo real utilizando el sistema capilar *LightCycler2.0* junto con el kit *LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I*, ambos de Roche. El programa de PCR se especifica en la tabla C del anexo I.

En cada capilar se mezclan:

- 2 µl de *mastermix*
- 0.25 µl de *primer mix*, mezcla de los cebadores directo y reverso a 5 µM. Las secuencias utilizadas se encuentran en las tablas A y B del anexo I.
- 6.25 µl de H₂O
- 1.5 µl de DNA (4 ng/µl) o cDNA (dilución 1/10)

La PCR en tiempo real a partir de DNA genómico se empleó para cuantificar el número de copias de DNA mitocondrial respecto a nuclear, amplificando un gen que se considera representativo en cada uno de ellos: subunidad A de la succinato deshidrogenasa (SHDA) para el nuclear y subunidad II de la citocromo c oxidasa (COX2) para el mitocondrial. Se calcula basándose en el *cycle threshold* (*Ct*), el número de ciclos a partir del cual la señal de emisión del fluoróforo es detectada por encima del ruido de fondo, siendo inversamente proporcional al número de copias de DNA. Los valores se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Nº Copias mtDNA / nDNA} = 2(2^{\Delta Ct}) \text{ siendo } \Delta Ct = Ct_{\text{nuclear}} - Ct_{\text{mt}}$$

Partiendo de cDNA se cuantificó la expresión tanto de las enzimas antioxidantes manganeso superóxido dismutasa (SOD2) y catalasa (Cat), como del gen de biogénesis mitocondrial factor respiratorio nuclear 1 (NRF1). En estos casos los cálculos se realizaron tomando la expresión de la actina como referencia, ya que se considera constante.

$$\text{Expresión gen X / actina} = (2^{\Delta Ct}) \text{ siendo } \Delta Ct = Ct_{\text{actina}} - Ct_{\text{gen}}$$

En ambos casos los datos se representan tomando las MCF7 como control o referencia, al ser las menos metastásicas.

4.4. Purificación de mitocondrias para análisis por Blue Native – PAGE

Se parte de 5 placas de 150 mm al 80% de confluencia y se recogen las células como se indica en el apartado 4.1.2. lavando el pellet celular dos veces con PBS frío y congelándolo a -80°C hasta el momento de la extracción (al menos durante 10 minutos).

Para la extracción, el pellet se resuspende en un volumen de tampón hipotónico (sacarosa 83 mM, MOPS 10 mM, pH 7.2) igual a 7 veces el del pellet. La suspensión se incuba 2 minutos en hielo y se homogeneiza usando un homogeneizador Potter-Dounce de 2 mL con émbolo de teflón mediante 8-10 pases (“pops”) que permiten la rotura de las células debido al efecto vacío generado. Se añade 1 volumen de tampón hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH 7.2) y se centrifuga 5 minutos a 1000 xg y 4°C para favorecer el precipitado de residuos celulares. El sobrenadante se

reparte en tubos eppendorf y se centrifuga durante 2 minutos a máxima velocidad en una microcentrífuga refrigerada.

Los pellets obtenidos se resuspenden en medio A (sacarosa 0.32 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=7.4), juntando los de 2 tubos en uno y repitiendo el proceso de lavado y centrifugación hasta tener todas las mitocondrias en un tubo. A continuación, se resuspende el pellet final en 500 µL de medio A y se toman 4 µL para medir la concentración de proteína mediante el método de Bradford (apartado 4.5.1).

La muestra se sedimenta 2 minutos a 13400 xg y 4°C, y se resuspende en el volumen necesario para obtener una concentración final de 10 µg/µL. También se añade el detergente suave digitonina para lisar las mitocondrias, a una concentración de 4 g/g de proteína mitocondrial, incubándose en hielo durante 5 minutos. Finalmente, la muestra se centrifuga 30 minutos a 15700 xg y 4°C, recogiendo el sobrenadante y congelándolo a -80°C. Normalmente, antes de congelar las muestras, se les añade 1/3 de volumen de azul trypan (Blue G 5%), quedando ya totalmente listas para cargarlas en el gel de Blue Native.

4.5. Análisis de proteínas

4.5.1. Cuantificación de proteínas por método de Bradford.

La cuantificación de proteínas de muestras de mitocondrias (apartado 4.4) se realiza mediante espectrofotometría, utilizando el método de Bradford. Se preparan 6 standards que contienen distintas cantidades de 0 a 20 µg de albúmina sérica bovina (BSA). Tanto los standars como las muestras se llevan a un volumen de 800 µL y se les añade 200 µL del reactivo de Bradford (BioRad). Todos se mezclan para que desarrollen el color y se mide su absorbancia a 595 nm. Con los standards se construye una recta de calibrado en la que se interpolan los valores de absorbancia de las muestras, calculando su concentración proteica.

4.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida “Blue Native”.

Los geles en gradiente de poliacrilamida permiten la resolución de complejos proteicos formados por varias proteínas, en este caso se utilizan para separar los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Se utilizan geles comerciales NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris de Invitrogen™ con un gradiente del 3% al 12% de poliacrilamida. Tras montar el gel en el soporte adecuado, y en la cámara fría, se añaden los tampones del cátodo A y del ánodo, también comerciales. Se cargan las muestras de mitocondrias aisladas, permeabilizadas con digitonina y mezcladas con 1/3 de volumen del tampón de carga (Blue G 5%), de manera que obtengamos unos 70-100 µg de mitocondrias en cada pocillo y se inicia la electroforesis a un voltaje constante de 80V hasta que las muestras entran completamente en el gel (aproximadamente 30 minutos). A partir de entonces, aumentamos la corriente a 150V y se mantiene así hasta que el colorante sale del gel. En el caso de que el gel se vaya a usar para ensayos de actividad en gel (IGA), cuando las muestras han avanzado 5-7 cm en el gel, se cambia el tampón del cátodo A por el del B, que presenta una concentración menor de colorante.

4.5.3. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfieren a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante el sistema de transferencia húmeda. Se corta un fragmento de membrana PVDF (Hybond-P de Amersham) de tamaño similar al del gel a transferir, se sumerge en metanol 10 segundos y se lava 5 minutos con agua destilada. La membrana se equilibra con tampón de transferencia (BSN: Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20% (v/v)) durante 10 minutos, sumergiendo también el gel en este tampón el mismo tiempo.

En el sándwich de transferencia se colocan del polo negativo al positivo y sumergidos en tampón de transferencia: una esponja, 2 papeles Whatman 3MM, el gel, la membrana, otros 2 papeles, y otra esponja. Este se coloca en su soporte, se añade un bloque de hielo y se cubre con tampón de transferencia, dejándolo a una corriente constante de 100V durante 1 hora o a 30V toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, la membrana se lava con metanol y por último con PBS-T (Tween20 al 0.1% en PBS). Las membranas permanecen sumergidas en PBS-T y a 4°C hasta su uso.

4.5.4. Inmunodetección de proteínas por Western-blot.

La membrana a la cual se han transferido las proteínas previamente separadas por electroforesis se utiliza para la detección de estas mediante anticuerpos. Los anticuerpos empleados y sus diluciones se encuentran la tabla D (anexo I). Todas las incubaciones y lavados se realizan en un agitador orbital a temperatura ambiente durante el tiempo indicado, o toda la noche en la cámara fría a 4°C.

En primer lugar, se bloquea la membrana incubándola en una disolución de leche (leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T) durante al menos 1 hora. Tras este tiempo, se elimina el exceso de agente bloqueante lavando varias veces con PBS-T.

El anticuerpo primario comercial se diluye en PBS-T con 0.1% de leche en polvo, y se incuba la membrana con el mismo durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. A continuación, se lava la membrana con PBS-T una vez durante 10 minutos y otras 2 veces 5 minutos. El anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano) se diluye a una proporción 1:5000 en PBS-T con 0.1% de leche, y se incuba con él la membrana durante mínimo 45 minutos. Finalmente, se realiza un lavado de 15 minutos y otros tres de 5 minutos con PBS-T.

Las proteínas de interés se detectan mediante la reacción de la enzima peroxidasa de rábano, conjugada al anticuerpo secundario. Para darse esta reacción, se mezcla el mismo volumen de solución de peróxido (reactivo 1) y de luminol (reactivo 2) (*Thermo scientific*), y se incuba la membrana con esta mezcla durante 1 minuto. La quimioluminiscencia se detecta mediante el revelador Amershan Imager 600.

4.5.5. Reutilización de las membranas

Los anticuerpos ya unidos a proteínas fijadas en membranas pueden ser eliminados con el fin de reutilizar las mismas en nuevas inmunodetecciones. Para ello, se incuba la membrana con solución de *stripping* (2-mercaptopropanoalcohol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 1 M pH=6.7) a 58°C durante 30 minutos. Tras este tiempo, se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS-T a temperatura ambiente.

4.5.6. Ensayos de actividad en gel (IGA)

Para evaluar la actividad de los complejos respiratorios directamente sobre el gel de Blue Native, una vez desarrollada la electroforesis, el gel se sumerge en una disolución con los sustratos adecuados a la actividad a ensayar y se incuba a temperatura ambiente hasta que aparezcan bandas de precipitado.

Para el complejo I, se prepara NADH 0.14 mM y NBT 1 mg/mL en Tris-HCl 0.1 M pH=7.4. En el caso del complejo IV, se prepara DAB 0.05% y citocromo C 50 mM en KPi 50 μM pH=7.4.

4.6. Medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo

En la detección de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se utilizan dos reactivos: dihidroetidio (DHE, Life Technologies), que detecta el anión superóxido O_2^{2-} por la formación de 2-hidroetidio (2HE); y dihidrodiclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, Invitrogen), capaz de detectar el ión superóxido (O_2^{2-}) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la formación de diclorofluoresceína (DCF).

Las células en cultivo son recogidas (unas 10^5), lavadas con PBS, e incubadas con DHE o H₂DCF-DA a 2 y 20 μM respectivamente, durante 30 minutos a 37°C. Realizado el marcaje, las muestras se lavan con PBS y se pasan por el citómetro de flujo.

4.7. Medida de función de la enzima citrato sintasa.

La actividad enzimática de citrato sintasa se determina por espectrofotometría partiendo de extractos celulares, y utilizando la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{\Delta A/\text{min} * 10^3 (\mu\text{M}/\text{mM}) * \text{dilución}}{\epsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) * L (1 \text{ cm})}$$

- ΔA/minuto: Incremento de la absorbancia por minuto
- ε: Coeficiente de extinción molar del reactivo que absorbe a la longitud de onda de trabajo y cuya concentración varía en el transcurso de la reacción.
- L: Anchura del paso de luz (1 cm)
- U.I.: micromoles de sustrato transformados en un minuto

La función de la enzima citrato sintasa se determina mediante el incremento de la absorbancia de las muestras a 412 nm debida a la formación de la forma aniónica del DTNB ($\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) tras añadir 250 μmoles de oxalacetato como iniciador. La medida se realiza a 30°C durante el intervalo de un minuto.

Los reactivos se prepararon como se indica a continuación:

- Tampón de medida: Tris-HCl 10 mM pH=8
- Acetyl CoA: 7 mg/mL
- DTNB: (Ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzóico) 1 mM 2 mg en 5mL de tampón de medida (FRESCO)
- Oxalacetato 50mM (OAA) 33 mg en 5 mL de agua (FRESCO)
- Tritón X-100 10 %, 1 mL en 10 mL de agua

La mezcla de reacción se preparó como se indica en la tabla E (anexo I).

4.8. Medida de la funcionalidad de la cadena de transporte electrónico

El funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial de las diferentes líneas celulares se evalúa midiendo el consumo de oxígeno de cada una de ellas. Para ello se utiliza un electrodo de oxígeno tipo Clark termostatizado (Oxytherm, Hansatech Instrument) y los datos obtenidos se registran en un PC utilizando el programa Oxygraph Plus V1.00 (Hansatech Instruments).

Antes de comenzar con las medidas, se fija la temperatura a 37°C y se calibra el aparato, estableciendo el cero con el agente oxidante ditionito de sodio. Partimos de células cultivadas en placas de 150 mm y recogidas mediante tripsinización y centrifugación. El pellet se resuspende en el volumen adecuado para una concentración de 5×10^6 cél/mL y se introduce 1 mL en la cámara de reacción del aparato, manteniéndose siempre con agitación magnética. Se registra así la medida de la respiración endógena, y tras 2-3 minutos se añaden 10 µL de DNP 6.5 mM para desacoplar la cadena de transporte de electrones de la síntesis de ATP y así detectar la máxima capacidad OXPHOS. Transcurridos otros 2-3 minutos se añaden 10 µL de KCN 400 mM, que inhibe el consumo de oxígeno. Estas disoluciones se añaden mediante jeringas Hamilton. Después de cada medida, la cámara de reacción se lava con agua.

4.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se realizó mediante el programa StatView 5.0, calculando siempre la media y la desviación estándar. A los conjuntos de datos se les aplicó el test de análisis de la varianza (ANOVA) para determinar su dispersión y para encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se utilizó el test de la t de Student (post hoc Fisher's).

5. RESULTADOS

5.1. Funcionalidad del sistema OXPHOS

En este proyecto se ha trabajado con tres líneas celulares con diferente capacidad de invasión, siendo la MDA-MB231 la más invasiva y MCF7 la menor, mientras que MDA-MB468 representa un estado intermedio. Una característica común de las células tumorales es la adquisición del fenotipo Warburg, aumentando la tasa glucolítica y la fermentación láctica en detrimento de la fosforilación oxidativa. Para comprobar el cambio de fenotipo analizamos las características de su metabolismo y su función OXPHOS mediante ensayos de crecimiento celular en dos medios de cultivo diferentes: medio con glucosa, que es fermentativo y permite sobrevivir a todas las células, y medio con galactosa, en el que solo sobrevivirán las células con un sistema OXPHOS funcional.

Los tiempos de duplicación celular (D_t) obtenidos para cada línea celular se muestran en la figura 4. Las líneas MCF7 y MDA468 sobreviven y crecen correctamente en ambos medios de cultivo, siendo más lentas las primeras, mientras que las MDA-MB231 tienen un tiempo de duplicación muy bajo en el medio de glucosa, pero en el de galactosa crecen muy lentamente y acaban muriendo, indicando una alta dependencia por la glucosa y posiblemente una deficiencia del sistema OXPHOS.

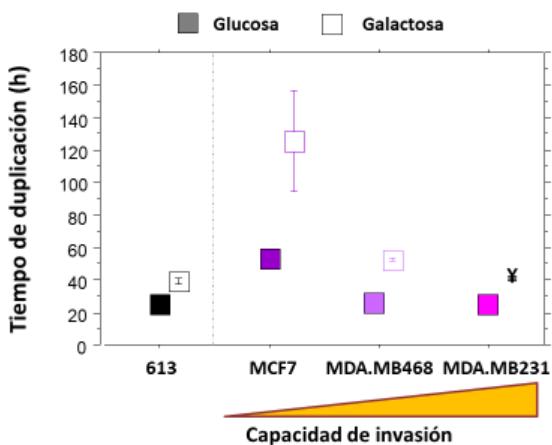


Figura 4. Tiempo de duplicación celular en medio de glucosa y de galactosa. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. ¥: las células no sobreviven y no se puede calcular el D_t . La línea celular 613 se utiliza como control del crecimiento en ambos medios.

Para comprobar la funcionalidad de la cadena de transporte electrónico también se estudió la capacidad de respiración mitocondrial de las líneas celulares midiendo el consumo de oxígeno en células intactas. Se establece así una tasa de respiración endógena, que indica el consumo basal en las células, y una tasa de respiración desacoplada, que representa la máxima actividad del sistema OXPHOS para cada línea. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 5.

Comparando la respiración endógena de las tres líneas celulares destaca la diferencia entre el elevado consumo de las MCF7 y el de las MDA-MB468, mucho menor. Estas diferencias se compensan cuando se desacopla la cadena respiratoria de la síntesis de ATP, sin diferencias significativas entre las líneas, y siendo en las MDA-MB468 donde se da el mayor aumento del consumo de oxígeno tras desacoplarse. Dado que las MDA-MB231 mueren en el medio de galactosa como hemos visto anteriormente, esperábamos una baja respiración mitocondrial que también indicase una deficiencia en OXPHOS, sin embargo, los resultados indican un elevado consumo de oxígeno.

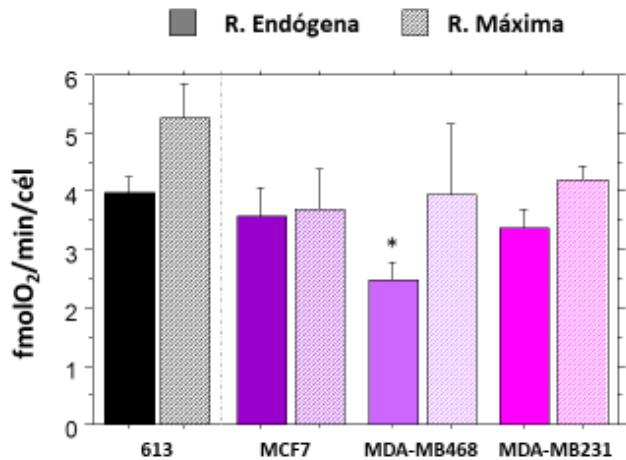


Figura 5. Respiración endógena y máxima. Consumo de oxígeno representado como fmol de O₂ consumidos por célula y por minuto. La línea celular 613 es el control. Los datos se representan como la media ± desviación estándar y el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre líneas celulares procedentes de cáncer de mama. Los valores de p se recogen en el anexo II. A.

A la vista de estos resultados no esperados estudiamos la actividad OXPHOS a nivel de complejos respiratorios individuales mediante ensayos de *In Gel Activity* (IGA), que también aportan información sobre las asociaciones de complejos, analizando en concreto la actividad NADH deshidrogenasa del CI y la actividad citocromo c oxidasa del CIV.

En la figura 6A se muestra el resultado obtenido para el CI, que forma parte de varios supercomplejos y prácticamente no aparece en su forma libre. Las líneas MCF7 y MDA-MB468 presentan el mismo patrón de bandas, siendo diferente el de las MDA-MB231 que, además, presentan menos actividad. El ensayo del CIV se muestra en la figura 6B, en la que vemos bandas tanto en su forma libre como en forma dimérica y asociado a otros complejos. Se observa el mismo patrón de bandas para las MCF7 y MDA-MB468, mientras que éste varía en las MDA-MB231 con algunas bandas más tenues y otras que desaparecen, como las correspondientes al CIV dimérico y a los supercomplejos, siendo el CIV monomérico la forma mayoritaria.

Estos resultados sí coinciden con lo esperado tras el ensayo de crecimiento celular en glucosa y galactosa, demostrando una deficiencia en la actividad de los complejos respiratorios en la línea celular MDA-MB231.

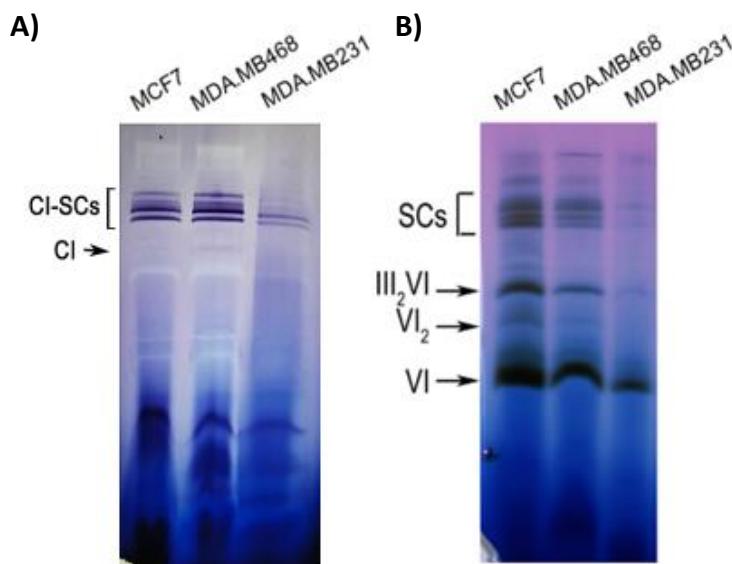


Figura 6. Resultado del ensayo de *In Gel Activity*. A) CI. B) CIV. En ambos casos el orden de las muestras es de menor a mayor capacidad de invasión de las células tumorales. En todas las calles se cargó la misma cantidad de proteína mitocondrial (100 µg).

5.2. Organización de los complejos y supercomplejos respiratorios

Estudios recientes del grupo de investigación usando como modelo células de ratón, demuestran la existencia de patrones distintos de SCs en líneas celulares con mayor capacidad metastásica (23), lo cual también se intuye en los resultados del IGA (figura 6). Para confirmar estas diferencias en la organización y ensamblaje de los complejos y supercomplejos (SCs) en nuestras líneas celulares, se llevaron a cabo ensayos de electroforesis en geles *Blue Native* (BN) seguidas de *Western Blot* (WB), utilizando anticuerpos específicos para cada uno de los complejos respiratorios (ver anexo I, tabla D).

En la figura 7A se muestra la inmunodetección del complejo I, que aparece asociado a otros complejos formando SCs con un patrón diferente en cada línea celular, con bandas muy intensas en la línea MDA-MB468, mientras que no es visible en las MCF7, pero esto puede deberse a un error en la carga de la muestra o en la transferencia a la membrana, cuando realmente estas células sí presentan CI como se demuestra en el IGA (figura 6A) o en las asociaciones del CIII para formar SCs (figura 7C). El complejo II (figura 7B) presenta el mismo patrón en las tres líneas celulares, apareciendo de forma libre y sin formar ningún SC, aunque en las MCF7 parece haber menos proteína. En cuanto al complejo III (figura 7C), está presente en las tres líneas celulares en su forma dimérica y asociado al CIV aunque, en ambos casos, en menor cantidad en las MDA-MB231. También forma diversos SCs con un patrón que varía para cada línea celular, pero cuyas bandas son especialmente intensas en las MDA-MB468. Por último, en la figura 7D se muestra el resultado correspondiente al complejo CIV, que aparece en todas las líneas en su forma libre, mientras que su forma dimérica y asociación con el CIV no se observa en las MDA-MB231. Podemos afirmar por tanto que en células humanas de tumores de mama el patrón de SCs varía según su capacidad de invasión.

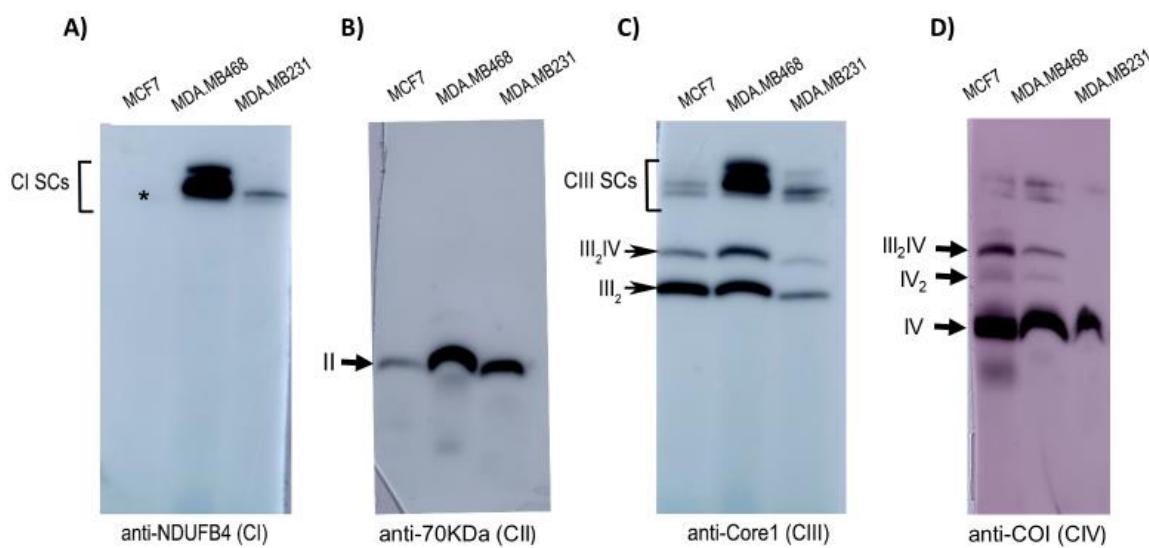


Figura 7. Resultados del *Western-Blot* de los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico. A) Complejo I. La carga de MCF7 es menor que las demás muestras, el asterisco indica que deberían aparecer bandas correspondientes a SCs. B) Complejo II. C) Complejo III. Las bandas de SCs de CIII corresponden a asociaciones con CI y CI+IV. D) Complejo IV. Las bandas que no se indican corresponderían a restos del CI, debido a que es la misma membrana reutilizada tras el proceso de *stripping*.

5.3. Especies reactivas de oxígeno

El aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) es otra característica definida para las células tumorales, en las que actúan como mutágenos y mitógenos, contribuyendo así al desarrollo tumoral. Su acumulación progresiva suele ir acompañada del incremento en la expresión de enzimas detoxificadoras de ROS para evitar una muerte por apoptosis o necrosis. Además, los ROS mantienen una relación bidireccional con los SCs afectándose mutuamente, y vistas anteriormente las diferencias en el patrón de SCs, pasamos a estudiar los ROS en las tres líneas celulares.

El nivel de ROS se determinó mediante citometría de flujo marcando las células con los reactivos H₂DCF-DA y DHE. El primero se convierte en DCF en presencia de ROS entre los que se incluyen el ión superóxido (O_2^{2-}) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), mientras que el segundo se transforma en 2HE exclusivamente en presencia de O₂²⁻. En la figura 8 vemos sus espectros de emisión de fluorescencia, a la izquierda DCF, y a la derecha 2HE, acompañados de una tabla con las intensidades de fluorescencia para todos los casos. La línea MDA-MB231 presenta mayor fluorescencia en ambos casos indicando un mayor nivel de ROS debido principalmente a O₂²⁻, mientras que entre las otras dos líneas celulares no hay grandes diferencias, llegando a superponerse sus espectros de emisión.

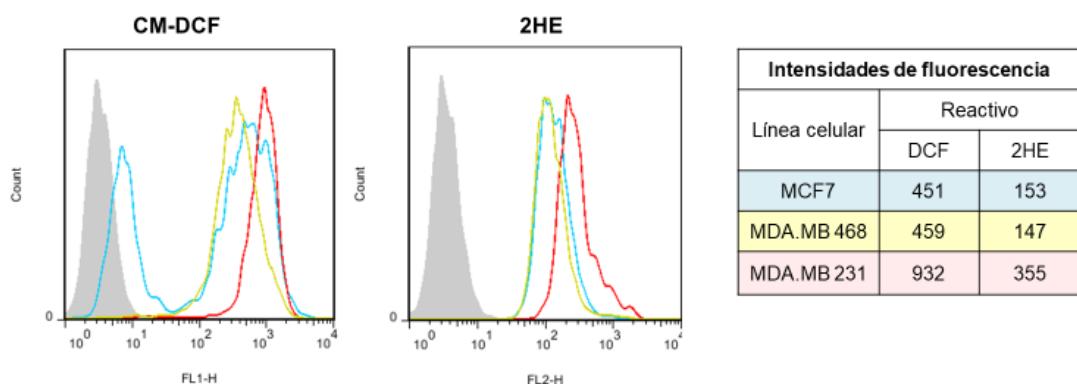


Figura 8. Niveles de ROS. Se representan los histogramas de emisión de fluorescencia, de DCF a la izquierda y 2HE a la derecha, detectados para las tres líneas celulares, cada una dibujada en un color: MCF7 en cian, MDA-MB468 en amarillo y MDA-MB231 en rojo. El área en color gris corresponde a restos celulares sin marcar, y el primer pico que se observa en las MCF7 marcadas con DCF es debido a un marcaje inespecífico.

En cuanto a la expresión de enzimas detoxificadoras, se determinó el número de copias de las enzimas manganeso superóxido dismutasa (SOD2) y catalasa mediante PCR cuantitativa. Los resultados (figura 9) indican que los niveles de catalasa aumentan conforme lo hace la capacidad de invasión de las células tumorales, mientras que los niveles de SOD2 son especialmente elevados en MDA-MB468, sin diferencias significativas entre MCF7 y MDA-MB231.

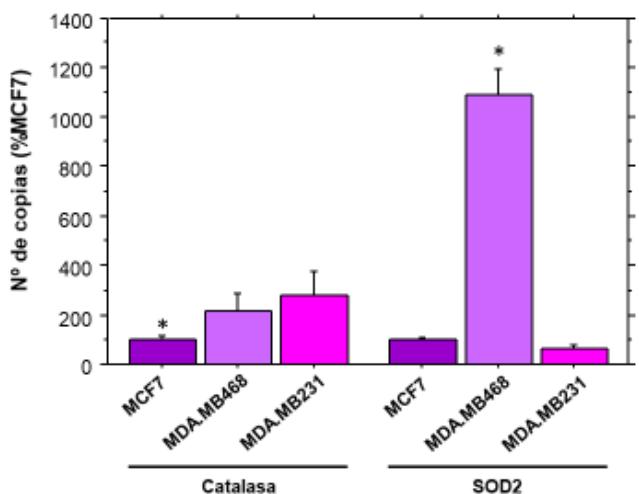


Figura 9. Niveles de expresión de enzimas detoxificadoras de ROS. A la izquierda los datos de la catalasa y a la derecha SOD2. Los datos se representan como la media ± desviación estándar y se expresan como porcentajes proporcionales a MCF7. El asterisco indica unas diferencias con las otras líneas estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los valores de p se recogen en el anexo II.B.

5.4. Diferencias en la masa, biogénesis y nivel de DNA mitocondriales

La presencia de daños en el DNA mitocondrial (mtDNA) es una característica muy común en las células tumorales, posiblemente debidos a su proximidad física en la mitocondria con los ROS, cuyos niveles también aumentan en células tumorales como hemos visto anteriormente. Estos daños en ocasiones son mutaciones puntuales y en otras cambios en el número de copias de mtDNA, por lo que medimos este parámetro mediante PCR cuantitativa. Los resultados (figura 10) indican una gran cantidad de copias de mtDNA en las MCF7, en contraste con las otras dos líneas celulares entre las que no hay diferencias significativas.

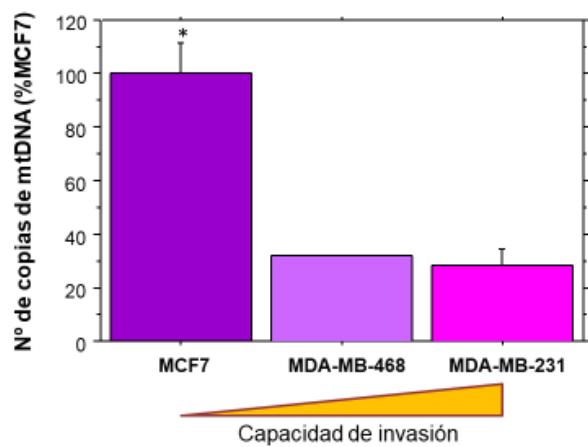


Figura 10. Nº de copias de mtDNA. Los datos se representan como la media ± desviación estándar y se expresan como porcentajes en proporción a MCF7. El asterisco indica unas diferencias con las otras líneas estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los valores de p se recogen en el anexo II.C.

Evaluamos también las posibles diferencias en la biogénesis mitocondrial midiendo por PCR cuantitativa el nivel de expresión del factor respiratorio nuclear 1 (NRF1). Este gen es un factor de transcripción que promueve la expresión de otros genes, que a su vez son esenciales para la regulación del crecimiento celular, la respiración, y la transcripción y replicación del DNA mitocondrial, teniendo un importante papel en la regulación de la biogénesis mitocondrial y la fosforilación oxidativa (21). En la figura 11 podemos ver los resultados del número de copias de este gen, que disminuye conforme aumenta la capacidad de invasión de las células, con diferencias significativas entre las tres líneas.

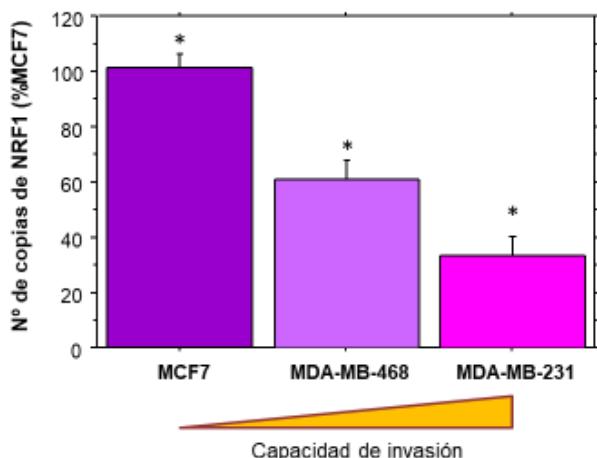


Figura 11. Nº de copias de NRF1.
Los datos se representan como la media \pm desviación estándar y se expresan como porcentajes en proporción a MCF7. El asterisco indica unas diferencias con las otras líneas estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los valores de p se recogen en el anexo II.D.

Los resultados obtenidos para el número de copias de mtDNA y de NRF1 concuerdan con lo observado respecto a diferencias en la masa mitocondrial, medida como actividad específica de la enzima citrato sintasa (CS) en homogenado celular total (figura 12). Se confirma así un descenso en la masa mitocondrial paralelo al incremento en la capacidad metastásica de las células tumorales.

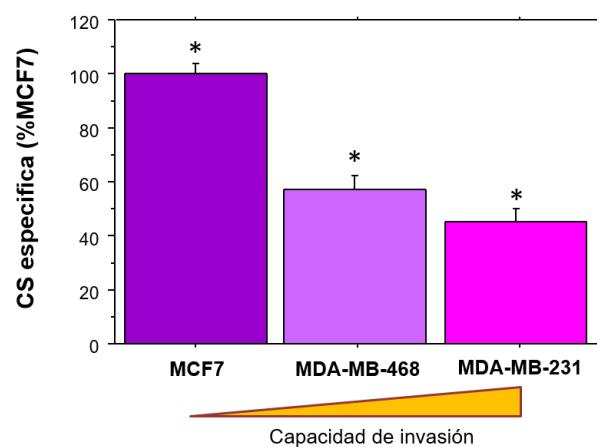


Figura 12. Actividad citrato sintasa específica. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar y se expresan como porcentajes en proporción a MCF7. El asterisco indica unas diferencias con las otras líneas estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los valores de p se recogen en el anexo II.E.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los supercomplejos respiratorios y las especies reactivas de oxígeno guardan una relación reciproca entre ellos: los ROS afectan a la función y estabilidad de los complejos y la organización de estos afecta a la producción de los primeros. Este TFG se planteó con el objetivo de discernir las características y el papel de esta relación en el desarrollo del cáncer y la metástasis, estudiando las diferencias mitocondriales que presentan tres líneas celulares de cáncer de mama con diferentes capacidades de invasión.

Con el estudio de la organización de los complejos y formación de supercomplejos hemos demostrado que estas varían dependiendo de la capacidad metastásica de las células, siendo particularmente significativas las diferencias en la línea celular MDA-MB231, con la mayor capacidad de invasión, que presentan menor formación de supercomplejos. Evaluando también la actividad de estos complejos vemos que en esta línea celular no solo hay deficiencias en la organización de SCs sino también en la actividad de su sistema OXPHOS. Sin embargo, sorprende su alta capacidad de respiración mitocondrial, característica de una cadena de transporte electrónico funcional, aunque probablemente menos eficiente.

Los niveles de producción de ROS son especialmente elevados en la línea MDA-MB231, que podría explicar las deficiencias en sus sistema OXPHOS por daños oxidativos, afectando tanto a la funcionalidad de los complejos como al ensamblaje de SCs. La expresión de catalasa aumenta conforme lo hace la capacidad metastásica como es esperado para contrarrestar el aumento de ROS, sin embargo, destaca el alto número de copias de SOD2 en las MDA-MB468. Esta alta defensa antioxidante explicaría sus bajos niveles de ROS y la alta formación de SCs, especialmente con el CIII, en un estado intermedio del proceso de metástasis en el que aumenta la detoxificación de ROS para prevenir sus daños. No obstante, habría que confirmar que los niveles de expresión de SOD2 se correlacionan con el de proteína funcional.

Al impedir la formación de SCs, disminuye la eficacia de la transferencia de electrones y aumenta así la producción ROS. A su vez, el fallo en los complejos imposibilita el uso de la fosforilación oxidativa como fuente de energía, desplazándose hacia el fenotipo Warburg. Los fallos observados en la función OXPHOS y el cambio en el metabolismo, también concuerdan con los resultados observados de disminución en la masa mitocondrial paralelo al aumento de la capacidad de invasión de las células.

A la vista de los resultados obtenidos podemos afirmar que la relación entre SCs y ROS juega un papel de importancia en el desarrollo del cáncer, afectando a la eficiencia de la fosforilación oxidativa y al metabolismo energético de las células. Estos ensayos se han realizado únicamente en tres líneas celulares de tumores de mama, por lo que para establecer unas asociaciones de forma general en los procesos oncogénicos sería necesario un estudio más amplio en cuanto a tipos celulares y estadios tumorales, así como analizar el comportamiento de líneas celulares no tumorales procedentes del mismo tipo de tejido.

7. CONCLUSIONES

- Las células de tumores más metastásicos presentan deficiencias en la funcionalidad de su sistema OXPHOS, relacionada con el cambio de su metabolismo hacia un fenotipo Warburg.
- El patrón de organización de complejos y supercomplejos respiratorios varía en las células con diferente capacidad de invasión, disminuyendo drásticamente la formación de SCs en las células más invasivas.
- Los niveles de ROS son especialmente elevados en la línea células más metastásica, mientras que en un estadio intermedio cuentan con una gran defensa antioxidante.
- Las copias de mtDNA y la biogénesis mitocondrial disminuyen conforme aumenta la capacidad de invasión de las células.

7. CONCLUSIONS

- *Highly-metastatic cells show OXPHOS deficiency, related to their metabolic switch to a Warburg phenotype.*
- *The respiratory complex and supercomplex organization pattern varies in cells with different invasion capacity, with SCs assembly drastically diminishing in the highly- invasive cells.*
- *ROS levels are significantly increased in highly-invasive cells, while intermediate-stage cells have a strong antioxidant defence.*
- *mtDNA copy number and mitochondrial biogenesis decrease as cell invasion capacity increases.*

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Weinberg RA. The Biology of Cancer. 2nd ed. New York: Garland Science; 2006.
2. Alberts, Bruce; Johnson Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter P. Molecular Biology of the Cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
3. Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70
4. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
5. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(10):685-698.
6. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956;123(3191):309-314
7. Solaini G, Sgarbi G, Baracca A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807(6):534–42.
8. Rodic S, Vincent M. Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype. *International Journal of Cancer*. 2017;142(3):440-448.
9. Anderson R, Ghiraldeli L, Pardee T. Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2018;1870(1):96-102
10. Cavalli R, Varella-Garcia M, Liang C. Diminished tumorigenic phenotype after Depletion of mitochondrial DNA. 1997;8(November):1189–98
11. Ma Y, Bai R, Trieu R, Wong L. Mitochondrial dysfunction in human breast cancer cells and their transmtochondrial cybrids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2010;1797(1):29-37.
12. Keilin D, Hartree E. Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. *Biochemical Journal*. 1947;41(4):500-502.
13. Green D, Tzagoloff A. The mitochondrial electron transfer chain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1966;116:293-304.
14. Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*. 2000;19(8):1777-1783.
15. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato M, Pérez-Martos A, Enriquez J. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*. 2008;32(4):529-539.
16. Acín-Pérez R, Enriquez J. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014;1837(4):444-450.
17. Moreno-Loshuertos R, Enríquez J. Respiratory supercomplexes and the functional segmentation of the CoQ pool. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;100:5-13.
18. Klaunig J, Kamendulis L. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2004;44(1):239-267.

19. Assi M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2017;313(6):R646-R653.
20. Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St. Clair D et al. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(5):794-814
21. Maranzana E, Barbero G, Falasca A, Lenaz G, Genova M. Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;19(13):1469-1480.
22. Gasparre G, Porcelli A, Lenaz G, Romeo G. Relevance of Mitochondrial Genetics and Metabolism in Cancer Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(2):a011411.
23. Marco-Brualla J, Al-Wasaby S, Soler R, Romanos E, Conde B, Justo-Méndez R, et al. Mutations in the ND2 Subunit of Mitochondrial Complex I Are Sufficient to Confer Increased Tumorigenic and Metastatic Potential to Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):1027.
24. Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information – . Accession No. 4899, NRF1 nuclear respiratory factor 1 [Homo sapiens (human)]; [cited 2019 Sep 08]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4899>

9. ANEXOS

Anexo I: Tablas de Materiales y Métodos

A. Cebadores usados para PCR en tiempo real con cDNA como molde

Gen	Oligo	Posición	Secuencia
NRF1 (NM_005011)	<i>hNRF1 RTF</i>	1165-1185	GCTGATGGAGAGGTGGAACAA
	<i>hNRF1 RTR</i>	1213-1231	GCGTCGTCTGGATGGTCAT
SOD2 (NM_000636.4)	<i>hSOD2 RTF</i>	572-591	TCAGGATCCACTGCAAGGAA
	<i>hSOD2 RTR</i>	598-617	CGTGCTCCCACACATCAATC
CATALASA (NM_001752.4)	<i>hCAT RTF</i>	320-339	GGCCTTGCTACTTGAGG
	<i>hCAT RTR</i>	403-422	CCGATTCTCCAGAACAGTG
<i>hActb</i> (NM_001101)	<i>hActin RTF</i>	419-438	CGCGAGAAGATGACCCAGAT
	<i>hActin RTR</i>	468-489	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA

B. Cebadores usados para PCR en tiempo real con DNA genómico como molde

Gen	Oligo	Posición	Secuencia
<i>mt-Co2</i> (NC_001807)	<i>hCOII RTF</i>	7859-7878	CGATCCCTCCCTTACCATCA
	<i>hCOII RTR</i>	7905-7927	CCGTAGTCGGTGTACTCGTAGGT
<i>SdhA</i> (AF171018)	<i>hSDH RTF</i>	224-244	TCTCCAGTGGCCAACAGTGTT
	<i>hSDH RTR</i>	276-295	GCCCTCTTGTCCCCATCAAC

C. Programa de PCR en tiempo real

Desnaturalización	95°C	10 minutos	1 ciclo
Cuantificación	95°C	10 segundos	55 ciclos
	60°C (*)	10 segundos	
	72°C	10 segundos	
Melting	95°C	0 segundos	1 ciclo
	65°C	15 segundos	
	98°C	0 segundos (0.1°C/s)	
Enfriamiento	40°C	30 segundos	1 ciclo

(*): Esta temperatura depende de los cebadores utilizados.

D. Anticuerpos empleados en inmunodetecciones

	<i>Ab primario (dilución)</i>	<i>Proteína</i>	<i>Ab secundario (dilución)</i>
Complejo I	Anti-NDUFB4 (1:5000)	NDUFB4	Anti-ratón (1/5000)
Complejo II	Anti-70KDa (1:5000)	SHDA	Anti-ratón (1/5000)
Complejo III	Anti-Core1 (1:5000)	UQCRC1	Anti-ratón (1/5000)
Complejo IV	Anti-COI (1:10000)	MT-CO1	Anti-ratón (1/5000)

E. Reacción de la citrato sintasa

	<i>Concentración stock</i>	<i>Volumen (μL)</i>	<i>Concentración final</i>
Buffer	10 mM	876.7	~10 mM
Acetil-CoA	7 mg/mL	3.3	0.023 mg/mL
DTNB	1 mM	100	0.1 mM
Muestra	-----	5	----
Tritón X-100	10%	10	0.1%
OAA (oxalacetato)	50 mM	5	0.25 mM

Anexo II: Análisis estadístico de los resultados

A. Capacidad respiratoria

Fisher's PLSD for Resp. endógena

Efect: Línea celular

Significance Level: 5 %

Row exclusion: Respiración tumorales.ssd

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
MCF7, MDA-MB231	-,167	,586	,5537	
MCF7, MDA-MB468	,845	,606	,0095	S
MDA-MB231, MDA-MB468	1,012	,557	,0015	S

Fisher's PLSD for Resp. desacopl.

Efect: Línea celular

Significance Level: 5 %

Row exclusion: Respiración tumorales.ssd

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
MCF7, MDA-MB231	-,514	1,187	,3664	
MCF7, MDA-MB468	-,240	1,187	,6693	
MDA-MB231, MDA-MB468	,274	1,062	,5864	

B. Enzimas detoxificadoras de ROS

Fisher's PLSD for SOD2 (% MCF7)

Efect: Línea celular

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
MCF7, MDA-MB231	44,660	98,231	,3306	
MCF7, MDA-MB468	-987,428	98,231	<,0001	S
MDA-MB231, MDA-MB468	-1032,088	98,231	<,0001	S

Fisher's PLSD for Cat (% MCF7)

Efect: Línea celular

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
MCF7, MDA-MB231	-177,303	114,655	,0081	
MCF7, MDA-MB468	-114,377	114,655	,0504	
MDA-MB231, MDA-MB468	62,927	122,571	,2641	S

C. Número de copias de mtDNA

Fisher's PLSD for N Copias mtDNA

Efect: Línea celular

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
MCF7, MDA-MB-231	72,100	11,108	<,0001	
MCF7, MDA-MB-468	68,200	15,709	<,0001	S
MDA-MB-231, MDA-MB-468	-3,900	15,709	,5957	S

D. Número de copias de NRF1

Fisher's PLSD for N Copias Nrf1

Efect: Línea celular

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
MCF7, MDA-MB-231	68,140	12,284	<,0001	
MCF7, MDA-MB-468	40,797	12,284	,0002	S
MDA-MB-231, MDA-MB-468	-27,343	12,284	,0016	S

E. Actividad CS específica

Fisher's PLSD for CS esp (%)

Efect: Línea celular

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
MCF7, MDA-MB-231	54,767	9,405	<,0001	
MCF7, MDA-MB-468	43,367	9,405	<,0001	S
MDA-MB-231, MDA-MB-468	-11,400	9,405	,0251	S