

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



"Remodelamiento metabólico en células de cáncer de mama: Rol de la bioenergética mitocondrial en la proliferación celular y en el diseño de compuestos con potencial acción anti-tumoral"

Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Farmacología

Por:

FÉLIX A. URRA

Director de Tesis

Dr. Jorge Ferreira Parker
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa de Farmacología Molecular y
Clínica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Co-director de Tesis

Dr. César Cárdenas
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa de Anatomía y Biología del
Desarrollo
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2016

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Reprogramación metabólica en células tumorales	1
1.2 Remodelamiento metabólico como respuesta adaptativa de células tumorales	2
1.3 Mitocondria: Rol de la cadena transportadora de electrones en la sobrevivencia de células tumorales	5
1.4 Metabolismo de células de cáncer de mama: un potencial blanco farmacológico para acciones anti-tumorales	6
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVO GENERAL	9
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Modelos celulares	10
5.2 Compuestos usados en este estudio: preparación y titulación de su efecto	10
5.3 Medición del metabolismo en tiempo real	11
5.4 Evaluación de la glicólisis usando Seahorse	12
5.5 Determinación del consumo de glucosa	13
5.6 Preparación de mitocondrias aisladas desde células TA3/Ha y respiración mitocondrial	13
5.7 Preparación de partículas submitocondriales	14
5.8 Determinación del flujo de electrones mitocondrial en células MCF7 permeabilizadas	14
5.9 Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), niveles de ATP, ROS y razón $NAD^+/NADH$	14
5.10 Determinación de la proliferación celular	15
5.11 Ciclo celular y senescencia celular	16
5.12 Viabilidad celular y crecimiento celular	16
5.13 Masa mitocondrial	17
5.14 Cuantificación de los niveles de α -cetoglutarato (aKG), aspartato y glutamina	17
5.15 Búsqueda de factores de riesgo usando el algoritmo BreastMark	17

5.16 Western blot	18
5.17 Análisis estadístico	18
6. RESULTADOS	
6.1. Líneas celulares de cáncer de mama tienen diferente perfil bioenergético que las células no-tumorales	19
6.2. Líneas celulares de cáncer de mama humano tienen mitocondrias con cadena transportadora de electrones funcional	19
6.3. Líneas celulares de cáncer de mama presentan reducida capacidad de reserva, funcionando su cadena transportadora de electrones en su máxima velocidad	20
6.4. Células de cáncer de mama tienen diferentes dependencias sobre la disponibilidad de glucosa y glutamina	23
6.5. Células de cáncer de mama pueden remodelar su organización bioenergética (BO) hacia el metabolismo mitocondrial	24
6.6. Identificación del complejo I como un posible blanco para pequeñas moléculas para obtener efectos anti-tumorales	27
6.7. Identificación de un inhibidor de la CTE a nivel del complejo I: caracterización del modelo celular	29
6.8. Identificación de un inhibidor de la CTE a nivel del complejo I: identificación de una estructura química mínima	30
6.9. Compuesto 2 tiene efectos anti-tumorales sólo en células con cadena transportadora de electrones funcional	31
6.10. Identificación de un inhibidor de la CTE a nivel del complejo I: Compuesto 7 (Cpd. 7), un análogo de Cpd.2, exhibe selectividad hacia células de cáncer de mama	37
6.11. Cpd. 7 es un inhibidor no-competitivo con sitio de unión en el brazo hidrofóbico del complejo I	40
6.12. Cpd. 7 inhibe la respiración mitocondrial de células de cáncer de mama, produciendo un remodelamiento metabólico hacia un fenotipo glicolítico	43
6.13. Un mecanismo de sobrevida dependiente de AMPK es activado cuando la respiración mitocondrial es inhibida por Cpd.7	46
6.14. La disponibilidad de sustratos y la flexibilidad metabólica son factores que determinan el efecto de Cpd. 7 en células de cáncer de mama	50

6.15. Cpd.7 afecta selectivamente la proliferación de células de cáncer de mama, induciendo detención del ciclo celular y senescencia	54
6.16. El efecto anti-proliferativo de Cpd.7 es debido a alteraciones en el metabolismo de amino ácidos relacionados con la inhibición de la respiración mitocondrial.	57
7. DISCUSIÓN	
7.1. Diferencias en la función mitocondrial entre células de cáncer de mama y células normales	61
7.2. Inhibición del Complejo I como un potencial blanco farmacológico para moléculas pequeñas con acción anti-tumoral	62
7.3. Inhibición de la cadena transportadora de electrones: Rol del remodelamiento metabólico como respuesta adaptativa y consecuencias sobre el metabolismo de amino ácidos no esenciales	66
8. CONCLUSIONES	69
9. REFERENCIAS	70
10. ANEXOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Tipos de fenotipos metabólicos descritos en células tumorales.	3
Figura 2: Remodelamiento metabólico como respuesta adaptativa de células tumorales.	4
Figura 3: Perfil de consumo de oxígeno usando un protocolo de evaluación de la función mitocondrial en XF96e Seahorse.	12
Figura 4: Perfil bioenergético de líneas celulares de cáncer de mama.	22
Figura 5: Efecto de la ausencia de glucosa y glutamina sobre la proliferación de cuatro líneas celulares de cáncer de mama y una no-tumoral.	25
Figura 6: Remodelamiento hacia el metabolismo mitocondrial cuando los sustratos para el crecimiento son cambiados en células T47D y MDA-MB-231	25
Figura 7: Remodelamiento hacia el metabolismo mitocondrial en células T47D y MDA-MB-231.	26
Figure 8: Aumentada expresión de subunidades del Complejo I se correlacionan con peor pronóstico en cáncer de mama humano.	28
Figure 9: Perfil del metabolismo mitocondrial de células tumorales TA3/Ha.	33
Figure 10: Identificación de una estructura química mínima como inhibidor de la CTE a nivel del complejo I.	34
Figura 11: Efecto de Cpd. 1 y Cpd. 2 en la bioenergética y viabilidad de células TA3/Ha.	35
Figura 12: Cpd. 2 requiere una cadena transportadora de electrones funcional para inducir muerte en células tumorales.	36
Figura 13: Identificación de un análogo de Cpd.2 con selectividad hacia células de cáncer de mama	39
Figura 14: El compuesto 7 es un inhibidor del complejo I.	42

Figura 15: El efecto inhibitorio de la respiración mitocondrial de Cpd. 7 es independiente del potencial de membrana mitocondrial	44
Figura 16: Cpd.7 inhibe selectivamente la respiración mitocondrial, produciendo un remodelamiento metabólico hacia un fenotipo glicolítico.	45
Figura 17: Cpd.7 produce cambios en parámetros bioenergéticos en células tumorales.	47
Figura 18: El remodelamiento metabólico hacia la glicólisis inducido por Cpd.7 es mediado por AMPK, siendo un mecanismo de sobrevida en células tumorales.	48
Figura 19: Cpd.7 induce muerte celular sólo cuando el metabolismo de células MDA-MB-231 tiene mayor participación mitocondrial.	52
Figura 20: Cpd.7 afecta el potencial proliferativo de células de cáncer de mama, independiente de la concentración de glucosa.	53
Figura 21: Cpd.7 tiene un efecto anti-proliferativo selectivo hacia células de cáncer de mama.	56
Figura 22: Inducción de senescencia por Cpd. 7 produce cambios fenotípicos en células MCF7.	59
Figura 23: El efecto anti-proliferativo de Cpd.7 (10 μ M) es mediado por alteraciones en el metabolismo mitocondrial de amino ácidos.	60
Figura 24: Mecanismo de acción de Cpd.7 en células de cáncer de mama.	65
Figura 25: Efecto de la inhibición de la cadena transportadora de electrones sobre el metabolismo de amino ácidos no-esenciales.	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: clasificación molecular de las líneas de cáncer de mama usadas	Pág. 10
--	-------------------