



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

La inhibición del complejo enzimático α KGDH provocada por GA-TPP⁺C₁₀ promueve vulnerabilidad a células de cáncer de pulmón humano

Memoria para optar al título de Bioquímico

Camila Alejandra López Torres

Directores de Memoria:

Dr. Jorge Ferreira Parker
Dr. Sebastián Fuentes Retamal
Programa de Farmacología
Molecular y Clínica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante:

Dr. Javier Puente Piccardo
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Miembros de la comisión:

Dr. Dante Miranda Wilson
Dr. Alfonso Paredes Vargas
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile
2020

*"Si tú lo deseas puedes volar, sólo tienes que confiar mucho en ti
y seguir, puedes contar conmigo, te doy todo mi apoyo"*

Steve Jobs

Agradecimientos

A mi familia por su constante apoyo y preocupación. A Guillermo, por ser un pilar y una gran compañía durante la mayor parte del periodo de mi formación académica. A mis amigos y compañeros de carrera, incluso al que se cambió, por estar aun presentes en mi vida.

A todas las personas que forman parte del laboratorio y a cada una de las que hizo posible la realización de este trabajo. A mis directores de memoria, especialmente a mi codirector Sebastián, por ofrecerme su ayuda desde un comienzo y guiarme en todo el proceso de la realización de esta memoria.

Financiamiento

Esta memoria de título fue desarrollada gracias al proyecto FONDECYT Regular n° 1180296 (Dr. Jorge Ferreira Parker, investigador principal), en el Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Índice general

Abreviaturas	vii
Resumen	ix
Summary	x
1. Introducción	1
1.1. Epidemiología del cáncer.....	1
1.2. Epidemiología del cáncer de pulmón, clasificación y tratamientos	2
1.3. Metabolismo en las células tumorales	6
1.4. Rol de la mitocondria en el cáncer.....	10
1.5. Compuesto con acción mitocondrial	13
2. Hipótesis	16
3. Objetivo general	16
4. Objetivos específicos	16
5. Materiales y métodos	17
5.1. Compuestos en estudio	17
5.2. Cultivos celulares.....	17
5.3. Viabilidad celular.....	17
5.4. Determinación de muerte celular	18
5.5. Determinación de potencial de transmembrana mitocondrial	19
5.6. Determinación de niveles de ROS	19
5.7. Western blotting.....	20
5.8. Determinación de actividad enzimática de α KGDHc	21
5.9. Análisis de morfología mitocondrial	22
5.10. Medición de la razón de glutatión reducido versus oxidado	23
5.11. Análisis estadístico	25
6. Resultados	26
6.1. Decil-polihidrobenzoatos conjugados a TPP ⁺ disminuyen la viabilidad en líneas celulares de cáncer de pulmón.	26

6.2.	GA-TPP+C ₁₀ provoca una disminución del $\Delta\Psi_m$, un aumento de los niveles de ROS y disminución del glutatión reducido.	31
6.3.	GA-TPP+C ₁₀ inhibe al complejo enzimático α KGDH.	33
6.4.	La adición de los metabolitos permeables de aspartato y α -cetoglutarato revierten el efecto citotóxico de GA-TPP+C ₁₀	34
6.5.	AMPK es activada por efecto de GA-TPP+C ₁₀ promoviendo la sobrevida celular.	37
6.6.	Efecto de la coestimulación de GA-TPP+C ₁₀ con N-acetil-cisteína y dimetil- α -cetoglutarato sobre la activación de AMPK.	40
6.7.	GA-TPP+C ₁₀ induce la fragmentación de la red mitocondrial.	42
6.8.	La inhibición de la fisión mitocondrial provoca una mayor muerte en las células tratadas con GA-TPP+C ₁₀	45
7.	Discusión	47
8.	Conclusiones	57
9.	Referencias	59

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1. Estructura molecular de los compuestos decil-polihidroxibenzoatos-TPP ⁺	29
Tabla 1. Valores de IC ₅₀ de los compuestos conjugados a TPP ⁺ sobre líneas de cáncer de pulmón.	29
Figura 2. Viabilidad celular de la línea A549 con los decil-polihidroxibenzoatos-TPP ⁺	30
Figura 3. Caída de $\Delta\Psi_m$, aumento de ROS y disminución de la razón GSH/GSSG provocado por efecto de GA-TPP ⁺ C ₁₀	32
Figura 4. Ensayo de actividad enzimática del complejo α KGDH.	33
Figura 5. Los metabolitos m-asp y dm- α KG revierten la muerte inducida por GA-TPP ⁺ C ₁₀	36
Figura 6. Activación de AMPK por GA-TPP ⁺ C ₁₀	38
Figura 7. La inhibición de AMPK con compuesto C aumenta la muerte celular al coestimular con GA-TPP ⁺ C ₁₀	39
Figura 8. Activación de AMPK por la coestimulación de GA-TPP ⁺ C ₁₀ con NAC o dm- α KG.	41
Figura 9. GA-TPP ⁺ C ₁₀ aumenta la fragmentación mitocondrial.	44
Figura 10. Inhibición de la fisión mitocondrial aumenta el efecto citotóxico de GA-TPP ⁺ C ₁₀	46
Figura 11. Resumen de mecanismo de acción de GA-TPP ⁺ C ₁₀	58

Abreviaturas

Asp	Aspartato
ADP	Adenosín difosfato
αKG	α -cetoglutarato
αKGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa
αKGDHc	Complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATP	Adenosín trifosfato
AV	Anexina V
CaMKK	Proteína quinasa quinasa dependiente de calcio/calmodulina
CC	Compuesto C
DHE	Dihidroetidio
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle
dm-αKGDH	Dimetil- α -cetoglutarato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRP1	Proteína tipo Dinamina-1
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ETC	Cadena transportadora de electrones
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
GA-TPP⁺C₁₀	(10-((2,5-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
GDP	Guanosín difosfato
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GTP	Guanosín trifosfato
HKII	Hexoquinasa II
HEPES	Ácido 2- [4- (2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanosulfónico
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50%
Km	Constante de Michaelis-Menten
LKB1	Serina/treonina quinasa 11
m-asp	Metil-aspartato

Mdivi-1	Inhibidor de la fisión mitocondrial 1
MFF	Factor de fisión mitocondrial
mtADN	ADN mitocondrial
MTT	Sal de tetrazolio
NAC	N-acetil-cisteína
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
OCR	Tasa de consumo de oxígeno
PBS	Amortiguador fosfato salino
Pyr	Piruvato
PI	Yoduro de propidio
Pi	Fosfato inorgánico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SEM	Error estandar de la media
TCA	Ácido tricarboxílico
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
TPP⁺	Trifenilfosfonio
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
V_{max}	Velocidad máxima
$\Delta\Psi_m$	Potencial de transmembrana mitocondrial
YFP	Proteína fluorescente amarilla

Resumen

El metabolismo mitocondrial ha emergido como un blanco importante para las terapias contra el cáncer. Para este propósito, se conjugó el ácido gntísico al catión trifenilfosfonio (GA-TPP⁺C₁₀) con el fin de provocar su acumulaci3n selectiva en las mitocondrias de las c3lulas cancerosas, debido al potencial de transmembrana mitocondrial significativamente mayor ($\Delta\Psi_m$) que 3stas presentan. Estudios previos del laboratorio han demostrado que este compuesto desencadena un efecto antitumoral y antimetastásico en modelos de c3ncer de mama. Por lo tanto, utilizando un modelo de c3ncer de pulm3n, se evalu3 su efecto citot3xico desencadenado por una disfunci3n mitocondrial, as3 como la respuesta celular adaptativa generada.

GA-TPP⁺C₁₀ provoc3 un efecto citot3xico mediado por la inhibici3n del complejo enzimático α KGDH, que es esencial para el buen funcionamiento de la fosforilaci3n oxidativa, ya que modula la remodelaci3n metab3lica en respuesta a los requerimientos energ3ticos de las c3lulas cancerosas. Adem3s, se demostr3 que la GA-TPP⁺C₁₀ genera una alteraci3n en varios parámetros de la funci3n mitocondrial y el estr3s oxidativo, lo que desencadena la activaci3n de AMPK. Este 3ltimo media una respuesta adaptativa a trav3s del aumento de la fisi3n mitocondrial, promoviendo un aumento de la supervivencia celular.

Summary

Mitochondrial metabolism has emerged as an important target for cancer therapies. For this purpose, gentisic acid was linked to triphenyl phosphonium cation moiety (GA-TPP⁺C₁₀) in order to generate its selective accumulation in the mitochondria of cancer cells, due to the significantly higher mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) that these present. Previous laboratory studies have shown that this compound triggers an anti-tumor and anti-metastatic effect in breast cancer models. Therefore, using a model of lung cancer, its cytotoxic effect triggered by a mitochondrial dysfunction was evaluated, as well as the adaptive cellular response generated.

GA-TPP⁺C₁₀ develop a cytotoxic effect mediated by the inhibition of the enzyme complex α KGDH, which is essential for the proper functioning of oxidative phosphorylation because it modulates metabolic remodeling in response to the energy requirements of cancer cells. In addition, it was shown that GA-TPP⁺C₁₀ generates an alteration in several parameters of mitochondrial function and oxidative stress, which triggers the activation of AMPK. The latter mediates an adaptive response through increased mitochondrial fission, promoting increased cell survival.

1. Introducción

1.1. Epidemiología del cáncer

El cáncer en la actualidad representa la segunda causa de muerte a nivel mundial luego de las enfermedades cardiovasculares. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) estimó que, en el año 2018, 18,1 millones de personas desarrollaron esta patología ocasionando un total de 9,6 millones de muertes. A nivel mundial, el cáncer de pulmón es el tipo más común de cáncer considerando a ambos sexos, representando un 11,58% del total de casos seguido del cáncer de mama con un 11,55% y en tercer lugar por el cáncer de próstata con un 9,6%. El cáncer de pulmón es el que presenta la mayor mortalidad, pues provocó un 18,4% de las muertes por cáncer, seguido del cáncer colorrectal con 9,2% y el cáncer de estómago con 8,2% en el año 2018 [1].

En Chile el cáncer representa la segunda causa de muerte, provocando en el año 2018 un 25,6% de las muertes totales. Se estima que para el año 2030 el cáncer será la principal causa de muerte en el país [2]. Las estadísticas entregadas por Globocan muestran que en el año 2018 se produjeron 53.365 nuevos casos y 28.443 muertes. Dentro de este número, el 12,3% de casos nuevos correspondió a cáncer de próstata, un 11,1% a cáncer colorrectal, un 10,1% a cáncer de mama, un 9,7% a cáncer de estómago y un 7,3% a cáncer de pulmón [3].

Dentro de las razones que se consideran para el incremento en la incidencia del cáncer, se encuentra el envejecimiento de la población y factores de riesgo modificables como: obesidad, fumar cigarrillos, estilo de vida sedentarios, elevados niveles de contaminación, entre otros.

1.2. Epidemiología del cáncer de pulmón, clasificación y tratamientos

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia, siendo el que provoca más muertes en el mundo [1]. La mitad de los pacientes diagnosticados fallecen y la sobrevivencia a los 5 años es alrededor de 17,8% [4].

Este tipo de cáncer posee dos clasificaciones principales: el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de pulmón de las células pequeñas, representando el 85 y 15% del total de casos respectivamente. El cáncer de pulmón de las células no pequeñas agrupa a otros subtipos de cánceres que se comportan en forma similar y responden también de forma similar a los tratamientos. El cáncer de pulmón de las células pequeñas se desarrolla rápidamente y está altamente asociado al hábito de fumar cigarrillos. Este último también se clasifica como tumor neuroendocrino ya que comienza en las células neuroendocrinas de los pulmones [4, 5].

El cáncer de pulmón de las células no pequeñas incluye al adenocarcinoma (forma glandular), el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células grandes [4, 5]. El tipo de cáncer de pulmón más común es el adenocarcinoma, el cual comprende alrededor del 40% de todos los casos de cáncer de pulmón. Éste tiene como origen tejido de células alveolares epiteliales de las vías respiratorias que secretan moco y otras sustancias. El adenocarcinoma, en comparación con los otros tipos de cáncer, presenta una baja tasa proliferativa, por lo que presenta una mayor probabilidad de ser detectado antes de que ocurran procesos metastásicos [4]. Cabe señalar que es el tipo de cáncer de pulmón más común entre los no fumadores [6].

Dentro de los tratamientos actuales empleados en clínica frente a esta patología se encuentran la cirugía mayor, cuyo fin es extirpar el tumor en el caso que este sea removible y si el paciente puede tolerarlo, lo cual se determina previamente mediante el uso de estudios de imágenes y biopsias. Sumado a lo anterior, pacientes que se han sometido a cirugía pueden ser candidatos a la terapia adyuvante para reducir el riesgo de reincidencia. Esta suele incluir radiación, quimioterapia generalizada (la cual se basa en cisplatino o carboplatino principalmente, o también etopósido, gemcitabina y docetaxel) y terapia dirigida contra blancos moleculares específicos. Siendo común que se utilice una combinación de estos tratamientos [2].

Por lo general, para el manejo del cáncer de pulmón de un paciente que presente cáncer de las células no pequeñas en estadio I, donde el tumor está localizado solo en los pulmones y no se ha propagado a los nodos linfáticos, se realiza solamente cirugía. En estadio II, el cual se caracteriza porque el cáncer se encuentra cercano a los nodos linfáticos, se realiza cirugía de remoción tumoral seguido de quimioterapia [2]. Para pacientes que se encuentran en el estadio III, en donde el cáncer está más avanzado y se encuentra en los nodos linfáticos al centro del pecho, se recurre a radioterapia y también puede incluir la quimioterapia. Finalmente, pacientes que presentan el estadio IV en donde el cáncer ya alcanzó ambos pulmones y otros órganos, solo se realiza quimioterapia y cuidados paliativos [2].

Los cuidados paliativos tienen por objetivo mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias a través de la prevención y alivio del sufrimiento debido a la enfermedad [7]. En esta patología es común que los pacientes requieran de estos cuidados frente a ciertos padecimientos, que se manifiestan sobre todo en etapas más avanzadas. Entre los más comunes se encuentra el dolor, para lo cual se usa desde paracetamol y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), hasta opioides en los casos de dolores más severos, siendo los de uso más común la morfina y fentanilo [8]. Los pacientes también pueden presentar disnea y tos debido a complicaciones relacionadas a la enfermedad tales como efusiones malignas (pleurales y pericardiales) y obstrucción de las vías aéreas. En estos

casos se realizan procedimientos terapéuticos los cuales incluyen toracocentesis (punción quirúrgica de la pared torácica para evacuar por aspiración el líquido acumulado en la cavidad pleural), colocación de drenaje pleural y pericardiocentesis (aspiración de líquido del pericardio). Por otro lado, cuando existe obstrucción de las vías respiratorias los tratamientos paliativos pueden incluir broncoscopia, terapia con láser (para destruir el tumor) o colocación de *stent* (malla para abrir el conducto obstruido) [9]. Para reducir las secreciones excesivas se usan medicamentos anticolinérgicos [10]. Sumado a lo anterior, muchos pacientes pueden presentar angustia y depresión, por lo que se les receta antidepresivos y terapia psicosocial [11].

El tratamiento para pacientes que presenten cáncer de pulmón de las células pequeñas es similar. En los estadios I y II se realiza cirugía seguida de quimioterapia adyuvante, en estadio III radioterapia y en estadio IV quimioterapia y cuidados paliativos [2].

Sin embargo, este tipo de terapias utilizadas comúnmente se caracterizan por su baja selectividad por las células cancerosas lo que conlleva a innumerables efectos secundarios no deseables. Es por esto, que se hace necesario buscar nuevas alternativas de tratamientos más selectivos.

Buscando blancos moleculares para producir terapias dirigidas, se encontró mutaciones en el receptor de EGF (factor de crecimiento epidermal) en cierto porcentaje de cánceres de células no pequeñas [12], sin embargo su prevalencia es solo de un 10-15% en este tipo de cáncer de pulmón. Como tratamiento se utilizan inhibidores de receptores tirosina quinasa como el Gefitinib, sin embargo, la tasa de respuesta es solo de un 50% aproximadamente, siendo muy común que los pacientes adquieran resistencia a este tratamiento [13]. Por otro lado, el intento de tratamiento que involucra diversos fármacos contra blancos específicos ha demostrado exponer a los pacientes a severos efectos tóxicos además de la adquisición de resistencia celular frente a dichas terapias combinadas [14].

1.3. Metabolismo en las células tumorales

Otto Warburg en 1920 observó que las células cancerosas presentaban una reprogramación del metabolismo de la glucosa. Éstas células, a diferencia de las células normales, poseen una elevada producción de ATP de origen glicolítico aun cuando estas se encuentren en condiciones normóxicas, dicho efecto fue denominado como “glicólisis aeróbica” [15]. Warburg hipotetizó que el flujo glicolítico exacerbado en células cancerosas se debía a daños en la respiración mitocondrial [16]. Desde ese entonces, se comenzó a describir en forma exhaustiva y detallada transportadores de glucosa y las enzimas glicolíticas en

las células tumorales de rápido crecimiento [17]. De ahí se sugirió que la disfunción mitocondrial es un sello distintivo de la oncogénesis. Otra observación que apoyó este punto de vista fue la producción de altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondrial que gatillan la activación de cascadas de señalización celular y la activación de oncogenes que resultan en la desregulación de la proliferación celular e inestabilidad genómica [18].

Sin embargo, esta hipótesis fue cuestionada cuando se demostró que las mitocondrias no son completamente disfuncionales en las células cancerosas, las cuales producen niveles similares o superiores de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Éstos son empleados como fuentes de carbono y nitrógeno para la síntesis de macromoléculas para promover y satisfacer las elevadas demandas metabólicas de las células cancerígenas debido a su elevada tasa de crecimiento y proliferación celular [19]. Incluso, se ha demostrado que cuando aumenta la glicólisis aeróbica en un entorno rico en oxígeno, la fosforilación oxidativa continúa activa y funcional en este tipo de células [20, 21]. Además, las mitocondrias en las células cancerosas pueden utilizar otras vías metabólicas para la obtención de sus intermediarios para alimentar la cadena transportadora de electrones (ETC) y producción de ATP, tales como la oxidación de los ácidos grasos y de glutamina [22, 23].

De igual forma se ha demostrado que la fosforilación oxidativa, a través del ciclo TCA, además de su rol metabólico energético, permite la generación de precursores esenciales para la proliferación celular que permiten la síntesis *de novo* de aminoácidos como el aspartato, el cual es necesario como fuente de carbono para la síntesis de purinas y pirimidinas. El aspartato puede ser sintetizado mediante dos mecanismos: i) Carboxilación de piruvato, produciendo oxalacetato el cual, mediante transaminación, mediado por la enzima glutamato-oxalacetato transaminasa, forma aspartato; ii) Síntesis reductiva con una baja razón de NAD^+/NADH principalmente en condición hipóxica debido a, por ejemplo, una inhibición de la cadena transportadora de electrones. En este caso, la carboxilación reductora de α -cetoglutarato (αKG) genera isocitrato, el cual mediante isomerización genera citrato, pudiendo este último escindirse para formar oxalacetato y por medio de una transaminación generar aspartato [24-26].

Un complejo enzimático parte de ciclo TCA importante en la generación de aspartato, es el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (αKGDHc), el cual está formado por tres subunidades (E1, E2 y E3) que oxidan y decarboxilan el α -cetoglutarato uniéndolo a la coenzima-A generando como producto succinil-CoA y NADH, siendo este último un sustrato del complejo I [27]. Por ello este complejo enzimático está estrechamente relacionado con la cadena transportadora de electrones. De esta manera resulta esencial para la fosforilación oxidativa, pudiendo modular el remodelamiento metabólico en respuesta a los

requerimientos energéticos de las células cancerígenas, ya que su actividad está muy regulada por Ca^{+2} , ADP, ATP, Pi, NADH y ROS [28].

Por otro lado, actualmente se ha demostrado que en los tumores existen diversas poblaciones celulares las cuales presentan un metabolismo heterogéneo, el que es dependiente de la disponibilidad de nutrientes que posean las distintas poblaciones de células tumorales. Dentro de un tumor hay células en las que predomina un metabolismo glicolítico, quienes liberan catabolitos, los cuales pese a ser definidos como productos de desecho de la degradación de nutrientes, terminan siendo utilizados por células tumorales vecinas que tienen predominancia por la fosforilación oxidativa. Este mecanismo de acoplamiento metabólico favorece la proliferación y crecimiento del tumor [21, 29].

La heterogeneidad celular dentro un tumor ha sido ampliamente descrita, por ejemplo Viale y cols. 2014, demuestra este fenómeno en modelos de cáncer pancreático murinos, siendo particularmente interesante, la resistencia a muerte celular de tipo apoptótica que presentan aquellas que basan su metabolismo de la glucosa en la fosforilación oxidativa [30].

La mayoría de los tumores humanos presentan una elevada heterogeneidad genética, con numerosos oncogenes activos y con pérdida de múltiples supresores de tumores. A pesar de esto, estas alteraciones inducen un fenotipo

metabólico energético mucho menos variable entre los tumores y dentro de ellos, que las mismas alteraciones génicas que las producen, por lo que, en las características compartidas se debe buscar un blanco para dirigir las terapias contra el cáncer, siendo el metabolismo un excelente blanco terapéutico [14]

1.4. Rol de la mitocondria en el cáncer

La mitocondria tiene un papel importante en la regulación del metabolismo, concentración de calcio citosólico, producción de ROS y apoptosis [31].

La membrana interna mitocondrial de las células tumorales posee un potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) significativamente mayor a una célula normal, siendo este aproximadamente 150-180 mV. Lo anterior se genera debido a una mayor concentración de protones en el espacio intermembrana de la mitocondria tumoral, lo que genera una matriz con un mayor potencial electronegativo. Este último es mucho mayor que el $\Delta\Psi_m$ de células normales [32] cuyo potencial es de unos 130-150 mV [33].

Estudios han confirmado la importancia de la fosforilación oxidativa en la producción de ATP en las células tumorales. Así como, la importancia de este proceso en el metabolismo glicolítico, pues es capaz de entregar directamente ATP a la hexoquinasa 2 (HK-II) para ser empleado en los primeros pasos de la

glicolisis. Esta enzima está unida a la membrana externa mitocondrial a través del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) el cual está regulado positivamente en las células tumorales y, además, esta isoforma presenta una actividad significativamente mayor y no es inhibida por la concentración de producto (glucosa-6-P). Por lo tanto, la HK-II usa el ATP sintetizado a través de la fosforilación oxidativa y convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato, uno de los pasos limitantes de la glicólisis [34].

Sumado a lo anterior, Tan y cols. 2015 demuestra la importancia de la fosforilación oxidativa mediante la inyección de células tumorales (de líneas celulares) con ADN mitocondrial (mtADN) defectuoso, y por lo tanto con una cadena transportadora de electrones deficiente, lo cual fue demostrado a través de un nulo consumo de oxígeno mitocondrial en un modelo murino. Además, lograron demostrar que cuando estas células fueron inoculadas, desarrollaban un retraso de más de dos semanas en la formación y crecimiento del tumor en comparación con las células tumorales con mtADN completo. Encontrando que las células defectuosas lograron formar tumores en forma tardía debido a que recuperaron el mtADN, el cual fue incorporado desde el hospedero [35]. Posteriormente, y en relación a lo anterior, se comprobó que esta incorporación del mtADN es a través del tráfico de mitocondrias completas. Estos antecedentes permitieron demostrar que las células tumorales necesitan recuperar/presentar

un funcionamiento correcto de la fosforilación oxidativa para una eficiente formación tumoral [36].

Por otro lado, la dinámica mitocondrial que incluye los procesos de fusión y fisión, la que determina la morfología de la red mitocondrial, está generalmente desregulada en el cáncer, presentando una aumentada fisión mitocondrial. Esta característica le permite a las células tumorales evadir la apoptosis lo que finalmente se traduce en una aumentada proliferación, favoreciendo la progresión del cáncer [31].

En este mismo contexto, la hipoxia, una característica del microambiente tumoral, es una condición que afecta la actividad de la fosforilación oxidativa y se ha reportado que induce fragmentación mitocondrial [37]. Sumado a lo anterior, ha sido observado que bajo inhibición de la cadena transportadora de electrones, la enzima censora de la energía celular, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), rápidamente promueve la fisión mitocondrial por fosforilación del factor de fisión mitocondrial (MFF), el receptor de la proteína tipo Dinamina 1 (Drp1), el cual está localizado en la membrana mitocondrial externa [38]. Las consecuencias fisiológicas de estos eventos de fisión no están del todo claras, pero se especula que pueden relacionarse a intentos de la célula para aislar y eliminar mitocondrias disfuncionales a través de mitofagia, disminuyendo con ello

la posibilidad de iniciar la muerte celular por medio de la vía apoptótica intrínseca [39].

En conjunto, estos antecedentes demuestran que la mitocondria es un excelente blanco para terapias antitumorales, ya que presenta características diferentes de las mitocondrias de las células normales, características que podrían ser aprovechadas para el diseño de nuevos fármacos.

1.5. Compuesto con acción mitocondrial

El ácido gentísico (ácido 2,5-dihidrobenczoico) es un polifenol que se encuentra en muchas plantas comestibles como manzanas, kiwis, moras, entre otros vegetales [40] y es además, un metabolito de la aspirina (ácido acetilsalicílico) [41]. Se ha comprobado que este posee diversas actividades biológicas tales como antiinflamatoria, antimutagénica, hepatoprotectora, neuroprotectora y antimicrobial [42, 43].

Por otro lado, las células tumorales se caracterizan por presentar un $\Delta\Psi_m$ significativamente mayor que las células normales, lo que ha permitido dirigir selectivamente hacia este organelo pequeñas moléculas catiónicas como el trifenilfosfonio (TPP⁺) [44]. Este actúa como una chaperona química para grupos farmacóforos permitiendo, además de la entrada, la acumulación de los compuestos en la matriz mitocondrial [45], siendo esta acumulación unas 500

veces mayor que la presente en el citosol. Esto según la ley de Nernst que predice que el compuesto TPP⁺ se acumula unas 10 veces más por cada aumento de 60 mV de diferencia de voltaje en el $\Delta\Psi_m$ [46].

Basándose en las características del TPP⁺, se desarrollaron sales tales como MitoQ [47] y MitoVit-E [48] derivadas de coenzima Q y vitamina E, respectivamente, unidas al catión TPP⁺. Los compuestos originados demostraron una actividad antioxidante mitocondrial más elevada que sus moléculas parentales, con resultados favorables que han permitido finalizar estudios de fase II para el compuesto MitoQ, el cual ha sido utilizado como agente capaz de disminuir la progresión de la enfermedad de Parkinson [49].

Otro ejemplo de compuesto antioxidante derivado de plastoquinona con TPP⁺ presente en su estructura es el SkQ1, el cual es usado actualmente en la clínica para tratar el Síndrome del ojo seco [50].

De la misma manera, se ha visto que el TPP⁺ unido a una cadena alifática de 12 átomos carbono es capaz de inhibir la propagación de células iniciadoras de tumores de cáncer de mama, comprobándose que este compuesto disminuye la tasa de consumo de oxígeno (OCR) mitocondrial y redirige el metabolismo celular hacia la glicólisis [51]. Además, en otro estudio fueron evaluados compuestos en los que se conjugó el TPP⁺ al ácido gálico por cadenas alifáticas de átomos de

carbono de distinto largo, encontrándose que la longitud de 10 átomos de carbono es la que desarrollaba una mayor inhibición del crecimiento tumoral [52].

Debido a estos antecedentes se conjugó el ácido gentísico al trifenilfosfonio a través de una cadena de 10 átomos de carbono (GA-TPP⁺C₁₀) viéndose potenciada su citotoxicidad, el cual ha demostrado presentar una elevada selectividad sobre células tumorales [53].

Además, recientemente fue demostrado que GA-TPP⁺C₁₀ causa una inhibición compleja de la bioenergética mitocondrial en líneas celulares de cáncer de mama. Presentando una fase inicial de captación mitocondrial, una posterior inhibición de la respiración dependiente de complejo I y una fase tardía de acumulación mitocondrial con la inhibición del complejo α KGDH, necesario para la síntesis de aspartato. También, se observó un rescate de la muerte celular producida por GA-TPP⁺C₁₀ al adicionar metabolitos permeables de aspartato y α -cetoglutarato, restituyendo la vía metabólica del aspartato inhibida. Por otro lado, el compuesto también produjo un remodelado metabólico hacia la glicólisis, así como la activación de AMPK [54].

Debido a los antecedentes mencionados se decidió evaluar el efecto del compuesto GA-TPP⁺C₁₀ sobre líneas celulares de cáncer de pulmón como un posible tratamiento.

2. Hipótesis

GA-TPP+C₁₀ genera citotoxicidad en células de cáncer de pulmón humano debido a una inhibición del complejo enzimático α KGDH.

3. Objetivo general

Evaluar el efecto de la inhibición del complejo α KGDH inducida por GA-TPP+C₁₀ sobre la disfunción y fragmentación mitocondrial en células de cáncer de pulmón humano.

4. Objetivos específicos

- 1.- Evaluar el efecto de GA-TPP+C₁₀ sobre la viabilidad celular en líneas de cáncer de pulmón humano.
- 2.- Evaluar la disfunción mitocondrial inducida por GA-TPP+C₁₀ en células de cáncer de pulmón.
- 3.- Determinar la respuesta adaptativa desencadenada por GA-TPP+C₁₀ sobre células de cáncer de pulmón.

5. Materiales y métodos

5.1. Compuestos en estudio

Los compuestos conjugados a trifenilfosfonio utilizados en el presente estudio fueron sintetizados en el Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, de acuerdo a lo publicado en Sandoval-Acuña, 2016 [53]. Las soluciones fueron preparadas en dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemania).

5.2. Cultivos celulares

Las líneas celulares de pulmón humano A549 (código ATCC® CCL-185™) y NCI-H1975 (código ATCC® CRL-5908) fueron obtenidas de ATCC (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Estas fueron cultivadas en medio DMEM High glucose (Sigma-Aldrich,) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Biological Industries), antibióticos penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL (Thermo Scientific), 6 g/L de HEPES (Calbiochem), y 2 g/L de Bicarbonato de sodio (MERCK). Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37 °C, 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada.

5.3. Viabilidad celular

El análisis de la viabilidad celular fue realizado mediante el ensayo de reducción de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). Para esto se sembraron 1×10^4 células por pocillo en placas de 96

pocillos y fueron incubadas por 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente estimuladas con concentraciones crecientes de los compuestos (0,1-100 μM) por 24, 48 y 72 horas respectivamente. Luego las células fueron lavadas con PBS, e incubadas con 100 μL de MTT por cada pocillo, el que fue preparado en PBS a una concentración de 0,5 mg/mL. Luego de incubar por 2 horas, los cristales de formazán formados fueron disueltos en 50 μL de DMSO, se agitó en oscuridad a 37 °C por 10 min y se midió la absorbancia a 570 nm mediante un lector de placas de ELISA (BioRad, Hercules, CA, USA). Con los datos obtenidos se realizaron curvas de dosis-respuesta para obtener los valores de IC₅₀ ± SEM.

5.4. Determinación de muerte celular

El tipo de muerte celular inducida por GA-TPP+C₁₀ fue medida por el método de doble tinción de anexina V/yoduro de propidio (AV/PI) siguiendo las instrucciones del fabricante del Kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection (Abcam, Cambridge, UK). Brevemente, se sembraron 1x10⁵ células por pocillo en placas de 12 pocillos, las cuales fueron incubadas por 24 horas. Posteriormente estas fueron estimuladas con los compuestos a tratar, incubándose el tiempo señalado en cada tratamiento. Posteriormente el medio es colectado, las células tripsinizadas, centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. Estas son posteriormente resuspendidas en 100 μL de buffer 1X de annexin V binding buffer, el cual contiene AV 1μL/100 μL y PI 1μL/1000 μL. Incubándose las células por 15 min en oscuridad a 4 °C, posteriormente se centrifugaron y resuspendieron en “annexin V binding buffer”.

El análisis fue realizado mediante citometría de flujo (LSRFortessa BD Biosciences). Las longitudes de onda empleadas fueron, 488_{Ex}/530_{Em} nm para Anexina V-FITC y 488_{Ex}/575_{Em} nm para PI. Los resultados se expresan como muerte total (porcentaje de células Anexina-V⁺/PI⁻, Anexina-V⁺/PI⁺ y porcentaje de células anexina-V⁻/PI⁺) y células vivas (porcentaje de células anexina-V⁻/PI⁻).

5.5. Determinación de potencial de transmembrana mitocondrial

Se evaluó el efecto del compuesto GA-TPP⁺C₁₀ (5, 10, 20 y 50 μM) sobre el ΔΨ_m a las 24 h de incubación en la línea celular A549 mediante el uso de la sonda fluorescente tetrametil rodamina metil éster (TMRM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) en modo *non-quenching*. Para esto se sembraron 1x10⁵ células por pocillo en placas de 12 pocillos. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS estéril para eliminar trazas de compuesto y estimuladas con TMRE 5 nM por 30 minutos. Luego, el exceso de sonda fue lavado y las células fueron resuspendidas en 200 μL de PBS para ser analizados mediante citometría de flujo FACS (FACSAria®III, BD Biosciences) 540_{Ex}/595_{Em} nm.

5.6. Determinación de niveles de ROS

Los niveles de ROS (superóxido) intracelular fueron determinados usando la sonda dihidroetidio (DHE, Sigma Aldrich). Fueron sembradas 5x10⁴ células por pocillo en placas de 12 pocillos, al día siguiente las células fueron estimuladas con distintas concentraciones de GA-TPP⁺C₁₀ (5, 10, 20 y 50 μM) siendo incubadas por 24 h. Se usó como control DMSO y antimicina 1 μM como control

de la técnica que fue agregada al mismo tiempo que la sonda. La sonda DHE fue preparada en PBS a 5 μ M. Se incubó las muestras por 30 minutos a 37 °C. La fluorescencia de la sonda fue medida mediante citometría de flujo FACS (FACSAria®III, BD Biosciences) 510_{Ex}/580_{Em} nm.

5.7. Western blotting

La cuantificación de la variación de los niveles de proteínas con cada tratamiento fue realizada mediante la técnica de western blot. Brevemente, se sembraron 5x10⁵ células en placas Petri de 60 mm siendo mantenidas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Luego, las células fueron estimuladas con los distintos tratamientos señalados en cada experimento. En los casos que se usó compuesto C (CC) y Mdivi-1, estos fueron añadidos 1 hora antes de estimular con GA-TPP+C₁₀. Finalizados los tratamientos las células fueron lavadas con PBS y lisadas con RIPA (ensayo de radioinmunoprecipitación) (Tris-Cl [50 mM], NaCl [150 mM], dodecil sulfato de sodio [SDS; 0.1%]) más el *cocktail* de inhibidores de proteasas y fosfatasas (CellSignalling, Danvers, MA, EE.UU.). Posteriormente, el lisado fue centrifugado a 3000 g a 4°C durante 15 min, el sobrenadante recolectado y se cuantificó su concentración de proteínas de acuerdo con la técnica de Bradford. Luego, una muestra de 50 μ g de proteínas fue separada a través de un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), siendo posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, MA). La membrana fue bloqueada a temperatura ambiente durante 1 hora con leche sin

grasa al 5% en tampón Tris al 0.1 % de Tween-20 (TBST), y luego incubada con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (Phospho-AMPK α (Thr172) (D79.5E), CellSignalling, #4188, 1:1000; AMPK α CellSignalling, #2532, 1:1000 y β -Actin (D6A8) CellSignalling, #8457, 1:1000). Luego de ser lavadas con TBST, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP) (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, SC-2004, 1:5000) por dos horas. Finalmente, las membranas fueron expuestas al reactivo quimioluminiscente Luminata forte western hrp substrate (Millipore) y reveladas utilizando el equipo C-digit (Li-Cor, Lincoln, NE, EE.UU.). Los revelados fueron cuantificados a través de escáner densitométrico utilizando el *software* ImageJ 1.47v.

5.8. Determinación de actividad enzimática de α KGDHc

Para medir la actividad enzimática se usó el *kit* KGDH Activity Assay Colorimetric Kit (K678, BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.). En resumen, se sembraron 1×10^5 células en placas de 6 pocillos, al día siguiente se estimularon con GA-TPP $^+$ C $_{10}$ y se incubó por 24 horas. Luego las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 3000 rpm por 5 min, el pellet fue resuspendido en 100 μ L de KGDH assay buffer y se dejó por 10 min en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 10.000g por 5 min. Del sobrenadante se extrajeron 48 μ L los cuales se pasaron a placas de 96 pocillos en el que se adicionó el mix de reacción (KGDH Assay Buffer, developer y substrate). Luego se midió la absorbancia durante 60 min a 450 nm en el equipo

Varioskan Flash® microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron obtenidos mediante un modelamiento de Michaelis-Menten realizado con el *software* GraphPad Prism Version 5.00.

5.9. Análisis de morfología mitocondrial

Para evaluar la morfología mitocondrial, las células A549 fueron transfectadas con el plasmidio mt-YFP usando el *kit* Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific). Después de tres días en cultivo sobre cubreobjetos, las imágenes de morfología mitocondrial fueron obtenidas. El día de la medición las células fueron incubadas por 4 horas con cada tratamiento. Para la adquisición de imágenes por cada condición experimental se escogieron 10 o más células. La selección de células se determinó por las siguientes características: alta relación señal / ruido para mito-YFP, y aislamiento relativo de YFP vecino de otras células transfectadas. Para analizar y clasificar la morfología mitocondrial, se obtuvieron imágenes de gran aumento con un microscopio de disco giratorio UltraView RS (Perkin-Elmer) con un objetivo de aceite 100x (NA 1.3, C-Apocromático), excitación con un láser de diodo de 488 nm (Omicron), una cámara CCD de 12 bits (Hamamatsu ORCA-ER) y el *software* Volocity 4.2 (Improvision). Se obtuvieron imágenes TIFF de 8 bits de 1344 x 1024 píxeles con un tamaño de píxel de 41,5 x 41,5 nm y 200 nm entre secciones z. Se obtuvieron 120-180 secciones en z, dependiendo del volumen celular. Para la segmentación, las imágenes de alta magnificación se deconvolucionaron con el *software* Huygens

Scripting (Scientific Volume Imaging BV) para reducir el desenfoque y el ruido. Se seleccionaron células individuales usando la selección elíptica o con pincel usando el *software* ImageJ (NIH, EE. UU). Para el segmento mitocondrial, se utilizó el *kit* de herramientas MiNA basado en ImageJ, siguiendo el flujo de trabajo del desarrollador [55, 56]. Brevemente, las imágenes en 3D se preprocesaron (algoritmos aplicados: Unsharp Mask, CLAHE, Median Filtered), luego se transformaron en binario y se esqueletizaron para permitir la generación y grabación de parámetros. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el laboratorio de Plasticidad Metabólica y Bioenergética (investigador principal Félix Urra), del Programa de Farmacología Molecular y Clínica de la Universidad de Chile.

5.10. Medición de la razón de glutatión reducido versus oxidado

La determinación del efecto de GA-TPP⁺C₁₀ sobre los niveles intracelulares de glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG, respectivamente) se realizó mediante el *kit* Glutathione Fluorometric Assay (BioVision, Milpitas, CA, E.E.U.U.). En resumen, células A549 (3·10⁶ células/pocillo) fueron sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron incubadas con 10 y 20 µM de GA-TPP⁺C₁₀ por 24 horas, recolectadas mediante tripsinización y resuspendidas en 100 µL de Assay Buffer (contenido en el *kit*). De la anterior suspensión, 60 µL fueron añadidos a un tubo con 20 µL de ácido perclórico 6 N, y la mezcla fue agitada,

incubada en hielo durante 5 minutos y centrifugada por 2 minutos (13.000g a 4 °C). Al sobrenadante se le añadieron 40 µL de hidróxido de sodio 6 N frío y se mantuvo en hielo por 5 minutos. Tras una nueva centrifugación (2 minutos a 13.000g a 4 °C), se transfirieron 10 µL de cada muestra a una placa negra de 96 pocillos en triplicado (para la cuantificación diferencial de GSH, GSSG). Para la cuantificación de GSH se adicionaron 80 µL de Assay Buffer a uno de los pocillos anteriormente mencionados. Para la determinación de GSSG, se añadieron 60 µL de Assay Buffer y 10 µL de Quencher (contenido en el *kit*). Tras 10 minutos de incubación, se añadieron 10 µL de Reducing Agent (contenido en el *kit*) y se incubó por 10 minutos adicionales. Para la determinación de glutatión total, se añadieron 70 µL de Assay Buffer y 10 µL de Reducing Agent al tercer pocillo y se incubó por 10 minutos. Finalmente, se agregaron 10 µL de o-ftalaldehído (contenido en el *kit*) a cada uno de los pocillos, se incubó por 40 minutos y la fluorescencia se cuantificó mediante un lector de placas Varioskan® Flash (Thermo Scientific) a 340Ex/420Em nm. Los resultados se expresan como la razón entre las concentraciones de GSH y GSSG, las cuales fueron calculadas mediante interpolación en una curva estándar de GSH obtenida utilizando el mismo *kit*. Células incubadas con DMSO (a igual concentración que la utilizada para la adición de los compuestos) fueron utilizadas como control.

5.11. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. La comparación entre los distintos grupos experimentales versus el control se realizó mediante análisis ANOVA de una vía, con un post-test de Tukey mediante el *software* GraphPad Prism 6.0. El valor $p < 0,05$ fue establecido como el valor mínimo de significancia. Los valores del ensayo de MTT fueron calculados mediante una curva dosis-respuesta no lineal.

6. Resultados

6.1. Decil-polihidroxibenzoatos conjugados a TPP⁺ disminuyen la viabilidad en líneas celulares de cáncer de pulmón.

Se evaluó la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de pulmón humano a través de ensayo de MTT para determinar el efecto de los compuestos decil-polihidroxibenzoatos conjugados a trifenilfosfonio: TPP⁺C₁₀, SA-TPP⁺C₁₀, PIA-TPP⁺C₁₀ y GA-TPP⁺C₁₀ (**Figura 1**). Para todos los compuestos se usaron concentraciones crecientes que van de 0,1 a 100 µM. Para lo cual se usaron las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humano NCI-H1975 y A549, las cuales se diferencian entre sí por mutaciones implicadas en la oncogénesis. La línea celular NCI-H1975 posee mutaciones en los genes *EGFR*, *CDKN2A*, *PIK3CA* y *TP53* [57], mientras que la línea celular A549 tiene mutaciones en los genes *CDKN2A*, *KRAS* y *LKB1* [58], y no presenta mutaciones en los genes *EGFR*, *PIK3CA*, *TP53* [59]. Representando estas líneas celulares ejemplos de la heterogeneidad genética dentro del tipo de cáncer de pulmón más común, el adenocarcinoma [4].

Los resultados de IC₅₀ obtenidos para cada línea celular con los distintos compuestos se presentan en la **Tabla 1**. Donde se observa que los valores de IC₅₀ muestran una disminución de la viabilidad celular en el tiempo y en forma dependiente de la concentración. Lo que sugiere que los compuestos son de

amplio espectro de acción sobre líneas celulares de cáncer de pulmón que presentan distintos perfiles de mutaciones que favorecen la progresión del cáncer.

Sin embargo, para continuar con la investigación se escogió solo la línea celular A549 ya que presenta mutado el gen *KRAS*, mutación de particular interés, ya que se ha asociado con un pronóstico más negativo respecto de los adenocarcinomas con *KRAS* no mutado [60]. La mutación en *KRAS* se encuentra presente en aproximadamente el 25% de los adenocarcinomas de pulmón [61]. Pese a los esfuerzos realizados basados en distintas estrategias en muchos laboratorios, no se ha logrado encontrar un tratamiento exitoso para inhibir el efecto negativo de esta mutación sobre el cáncer de pulmón [62].

KRAS es una proteína intracelular que une al nucleótido guanina (proteína G), la cual pertenece a una familia de GTPasas pequeñas. Su señalización ríe abajo depende de la alternación entre dos estados: en la cual la forma activa está unida a GTP (*KRAS*-GTP) y la inactiva a GDP (*KRAS*-GDP) [63]. El complejo *KRAS*-GTP puede activar varias vías de señalización como EGFR/RAS/MEK/ERK, la vía de PI3K/Akt/mTOR, la vía RHOA-FAK y la vía de señalización de TIAM1-RAC1 las cuales controlan múltiples funciones celulares como la proliferación, apoptosis, motilidad o sobrevivencia. Estas cascadas de señalización son gatilladas por varios receptores de factores de crecimiento como el EGFR [62]. A pesar de

que la vía KRAS-MAPK está río abajo de la señalización de EGFR, la mutación en KRAS en adenocarcinomas de pulmón no responde a inhibidores de receptores tirosina quinasa, estrategia que suele funcionar en cierto grado en tumores con EGFR mutado [64]. Lo cual se debe a que KRAS presenta mutaciones que promueven que se encuentre siempre en su estado activo unido a GTP [62]. Sumado a lo anterior las mutaciones simultáneas en *KRAS* y *LKB1* o *CDKN2A* han mostrado un peor pronóstico comparado a las mutantes simultáneas para *KRAS* y *TP53* [65].

Si bien no se aprecian diferencias significativas en la actividad de los 4 compuestos sobre la viabilidad en la línea A549 (**Figura 2, Tabla 1**), la actividad de GA-TPP+C₁₀ destaca en la línea NCI-H1975, en donde a las 72 horas de tratamiento se aprecia que su IC₅₀ es de un orden de magnitud menor al resto de los compuestos analizados (**Tabla 1**). Lo anterior concuerda con publicaciones realizadas en el laboratorio que muestran su efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de mama [54], así como también mostró provocar una inhibición del crecimiento tumoral y selectividad en modelos murinos *in vivo* en resultados anteriores obtenidos por el laboratorio (datos no publicados). Es por ello que este compuesto se elige para continuar con los siguientes experimentos en la determinación de su mecanismo en células tumorales de pulmón humano.

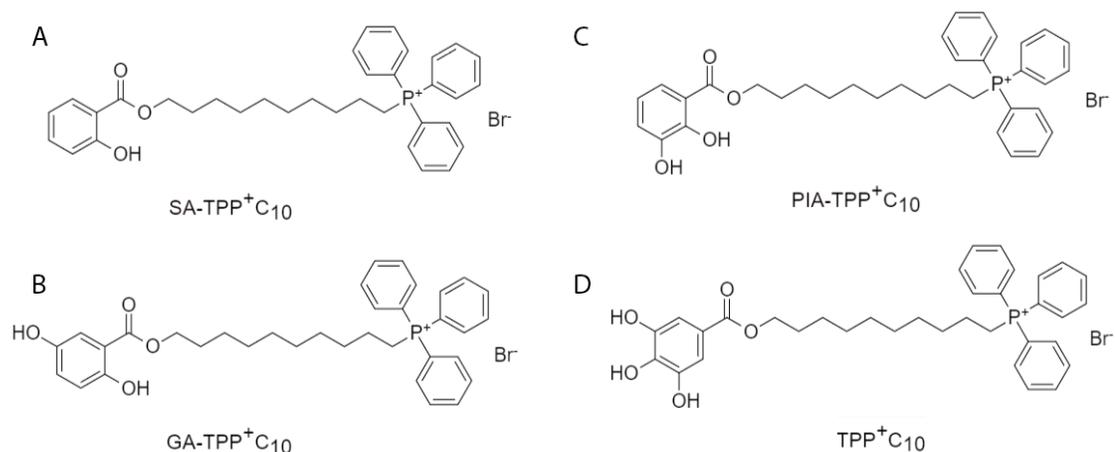


Figura 1. Estructura molecular de los compuestos decil-polihidroxibenzoatos-TPP⁺. A) bromuro de (10-(2-hidroxibenzoil) oxi) decil) trifenilfosfonio (SA-TPP⁺C₁₀). B) bromuro de (10-(2,5-dihidroxibenzoil) oxi) decil) trifenilfosfonio (GA-TPP⁺C₁₀). C) bromuro de (10-(2,3-dihidroxibenzoil) oxi) decil) trifenilfosfonio (PIA-TPP⁺C₁₀). D) bromuro de (10-(3,4,5-trihidroxibenzoil) oxi) decil) trifenilfosfonio (TPP⁺C₁₀).

Tabla 1. Valores de IC₅₀ de los compuestos conjugados a TPP⁺ sobre líneas de cáncer de pulmón. Los valores son expresados como IC₅₀ ± SEM [μM].

Línea celular	Compuesto	24 h	48 h	72 h
A549	TPP ⁺ C ₁₀	83,8 ± 0,90	30,3 ± 0,15	6,01 ± 0,01
	GA-TPP ⁺ C ₁₀	64,9 ± 0,15	19,32 ± 0,15	10,27 ± 0,25
	SA-TPP ⁺ C ₁₀	8,07 ± 0,10	7,2 ± 0,45	6,1 ± 0,20
	PIA-TPP ⁺ C ₁₀	26,08 ± 0,40	19,7 ± 0,30	11,7 ± 0,10
NCI-H1975	TPP ⁺ C ₁₀	49,1 ± 0,51	20,3 ± 0,52	20 ± 10,0
	GA-TPP ⁺ C ₁₀	50,95 ± 0,10	30,2 ± 0,75	2,2 ± 0,20*
	SA-TPP ⁺ C ₁₀	21,3 ± 0,20	20,1 ± 1,00	14,3 ± 0,60
	PIA-TPP ⁺ C ₁₀	33,7 ± 2,00	30,6 ± 1,50	22,0 ± 1,30

*p<0,05 diferencia comparada entre decil-polihidroxibenzoatos-TPP⁺ a las 72 h de incubación en la misma línea celular.

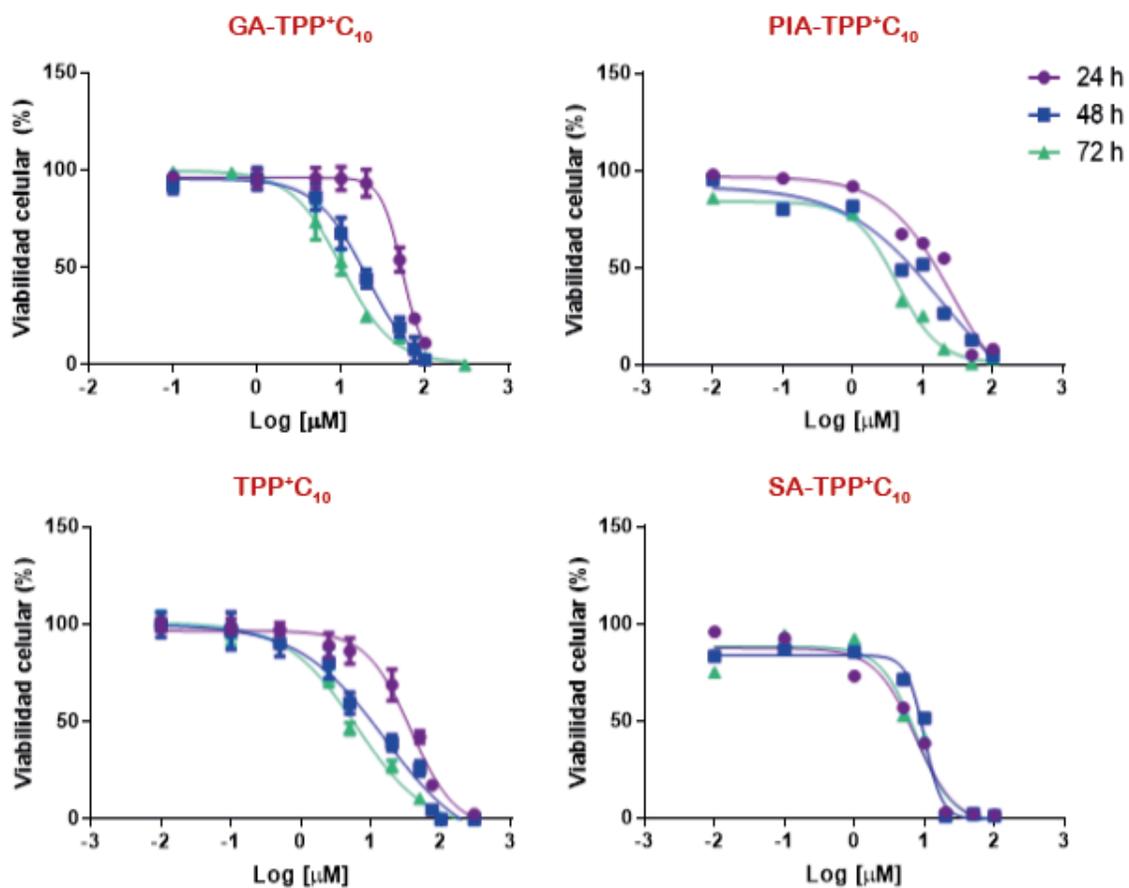


Figura 2. Viabilidad celular de la línea A549 con los decil-polihidroxibenzoatos-TPP⁺. Se evaluó la viabilidad celular para obtener los valores de IC₅₀ a 24, 48 y 72 horas. Los valores son expresados como promedio ± SEM, N = 4. Se usó DMSO como control.

6.2. GA-TPP⁺C₁₀ provoca una disminución del $\Delta\Psi_m$, un aumento de los niveles de ROS y disminución del glutatión reducido.

Posterior a la elección del compuesto, se evaluaron parámetros de función mitocondrial y estrés oxidativo, para ello fueron analizados: $\Delta\Psi_m$, los niveles de ROS y la relación de glutatión reducido versus oxidado a las 24 horas de tratamiento en la línea celular A549.

Para medir el $\Delta\Psi_m$ se usó la sonda TMRM a una concentración de 5 nM en modo *non-quenching* y para evaluar la cantidad de ROS total generadas se usó la sonda DHE a una concentración de 5 μ M. Obteniéndose que GA-TPP⁺C₁₀ a 5 μ M, produce una caída significativa de $\Delta\Psi_m$ con respecto al control, y a partir de 10 μ M logra una despolarización completa, debido a que se alcanza la respuesta inducida por el desacoplante FCCP (**Figura 3A y 3B**).

Por otro lado, la generación de ROS total a las 24 horas con GA-TPP⁺C₁₀ mostró un aumento de aproximadamente 5 veces con respecto al control a todas las concentraciones de compuesto utilizadas (**Figura 3C y 3D**), lo que consecuentemente llevó a una disminución del glutatión reducido (**Figura 3E**), uno de los principales antioxidantes de la célula.

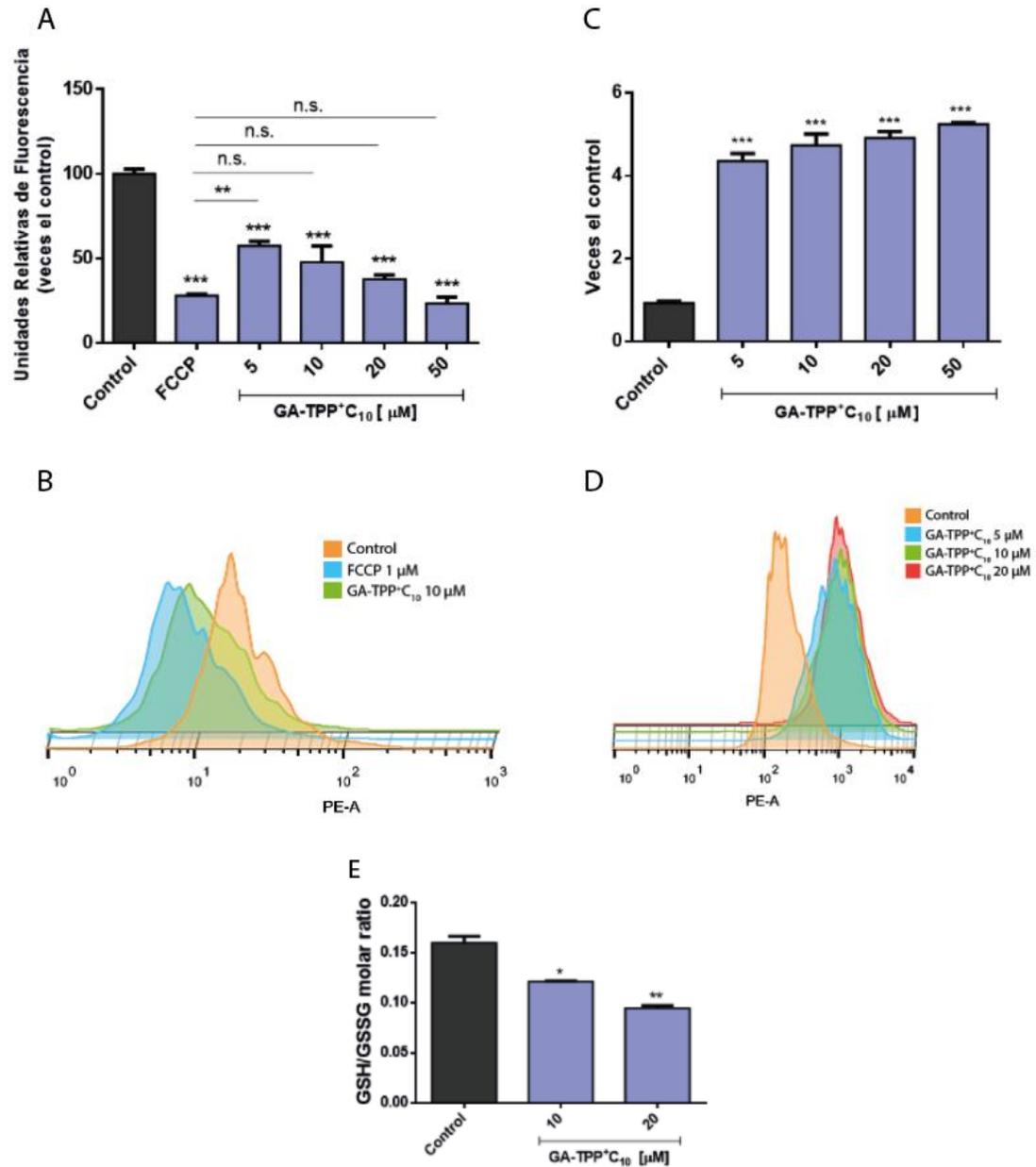


Figura 3. Caída de $\Delta\Psi_m$, aumento de ROS y disminución de la razón GSH/GSSG provocado por efecto de GA-TPP+C₁₀. Se midieron los parámetros a las 24 horas de estimulación con GA-TPP+C₁₀. A) Caída de $\Delta\Psi_m$ medida usando la sonda TMRM en modo *non-quenching*. B) Histograma representativo de la caída del $\Delta\Psi_m$. C) Cuantificación de ROS generadas por el compuesto usando la sonda DHE. D) Histograma representativo del aumento de ROS. E) Relación GSH/GSSG. Los valores son expresados como promedio \pm SEM, N = 4. n.s. = no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ con respecto al control (DMSO).

6.3. GA-TPP⁺C₁₀ inhibe al complejo enzimático αKGDH.

Se ha sido descrito que el catión lipofílico metil-TPP⁺ es capaz de producir una inhibición de la actividad del complejo αKGDH [66] y recientemente el compuesto GA-TPP⁺C₁₀ mostró los mismos resultados en cáncer de mama [54]. Es por esto que se decidió medir su actividad en presencia de dos concentraciones del compuesto en la línea celular de cáncer de pulmón humano A549. Encontrándose que GA-TPP⁺C₁₀ efectivamente altera los parámetros cinéticos del complejo enzimático, provocando un aumento de la Km y la disminución de la V_{máx} (**Figura 4**), lo cual concuerda con un modelo de una inhibición mixta.

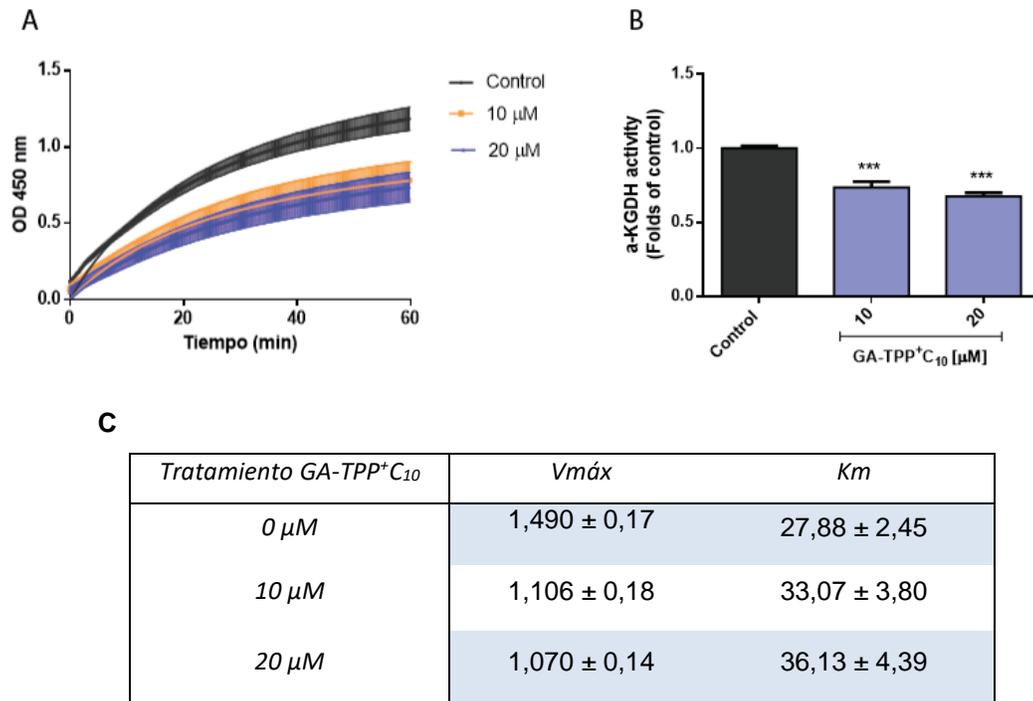


Figura 4. Ensayo de actividad enzimática del complejo αKGDH. Las células fueron incubadas por 24 h con 10 y 20 μM de GA-TPP⁺C₁₀. A) Curva de progreso de la reacción. B) Actividad enzimática. C) Valores de V_{máx} y K_m. Los valores son expresados como promedio ± SEM, N = 4. ****p* ≤ 0,001 con respecto al control (DMSO).

6.4. La adición de los metabolitos permeables de aspartato y α -cetoglutarato revierten el efecto citotóxico de GA-TPP⁺C₁₀.

En este estudio fue comprobado que GA-TPP⁺C₁₀ es capaz de inhibir al complejo α KGDH y, además, en el laboratorio fue determinado que también inhibe al complejo I de la cadena transportadora de electrones [54]. Por otro lado, entre estos complejos proteicos existe una relación directa a través de la razón NAD⁺/NADH, siendo el NAD⁺ necesario para la síntesis de aspartato, un aminoácido esencial para la proliferación. Debido a esto si el complejo I es inhibido no habrá generación de NAD⁺, el cual es cosustrato de α KGDH [24-26].

Es por esto que se evaluó la citotoxicidad de GA-TPP⁺C₁₀ en las células de cáncer de pulmón, al ser coestimuladas con el metabolito exógeno piruvato (pyr), el cual al ser oxidado a ácido láctico regenera el *pool* de NAD⁺ [26]. Adicionalmente debido a que GA-TPP⁺C₁₀ induce una inhibición en la ruta de síntesis de aspartato mediado por α KGDHc, se determinó si la adición de metil-aspartato (m-asp) o dimetil- α -cetoglutarato (dm- α KG) es capaz de prevenir la muerte celular. Se midió la muerte total inducida por GA-TPP⁺C₁₀ a través de citometría de flujo mediante un ensayo de doble tinción de AV/PI luego de 24 y 48 horas de tratamiento.

Como se ve en la **Figura 5**, solo hay una reversión parcial de la muerte a 48 horas cuando se usan los metabolitos m-asp y dm- α KG, pero no el pyr. Los resultados obtenidos comprueban la inhibición del complejo α KGDH, lo que demuestra su rol crítico en la supervivencia y proliferación de las células cancerígenas.

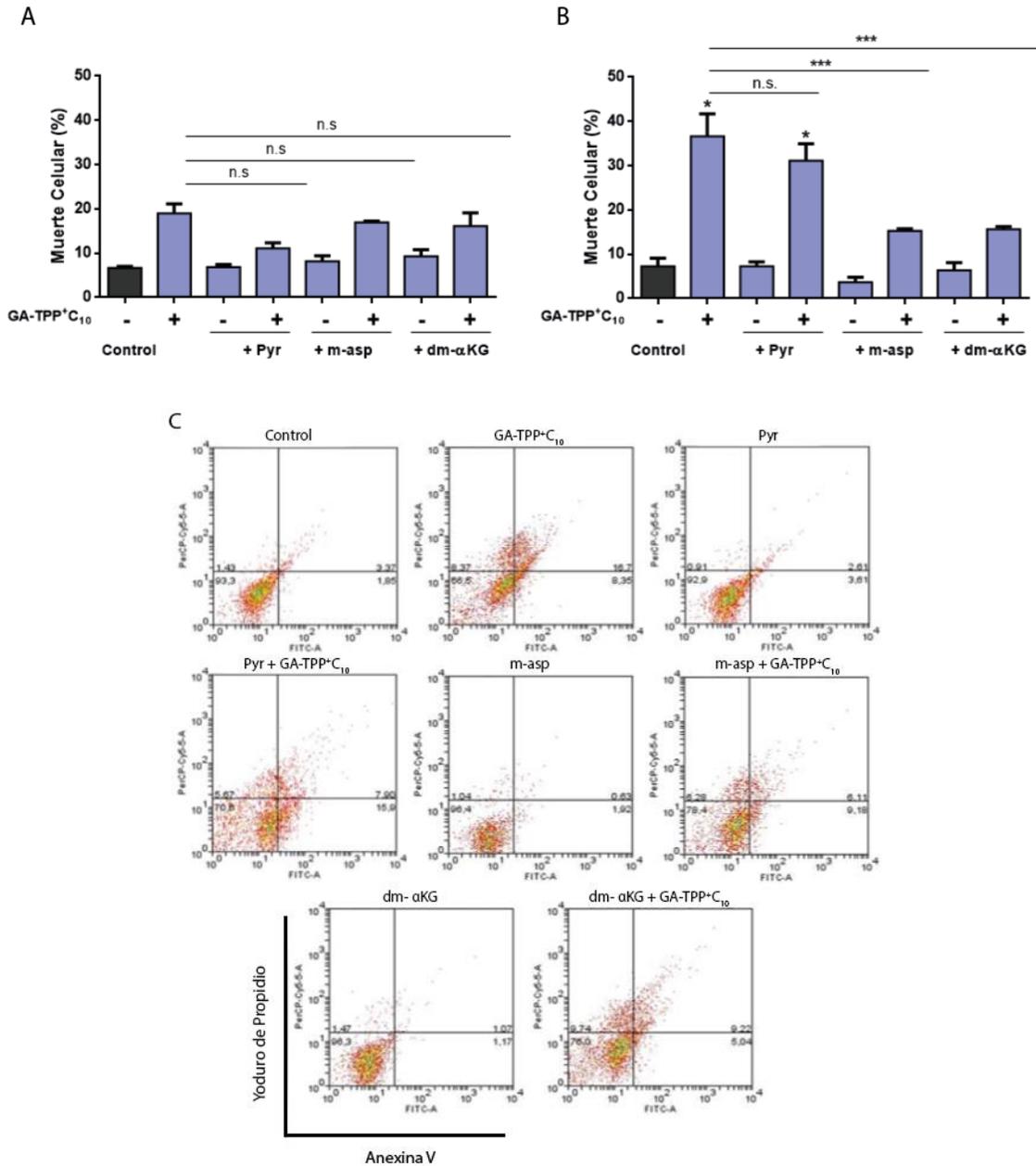


Figura 5. Los metabolitos m-asp y dm-αKG revierten la muerte inducida por GA-TPP+C₁₀. Mediante la doble tinción de AV/PI se evaluó la muerte total (porcentaje de poblaciones celulares AV+/PI+, AV+/PI- y AV-/PI+) desencadenada por GA-TPP+C₁₀ 20 μM. A) Estimulación con los metabolitos (pyr 5 mM, m-asp 2 mM y dm-αKG 5 mM) por 24 horas. B) Estimulación con los metabolitos por 48 horas. C) Imagen representativa de las células estimuladas por 48 horas. Los valores son expresados como promedio ± SEM, N = 4. n.s. = no significativo; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ con respecto al control (DMSO).

6.5. AMPK es activada por efecto de GA-TPP+C₁₀ promoviendo la sobrevida celular.

Debido a la alteración mitocondrial generada por GA-TPP+C₁₀, se evaluó si este provocaba la activación de AMPK, un sensor esencial para el monitoreo del suministro de nutrientes celulares y el estado energético, el cual juega un rol crucial en la respuesta adaptativa ante caídas en los niveles de energía [67]. La activación fue determinada mediante western blot midiéndose AMPK total y fosforilado (por detección de la fosforilación en el residuo Thr172 en la subunidad α), al estimular por 24 h con GA-TPP+C₁₀. Obteniéndose que efectivamente AMPK fue activado a las dos concentraciones de compuesto utilizadas (**Figura 6**).

Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo de AV/PI por citometría de flujo al coestimular las células con compuesto C (CC), un inhibidor de AMPK, y GA-TPP+C₁₀ por 24 (**Figura 7A**) y 48 horas (**Figura 7B y 7C**). Como se aprecia en la **Figura 7B-C** la inhibición de AMPK produce un aumento significativo en la muerte inducida por GA-TPP+C₁₀ a las 48 horas de tratamiento, lo cual sugiere que AMPK sería parte de la respuesta de sobrevida ante la estimulación con GA-TPP+C₁₀.

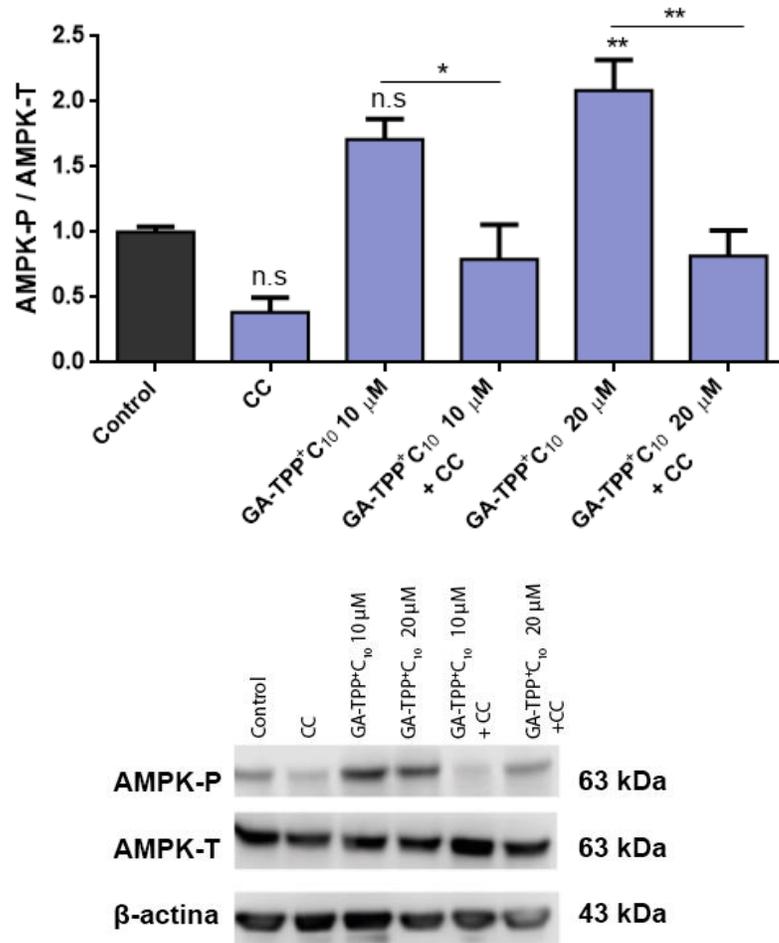


Figura 6. Activación de AMPK por GA-TPP+C₁₀. Western blot de AMPK fosforilado y total a 24 horas de coestimulación con GA-TPP+C₁₀ a 10 y 20 μM en conjunto con compuesto C 1 μM. Los valores son expresados como promedio ± SEM, N = 4. n.s. = no significativo; **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01 con respecto al control (DMSO).

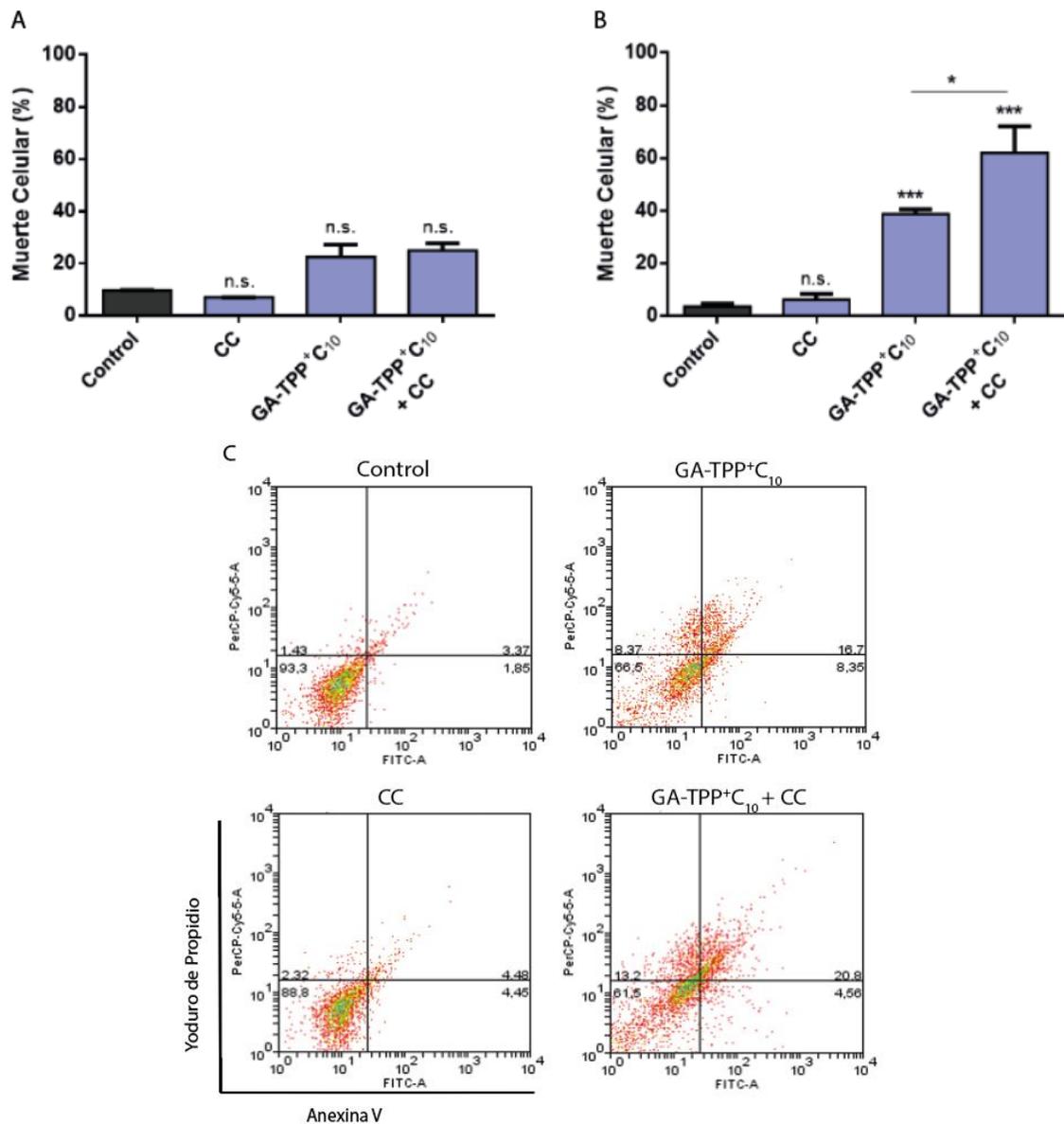


Figura 7. La inhibición de AMPK con compuesto C aumenta la muerte celular al coestimular con GA-TPP+C₁₀. Mediante la doble tinción de AV/PI se determinó la muerte celular total (porcentaje de poblaciones celulares AV⁺/PI⁺, AV⁺/PI⁻ y AV⁻/PI⁺) al coestimular con GA-TPP+C₁₀ 20 a μ M y compuesto C a 1 μ M. A) Estimulación por 24 horas. B) Estimulación por 48 horas. C) Imagen representativa de estimulación a 48 horas. Los valores son expresados como promedio \pm SEM, N = 4. n.s. = no significativo; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ con respecto al control (DMSO).

6.6. Efecto de la coestimulación de GA-TPP+C₁₀ con N-acetil-cisteína y dimetil- α -cetoglutarato sobre la activación de AMPK.

Existe evidencia que muestra que altas concentraciones de ROS pueden provocar la activación de AMPK [68], es por esto que se midió su activación en células preincubadas con el antioxidante n-acetil-cisteína (NAC) para evaluar si el ROS generado por GA-TPP+C₁₀ participa en la activación de AMPK. Además, también se estimuló con dm- α KG para evaluar si la reversión parcial de la inhibición del α KGDHc provoca cambios en la activación de AMPK desencadenada por GA-TPP+C₁₀.

Como se observa en la **Figura 8A** el cotratamiento de GA-TPP+C₁₀ con NAC no presenta cambios con respecto al tratamiento con GA-TPP+C₁₀ lo que implica que las ROS no participan en la activación de AMPK. Por otro lado, el tratamiento de coestimulación de GA-TPP+C₁₀ junto con dm- α KG provoca una mayor activación de AMPK (**Figura 8B**).

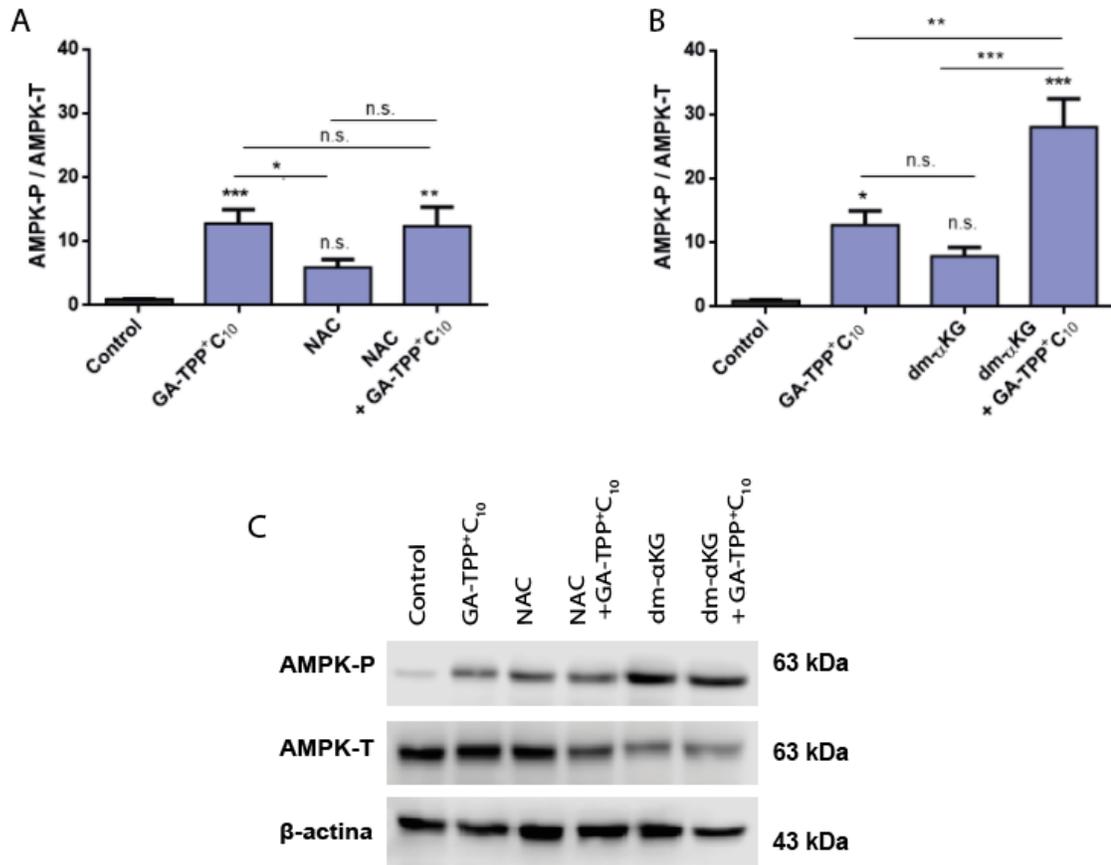


Figura 8. Activación de AMPK por la coestimulación de GA-TPP+C₁₀ con NAC o dm-αKG. Se determinó la activación de AMPK por western blot luego de tratamientos de 24 horas con NAC y dm-αKG, ambos a 5 mM y GA-TPP+C₁₀ a 20 μM. Se midió AMPK fosforilada versus AMPK total al estimular con GA-TPP+C₁₀ en conjunto con A) NAC o con B) dm-αKG. C) Imagen representativa del western blot de ambos tratamientos. Los valores son expresados como promedio ± SEM, N = 4. n.s. = no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ con respecto al control (DMSO).

6.7. GA-TPP⁺C₁₀ induce la fragmentación de la red mitocondrial.

Posteriormente se evaluó si GA-TPP⁺C₁₀ es capaz de afectar la morfología de la red mitocondrial, ya que podría sufrir cambios por la alteración del metabolismo mitocondrial que genera. El análisis de la morfología mitocondrial fue realizado luego de un estímulo con GA-TPP⁺C₁₀, además, se evaluó si el coestimulo con compuesto C y dm- α KG por separado, son capaces de revertir su efecto. Para esto, las células fueron transfectadas con el plasmidio mt-YFP, el cual codifica para una proteína fluorescente amarilla con una secuencia de destinación mitocondrial.

En la **Figura 9A** se muestran las imágenes representativas de cada condición. Para evaluar la morfología mitocondrial se analizaron dos parámetros, el área total de las mitocondrias por cada célula y el largo promedio de las ramificaciones mitocondriales. La mayoría de los tratamientos realizados no provocaron cambios en el área mitocondrial respecto al control, con excepción del tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀ más dm- α KG (**Figura 9B**).

Sin embargo, el largo promedio de las ramificaciones sí se vio afectado, en donde GA-TPP⁺C₁₀ generó una disminución considerable de estas, mostrando provocar la formación de pequeñas mitocondrias con ramificaciones muy cortas que aparentemente se observan como “gránulos” (**Figura 9C**).

Por otro lado, la inhibición de AMPK mostró provocar un mayor largo de las ramificaciones y revierte en forma parcial el tratamiento con GA-TPP+C₁₀, lo que aparentemente se observa como mitocondrias con formas esféricas con un tamaño un poco mayor que las tratadas con GA-TPP+C₁₀. Los mismos resultados fueron obtenidos con el cotratamiento con dm-αKG (**Figura 9C**).

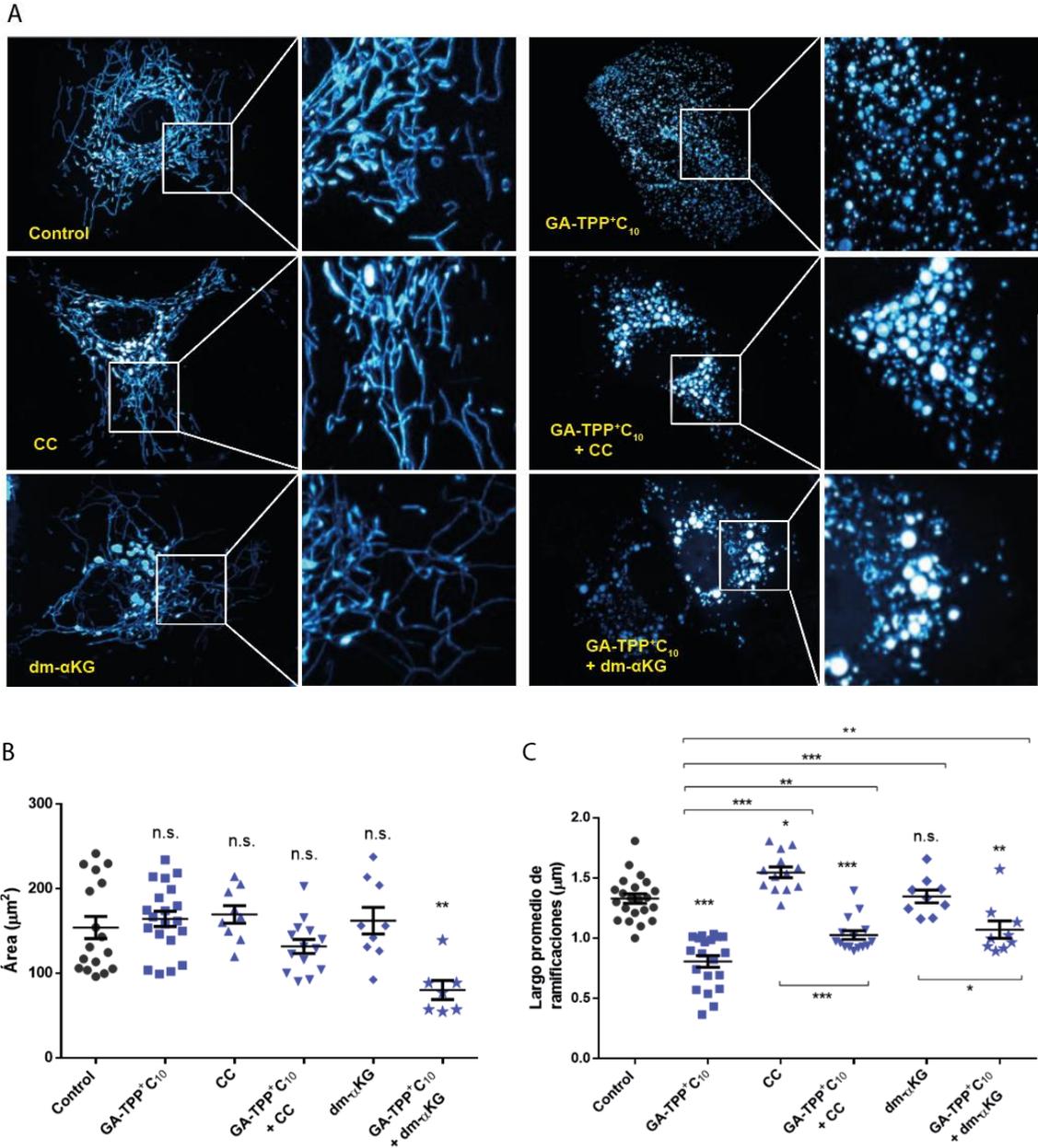


Figura 9. GA-TPP+C₁₀ aumenta la fragmentación mitocondrial. Las células fueron tratadas por 4 horas con cada tratamiento, estimulándose con GA-TPP+C₁₀ a 20 µM, compuesto C a 1 µM y dm-αKG a 5 mM. A) Imágenes representativas de la morfología mitocondrial con cada tratamiento. B) Área promedio mitocondrial. C) Largo promedio de ramificaciones mitocondrial. Los valores son expresados como promedio ± SEM. n.s. = no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ con respecto al control (DMSO).

6.8. La inhibición de la fisión mitocondrial provoca una mayor muerte en las células tratadas con GA-TPP⁺C₁₀.

La dinámica mitocondrial es un proceso que incluye a la fusión y fisión. Es particularmente importante en el cáncer, en donde la forma de la red mitocondrial se ve generalmente alterada. En este contexto, una forma fragmentada puede promover la resistencia a la apoptosis y favorecer la proliferación [31].

Los resultados de morfología mitocondrial mostraron que GA-TPP⁺C₁₀ induce una considerable fragmentación mitocondrial (**Figura 9**), en la cual podría estar involucrada AMPK para promover la supervivencia celular. Es por esto que se evaluó la muerte celular al inhibir el proceso de fisión mitocondrial usando Mdivi-1, un inhibidor de Drp1, a una concentración de 20 μM.

Como se muestra en la **Figura 10**, la muerte celular aumenta significativamente cuando se inhibe la fisión mitocondrial y se estimula con GA-TPP⁺C₁₀ a 24 y 48 horas. Esto indica nuevamente que la fisión mitocondrial también participa como respuesta de rescate al efecto inducido por GA-TPP⁺C₁₀.

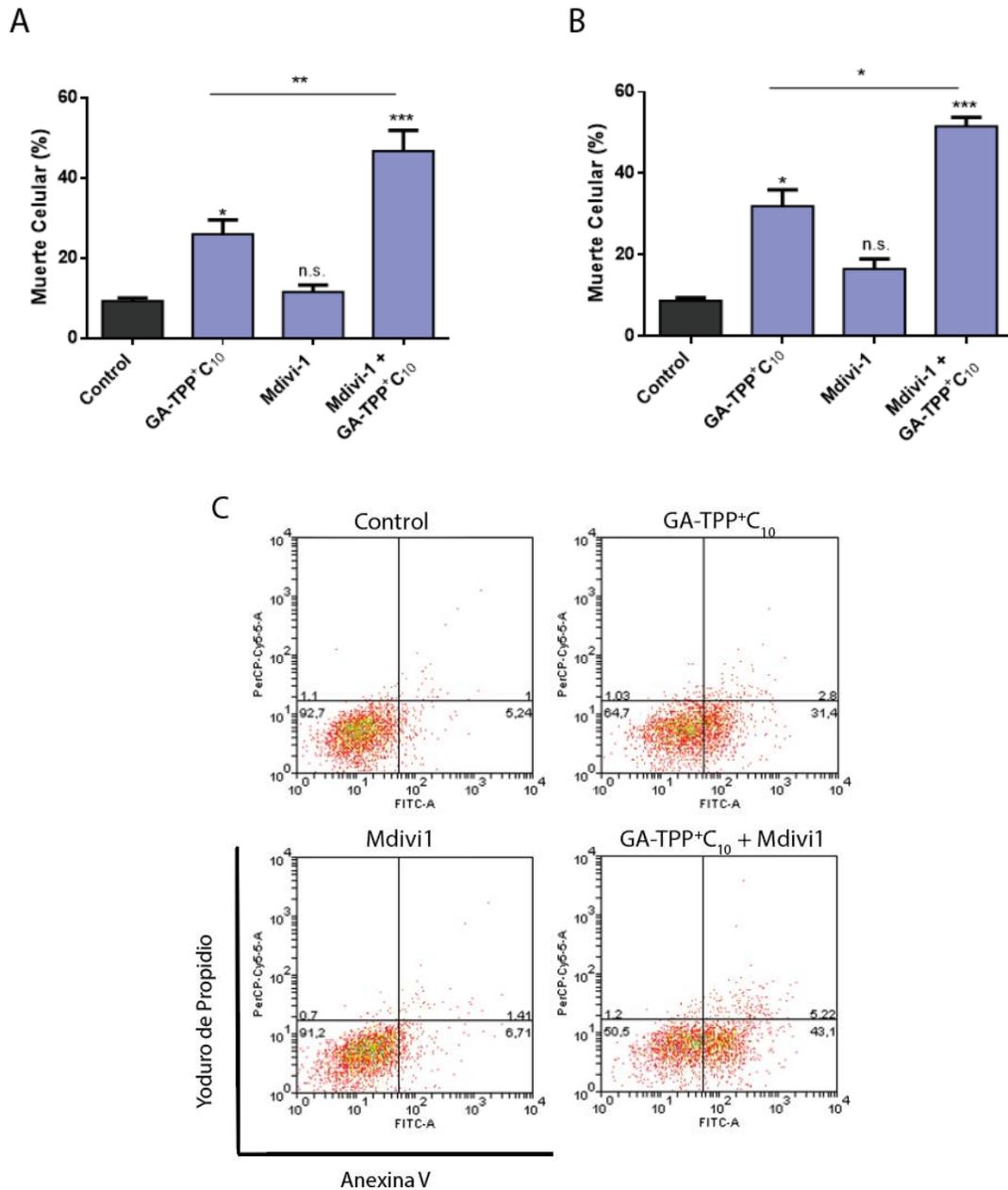


Figura 10. Inhibición de la fisión mitocondrial aumenta el efecto citotóxico de GA-TPP⁺C₁₀. Mediante la doble tinción de AV/PI se determinó la muerte celular total (porcentaje de poblaciones celulares AV⁺/PI⁻, AV⁺/PI⁺ y AV⁻/PI⁺), al inhibir el proceso de fisión mitocondrial usando Mdivi-1 y GA-TPP⁺C₁₀ ambos a 20 μM de concentración. Las células fueron tratadas por 24 A) y 48 horas B). C) Imagen representativa de las 24 horas de tratamiento. Los valores son expresados como promedio ± SEM, N = 4. n.s. = no significativo; **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,001 con respecto al control (DMSO)

7. Discusión

El cáncer de pulmón presenta una elevada incidencia y mortalidad en todo el mundo [5], y sin embargo, a pesar de las mejoras en el diagnóstico y terapias realizadas durante los últimos 30 años, el pronóstico para los pacientes con cáncer de pulmón sigue siendo insatisfactorio [69]. Las respuestas a las terapias estándar actuales son pobres, excepto para los cánceres más localizados, sin embargo, este tipo de cáncer suele ser detectado en los estadios más tardíos de la enfermedad [5].

Aun cuando se utilizan terapias contra blancos moleculares específicos como EGFR o ALK, las mutaciones presentes en estos se encuentran en un porcentaje muy bajo de los adenocarcinomas (aproximadamente 15 y 7% respectivamente), además, este tipo de cáncer suele presentar resistencia a los tratamientos contra estos blancos y su utilización suele provocar diversos efectos secundarios [69]. Más destacable es el hecho que hasta la fecha no ha sido posible desarrollar terapias efectivas contra KRAS [62], cuyas mutaciones presentan la mayor incidencia en los adenocarcinomas de pulmón, estando presente en el 25% de estos [61]. Su importancia radica en que se ha asociado con un peor pronóstico con respecto a los adenocarcinomas que no la presentan [60].

Es por esto que se hace necesario buscar nuevos blancos terapéuticos, siendo una buena estrategia basarse en las características compartidas por los diferentes tipos de tumores, más que en las diferencias específicas de cada uno. Esto es fundamental en el cáncer de pulmón, ya que es muy heterogéneo, presentando diversos subtipos, cada uno con diferentes mutaciones [70].

En este sentido, la mitocondria tumoral es un buen blanco terapéutico debido a que este organelo resulta ser esencial para el desarrollo y progresión del cáncer [71]. Es por esto que se han desarrollado distintos compuestos con acción mitocondrial para inhibir su metabolismo, y basándose en la característica de su $\Delta\Psi_m$ elevado, fue posible desarrollar distintos compuestos que se dirigen selectivamente a esta, como los decil-polihidroxibenzoatos-TPP⁺ desarrollados en el laboratorio [52].

Los decil-polihidroxibenzoatos-TPP⁺ fueron probados en distintos estudios desarrollados en el laboratorio, mostrando la capacidad de inducir muerte celular mediada por apoptosis en células de cáncer de mama [53]. En adición, TPP⁺C₁₀ fue probado en un modelo murino singénico de cáncer de mama mostrando su efectividad antitumoral [52]. Además, recientemente se obtuvo que GA-TPP⁺C₁₀ fue capaz de producir una inhibición de distintos blancos moleculares mitocondriales, de una forma dependiente del tiempo en células de cáncer de mama [54].

Por otra parte, los compuestos decil-polihidroxibenzoatos-TPP⁺ utilizados en este estudio provocaron una disminución de la viabilidad de líneas celulares de cáncer de pulmón humano (**Tabla 1**). En particular el compuesto sobre el cual se centró este estudio, GA-TPP⁺C₁₀ mostró un efecto citotóxico mediado principalmente por apoptosis sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549 (**Figura 5**).

Por otro lado, los compuestos conjugados a TPP⁺, metil-TPP [66] y GA-TPP⁺C₁₀, en cultivo primario de miocitos y en células de cáncer de mama respectivamente [54], han mostrado ser capaces de producir una inhibición de la actividad del complejo α KGDH, el cual está formado por tres subunidades (E1, E2 y E3) que oxidan y decarboxilan el α -cetoglutarato uniéndolo a la coenzima-A generando como producto succinil-CoA y NADH [27]. Este complejo enzimático es esencial para el funcionamiento de la fosforilación oxidativa, ya que modula el remodelamiento metabólico en respuesta a los requerimientos energéticos de las células cancerígenas [28].

De la misma manera GA-TPP⁺C₁₀ mostró provocar cambios en los parámetros cinéticos del complejo enzimático α KGDH, con una disminución de la V_{máx} y un aumento de la K_m en la línea A549, mostrando un patrón de tipo inhibición mixta (**Figura 4**). Sin embargo, es importante destacar que no se evaluó si esta inhibición es por interacción directa con el α KGDHc. Lo que implica que el efecto

inhibitorio puede ser consecuencia de la alteración de los otros parámetros provocado por GA-TPP+C₁₀, ya que este complejo es sensible a los niveles de NADH, ROS, ATP, ADP, Pi y Ca⁺² [27].

En particular, la concentración de Ca⁺² mitocondrial es dependiente del $\Delta\Psi_m$ [72], ya que de este depende su entrada a la mitocondria a través del uniporte de calcio mitocondrial [73]. El Ca⁺² es un regulador importante de la actividad de las enzimas piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y del α KGDHc aumentando la afinidad por su sustrato [27]. Entonces, la disminución de Ca⁺² mitocondrial, puede afectar directamente la actividad del complejo α KGDH, disminuyéndola.

Por otra parte, el complejo enzimático α KGDH también es sensible a los niveles de ROS, pudiendo inhibir su actividad a altas concentraciones [74]. En consecuencia, el aumento de los niveles de ROS provocado por GA-TPP+C₁₀ (**Figura 3C-D**) podrían ser responsables al menos en parte de la inhibición de α KGDHc, y además la subunidad E3 de este complejo enzimático también puede generar H₂O₂ por acumulación de NADH [75].

Distintos grupos de investigación han demostrado una interacción directa entre el complejo I y el α KGDHc, a través de la razón NAD⁺/NADH, donde el NAD⁺ es un cofactor del α KGDHc y otras enzimas del ciclo TCA las que lo reducen a

NADH. Siendo este último sustrato para el complejo I, generando NAD^+ como producto [76, 77]. Este complejo perteneciente a la ETC, participa en la generación de la fuerza motriz de protones para la respiración acoplada a la síntesis de ATP [78]. Estas reacciones acopladas permiten sintetizar metabolitos del ciclo TCA que son precursores para la generación de aspartato, un metabolito esencial para la proliferación celular ya que permite la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos [24, 25]. Es por esto que, la posible inhibición del complejo I, que fue comprobada en otros modelos [54], llevaría a una disminución del NAD^+ , el cosustrato de αKGDHc , causando una disminución de los niveles de aspartato.

En consecuencia, la adición de piruvato a las células cancerígenas tratadas con inhibidores de la ETC rescata los niveles de aspartato y proliferación por generación de NAD^+ a través de la oxidación a ácido láctico, mediante la enzima citosólica lactato deshidrogenasa [26]. Sin embargo, los resultados obtenidos en la línea celular A549 demostraron que solo la suplementación con los sustratos permeables a la célula $\text{dm-}\alpha\text{KG}$, un sustrato de αKGDH , y m-asp , pero no pyr , parcialmente rescatan de la muerte celular inducida por $\text{GA-TPP}^+\text{C}_{10}$ a las 48 horas de tratamiento (**Figura 5B**), lo que permitió comprobar que la inducción de muerte es preferentemente debido a la disminución en los niveles de aspartato, y no a una disminución del NADH causado por la inhibición del αKGDHc .

Posteriormente, para evaluar un posible mecanismo de respuesta adaptativa antes las alteraciones en el metabolismo mitocondrial causadas por GA-TPP+C₁₀, se evaluó la activación de AMPK, encontrándose que fue activada a 24 horas de estimulación (**Figura 6**).

La activación de AMPK puede ocurrir por diferentes vías, siendo una de estas por concentraciones muy elevadas de ROS, las cuales provocan la oxidación de dos residuos de cisteína de la subunidad AMPK α provocando un cambio conformacional, que promueve su fosforilación en el residuo Thr172 de una forma independiente de la concentración de AMP [68]. Sin embargo, cuando se usó el antioxidante NAC, se obtuvo que no disminuyó su fosforilación respecto del tratamiento con GA-TPP+C₁₀ (**Figura 8A**), descartándose la participación de las ROS en la activación de AMPK en este contexto.

Por otro lado, la vía canónica de activación de AMPK es por aumento del AMP el cual se une a la subunidad reguladora (gamma) de AMPK, promoviendo su fosforilación por LKB1 en el residuo Thr172 [79, 80]. Sin embargo, se debe tener en consideración que la línea celular A549 tiene mutado a LKB1 lo cual provoca la pérdida de su función [59, 81], por tanto, no sería sensible a un posible aumento de los niveles de AMP.

Otra vía de activación clásica de AMPK es por aumento del Ca^{+2} en el citoplasma [81], lo cual en este caso puede ser consecuencia de la caída en el $\Delta\Psi_m$, en donde el aumento de Ca^{+2} en el citoplasma provoca la activación de proteínas quinasas activadas por Ca^{+2} /calmodulina (CaMKK), especialmente la CaMKK β la cual también fosforila a AMPK en el residuo Thr172 [81].

Además, el tratamiento con GA-TPP+C₁₀ más el metabolito dm- α KG mostró provocar un aumento en AMPK fosforilado en el residuo Thr172 respecto al control (**Figura 8B**). Este fenómeno se ha observado con anterioridad, en donde α KG fue suplementado en la dieta a *C. elegans* con dieta restringida, lo que finalmente provocó un aumento en su longevidad. En este estudio observaron que α KG provocó la inhibición de la ATP sintasa lo que conllevó finalmente a la activación de AMPK por disminución de la síntesis de ATP [82].

Luego fue evaluada una de las vías de respuesta adaptativa que puede ser activada por AMPK, la fisión mitocondrial. Ya que antecedentes muestran que AMPK puede mediar rápidamente la fisión mitocondrial en respuesta a estrés energético. Proceso que se desencadena por la fosforilación de MFF por parte de AMPK, el cual se encuentra en la membrana mitocondrial externa, actuando como un receptor de Drp1, una GTPasa cuyo rol es esencial en la fisión mitocondrial [38].

Los resultados de análisis de morfología mitocondrial mostraron que GA-TPP⁺C₁₀ produjo una considerable fragmentación mitocondrial, particularmente reduciendo el largo de las ramificaciones, sin cambios en el área total de las mitocondrias de cada célula (**Figura 9**). Esto puede deberse a que las células fueron incubadas solo por 4 horas con los tratamientos, por lo que tal vez este periodo de tiempo no fue suficiente para observar una disminución en el área total de mitocondrias por eliminación de estas por mitofagia. Ya que la fisión mitocondrial es un proceso importante para que posteriormente ocurra la mitofagia [83], la que puede verse gatillada además por la pérdida del $\Delta\Psi_m$ [84], y que previene la salida del citocromo c desde la mitocondria permitiendo evadir la apoptosis [85].

Por otra parte, el tratamiento de GA-TPP⁺C₁₀ al inhibir AMPK mostró un rescate parcial de la fragmentación provocada por el compuesto (**Figura 9A y 9C**). Además, al inhibir AMPK solo con compuesto C se produjo un aumento de la longitud de las ramificaciones respecto del control (**Figura 9C**), comprobando la participación de AMPK en la fragmentación mitocondrial.

En adición a lo anterior, la coestimulación de GA-TPP⁺C₁₀ con dm- α KG también mostró una reversión parcial del efecto de GA-TPP⁺C₁₀ en la fragmentación mitocondrial (**Figura 9C**), demostrando nuevamente que este metabolito cuando es adicionado en forma exógena logra revertir parcialmente el efecto del

compuesto sobre la inhibición del α KGDHc. Sin embargo, también es posible que el dm- α KG además haya provocado la inhibición de AMPK y por este motivo provocó una reversión parcial del efecto en la fragmentación que posee GA-TPP+C₁₀.

Sumado a los efectos de la activación de AMPK sobre la fragmentación mitocondrial, su inhibición causó una mayor muerte celular en presencia de GA-TPP+C₁₀ a las 48 horas de tratamiento (**Figura 10**). Lo que sugiere que la activación de AMPK puede corresponder a un tipo de respuesta adaptativa que promueve la fragmentación mitocondrial como un mecanismo de sobrevida, ya que la fisión mitocondrial permite separar y eliminar por mitofagia selectivamente las porciones de mitocondrias disfuncionales que generen excesivas cantidades de ROS [39], así como también las mitocondrias despolarizadas que puedan activar el proceso apoptótico [85].

Si bien los resultados muestran que a las 4 horas de tratamiento ya hay fragmentación mitocondrial en la cual participa AMPK (**Figura 9**), su activación fue evaluada y corroborada a las 24 horas de tratamiento (**Figura 6**). Sin embargo, no es hasta las 48 horas que se hace evidente su efecto prosobrevida, ya que cuando se inhibe aumenta la muerte celular (**Figura 7**). Por otro lado, cuando se inhibe la fisión mitocondrial, fenómeno que permite que ocurra posteriormente la mitofagia [83], se provoca una mayor muerte celular a 24 y 48

horas de tratamiento (**Figura 10**). Esto implica que la fragmentación mitocondrial puede ser gatillada por diferentes vías de señalización, las que pueden estar ocurriendo en forma más temprana.

En adición a lo anterior, se debe tener en consideración que GA-TPP⁺C₁₀ puede haber provocado la activado de otras vías que llevan a la fisión mitocondrial. Como por ejemplo, por aumento de Ca⁺² citoplasmático, el cual provoca la activación de calcineurina, una fosfatasa que puede desfosforilar a Drp1 promoviendo su traslocación a la mitocondria y posterior fragmentación [86]. También se debe considerar que otras vías de señalización pueden estar participando, permitiendo rescatar de la muerte celular a los tiempos más tempranos.

Estos resultados en conjunto sugieren que la fisión mitocondrial forma parte de la respuesta adaptativa frente al efecto citotóxico de GA-TPP⁺C₁₀, respuesta en la cual participa AMPK.

8. Conclusiones

El compuesto GA-TPP⁺C₁₀ inhibe al complejo α KGDH, además de alterar una serie de parámetros bioenergéticos provocando un efecto citotóxico en las células cancerígenas de pulmón humano. Ante este daño celular se desencadena la activación de AMPK, la cual media una respuesta adaptativa prosobrevida con un aumento de la fisión mitocondrial (**Figura 11**).

Los resultados obtenidos comprueban que GA-TPP⁺C₁₀ tiene un efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer de pulmón. Lo que amerita que este compuesto prosiga en estudio para desentrañar su mecanismo molecular exacto. Además de comprobar su efecto en estudios *in vivo*, para así continuar con su evaluación como un posible tratamiento para el cáncer de pulmón.

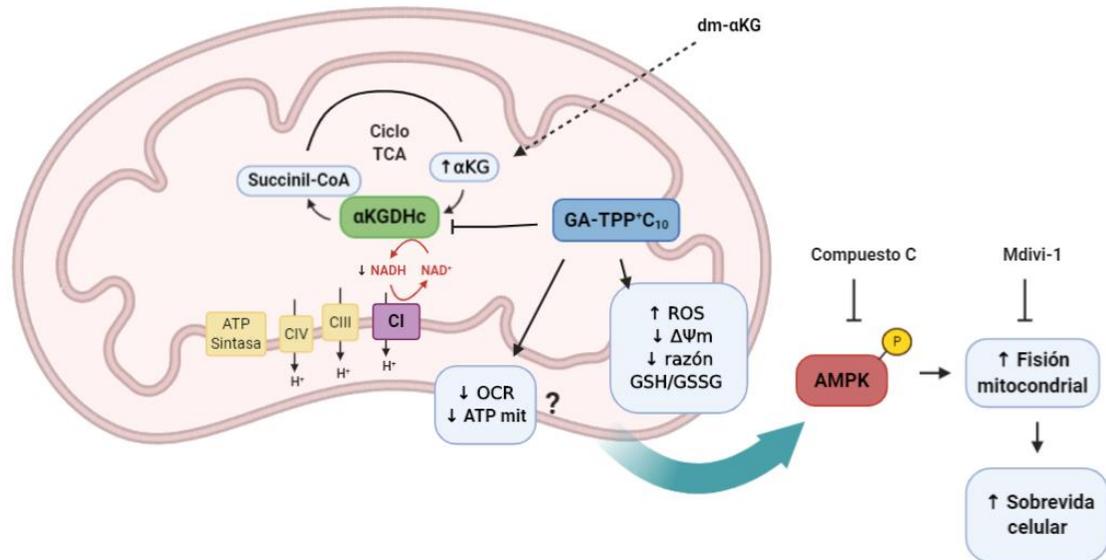


Figura 11. Resumen de mecanismo de acción de GA-TPP+C₁₀. El compuesto GA-TPP+C₁₀ provoca la inhibición del complejo αKGDH, y cuando se adiciona el metabolito exógeno dm-αKG su inhibición es revertida en forma parcial. Por otro lado, el compuesto provoca la alteración de una serie de parámetros, como la caída del $\Delta\Psi_m$, el aumento de los niveles de ROS y la disminución de la razón GSH/GSSG. En adición, la disminución en la generación de NADH por parte de αKGDHc debido a su inhibición podrían provocar una caída de la tasa de respiración mitocondrial (OCR) y de la síntesis de ATP mitocondrial (ATP mit), sin embargo, esto no fue evaluado. La suma de los efectos de la alteración de estos parámetros puede provocar la activación de AMPK, la cual media un aumento en la fisión mitocondrial como respuesta adaptativa generando un aumento en la supervivencia celular.

9. Referencias

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Burotto, M., et al., *Lung Cancer in Chile*. J Thorac Oncol, 2019. **14**(9): p. 1504-1509.
3. Globocan, *World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Rates: cancers by population: Chile; source: Globocan 2018*. International Agency for Research on Cancer., 2018. **Accessed February 16, 2020**.
4. Zappa, C. and S.A. Mousa, *Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances*. Transl Lung Cancer Res, 2016. **5**(3): p. 288-300.
5. Gridelli, C., et al., *Non-small-cell lung cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15009.
6. Couraud, S., et al., *Lung cancer in never smokers--a review*. Eur J Cancer, 2012. **48**(9): p. 1299-311.
7. Bhattacharya, P., S.K. Dessain, and T.L. Evans, *Palliative Care in Lung Cancer: When to Start*. Curr Oncol Rep, 2018. **20**(11): p. 90.
8. Kvale, P.A., et al., *Palliative care in lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 368S-403S.
9. Masuda, E., et al., *Palliative procedures in lung cancer*. Semin Intervent Radiol, 2013. **30**(2): p. 199-205.
10. Wildiers, H., et al., *Atropine, hyoscine butylbromide, or scopolamine are equally effective for the treatment of death rattle in terminal care*. J Pain Symptom Manage, 2009. **38**(1): p. 124-33.
11. Boyar, M. and H. Raftopoulos, *Supportive care in lung cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2005. **19**(2): p. 369-87, vii.
12. Paez, J.G., et al., *EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy*. Science, 2004. **304**: p. 1497-1499.
13. Zugazagoitia, J., et al., *Current Challenges in Cancer Treatment*. Clin Ther, 2016. **38**(7): p. 1551-66.
14. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Cancer metabolism: a therapeutic perspective*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(1): p. 11-31.
15. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 325-37.
16. Wein House, S., et al., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 267-269.
17. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
18. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. Free Radic Res, 2010. **44**(5): p. 479-96.

19. Fantin, V.R., J. St-Pierre, and P. Leder, *Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(6): p. 425-34.
20. Jose, C., N. Bellance, and R. Rossignol, *Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma?* *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1807**(6): p. 552-61.
21. Whitaker-Menezes, D., et al., *Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(23): p. 4047-64.
22. Altman, B.J., Z.E. Stine, and C.V. Dang, *From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(10): p. 619-34.
23. Park, J.H., et al., *Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer*. *Cell Rep*, 2016. **14**(9): p. 2154-2165.
24. Sullivan, L.B., et al., *Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells*. *Cell*, 2015. **162**(3): p. 552-63.
25. Birsoy, K., et al., *An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis*. *Cell*, 2015. **162**(3): p. 540-51.
26. Van Vranken, J.G. and J. Rutter, *You Down With ETC? Yeah, You Know D!* *Cell*, 2015. **162**(3): p. 471-3.
27. Strumilo, S., *Short-Term Regulation of the α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex by Energy-Linked and Some Other Effectors*. *Biochemistry (Moscow)*, 2005. **70**(7): p. 726-729.
28. Vatrinet, R., et al., *The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in cancer metabolic plasticity*. *Cancer Metab*, 2017. **5**: p. 3.
29. Goodwin, M.L., et al., *Modeling alveolar soft part sarcomagenesis in the mouse: a role for lactate in the tumor microenvironment*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(6): p. 851-862.
30. Viale, A., et al., *Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function*. *Nature*, 2014. **514**(7524): p. 628-32.
31. Pendin, D., R. Filadi, and P. Pizzo, *The Concerted Action of Mitochondrial Dynamics and Positioning: New Characters in Cancer Onset and Progression*. *Front Oncol*, 2017. **7**: p. 102.
32. Modica-Napolitano, J.S. and K.K. Singh, *Mitochondrial dysfunction in cancer*. *Mitochondrion*, 2004. **4**(5-6): p. 755-62.
33. Azzone, G.F., D. Pietrobon, and M. Zoratti, *Determination of the Proton Electrochemical Gradient across Biological Membranes*. *Curr Top Bio*, 1984. **13**: p. 1-77.
34. Rosano, C., *Molecular model of hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane porin (VDAC1): Implication for the design of new cancer therapies*. *Mitochondrion*, 2011. **11**(3): p. 513-9.
35. Tan, A.S., et al., *Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA*. *Cell Metab*, 2015. **21**(1): p. 81-94.
36. Dong, L.F., et al., *Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells*. *Elife*, 2017. **6**.

37. Kim, H., et al., *Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia* Molecular Cell, 2011. **44**(4): p. 532–544.
38. Toyama, E.Q., et al., *AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress*. Science, 2016. **351**(6270): p. 275-281.
39. Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1062-5.
40. Juurlink, B.H.J., et al., *Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system*. Nutr J, 2014. **13**: p. 63.
41. Bigler, J., et al., *CYP2C9 and UGT1A6 Genotypes Modulate the Protective Effect of Aspirin on Colon Adenoma Risk*. Cancer Res, 2001. **61**: p. 3566–3569.
42. Altinoz, M.A., et al., *From epidemiology to treatment: Aspirin's prevention of brain and breast-cancer and cardioprotection may associate with its metabolite gentisic acid*. Chem Biol Interact, 2018. **291**: p. 29-39.
43. Abedi, F., B.M. Razavi, and H. Hosseinzadeh, *A review on gentisic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin: Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects*. Phytother Res, 2020. **34**(4): p. 729-741.
44. Coulter, C., Kelso, G., Lin, T., Smith, R., & Murphy, M., *Mitochondrially Targeted Antioxidants and Thiol Reagents*. Free Radic. Biol. Med, 2000. **28**(10): p. 1547–1554.
45. Min, J.J., Biswal, S., Deroose, C., & Gambhir, S. S. , *Tetraphenylphosphonium as a novel molecular probe for imaging tumors*. J Nucl Med, 2004. **45**(4): p. 636-643.
46. Ross, M.F., et al., *Lipophilic Triphenylphosphonium Cations as Tools in Mitochondrial Bioenergetics and Free Radical Biology*. Biochemistry (Moscow), 2005. **70**(2): p. 222-230.
47. Cheng, G., et al., *Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2634-44.
48. Cheng, G., et al., *Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 285.
49. Smith, R.A. and M.P. Murphy, *Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1201**: p. 96-103.
50. Wei, Y., et al., *The Role of SKQ1 (Visomitin) in Inflammation and Wound Healing of the Ocular Surface*. Ophthalmol Ther, 2019. **8**(1): p. 63-73.
51. De Francesco, E.M., et al., *Dodecyl-TPP Targets Mitochondria and Potently Eradicates Cancer Stem Cells (CSCs): Synergy With FDA-Approved Drugs and Natural Compounds (Vitamin C and Berberine)*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 615.
52. Peredo-Silva, L., et al., *Derivatives of alkyl gallate triphenylphosphonium exhibit antitumor activity in a syngeneic murine model of mammary adenocarcinoma*. Toxicol Appl Pharmacol, 2017. **329**: p. 334-346.
53. Sandoval-Acuna, C., et al., *Destabilization of mitochondrial functions as a target against breast cancer progression: Role of TPP(+)-linked-polyhydroxybenzoates*. Toxicol Appl Pharmacol, 2016. **309**: p. 2-14.
54. Fuentes-Retamal, S., et al., *Complex Mitochondrial Dysfunction Induced by TPP(+)-Gentisic Acid and Mitochondrial Translation Inhibition by Doxycycline Evokes Synergistic Lethality in Breast Cancer Cells*. Cells, 2020. **9**(2).
55. Valente, A.J., et al., *A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture*. Acta Histochem, 2017. **119**(3): p. 315-326.

56. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
57. Nelson, A., et al., *P3.03-016 Morphometric Genotyping Identifies Lung Cancer Cells Harboring Target Mutations; Cell-CT® Platform Detects Gene Abnormalities*. Journal of Thoracic Oncology, 2017. **12**: p. S2278-S2279.
58. Ikediobi, O.N., et al., *Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(11): p. 2606-12.
59. Korrodi-Gregorio, L., et al., *From Proteomic Analysis to Potential Therapeutic Targets: Functional Profile of Two Lung Cancer Cell Lines, A549 and SW900, Widely Studied in Pre-Clinical Research*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0165973.
60. Pan, W., et al., *KRAS mutation is a weak, but valid predictor for poor prognosis and treatment outcomes in NSCLC: A meta-analysis of 41 studies*. Oncotarget, 2016. **7**: p. 8373-8388.
61. Gao, W., et al., *KRAS and TP53 mutations in bronchoscopy samples from former lung cancer patients*. Mol Carcinog, 2017. **56**(2): p. 381-388.
62. Roman, M., et al., *KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 33.
63. Tetlow, A.L. and F. Tamanoi, *The Ras superfamily G-proteins*. Enzymes, 2013. **33 Pt A**: p. 1-14.
64. Murray, S., et al., *Somatic Mutations of the Tyrosine Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor and Tyrosine Kinase Inhibitor Response to TKIs in Non-small Cell Lung Cancer: An Analytical Database*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(8): p. 832–839.
65. Skoulidis, F., et al., *Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities*. Cancer Discov, 2015. **5**(8): p. 860-77.
66. Elkalaf, M., et al., *Mitochondrial Probe Methyltriphenylphosphonium (TPMP) Inhibits the Krebs Cycle Enzyme 2-Oxoglutarate Dehydrogenase*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161413.
67. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 251-62.
68. Zmijewski, J.W., et al., *Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 33154-64.
69. Lemjabbar-Alaoui, H., et al., *Lung cancer: Biology and treatment options*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1856**(2): p. 189-210.
70. Hirsch, F.R., et al., *Lung cancer: current therapies and new targeted treatments*. The Lancet, 2017. **389**(10066): p. 299-311.
71. Maiuri, M.C. and G. Kroemer, *Essential role for oxidative phosphorylation in cancer progression*. Cell Metab, 2015. **21**(1): p. 11-2.
72. Bernardi, P., *Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers, and Permeability Transition*. Physiol. Rev, 1999. **79**(4): p. 1127–1155.
73. Baughman, J.M., et al., *Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter*. Nature, 2011. **476**(7360): p. 341-5.

74. Tretter, L. and V. Adam-Vizi, *Inhibition of Krebs Cycle Enzymes by Hydrogen Peroxide: A Key Role of α -Ketoglutarate Dehydrogenase in Limiting NADH Production under Oxidative Stress*. J. Neurosci., 2000. **20**(24): p. 8972–8979.
75. Starkov, A.A., et al., *Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species*. J Neurosci, 2004. **24**(36): p. 7779-88.
76. Sumegi, B. and P.A. Srere, *Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases*. J Biol Chem, 1984. **259**(24): p. 15040-15045.
77. Porpaczy, Z., B. Sumegi, and I. Alkonyi, *Interaction between NAD-dependent Isocitrate Dehydrogenase, α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex, and NADH:Ubiquinone Oxidoreductase*. J Biol Chem, 1987. **262**(20): p. 9509-9514.
78. Urra, F.A., et al., *The Mitochondrial Complex(I)ty of Cancer*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 118.
79. Hawley, S.A., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. J Biol, 2003. **2**(4): p. 28.
80. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. Curr Biol, 2003. **13**(22): p. 2004-8.
81. Hurley, R.L., et al., *The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 29060-6.
82. Chin, R.M., et al., *The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR*. Nature, 2014. **510**(7505): p. 397-401.
83. Tong, M., D. Zablocki, and J. Sadoshima, *The role of Drp1 in mitophagy and cell death in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2020. **142**: p. 138-145.
84. Jin, S.M. and R.J. Youle, *PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 4): p. 795-9.
85. Gottlieb, E., et al., *Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis*. Cell Death Differ, 2003. **10**(6): p. 709-17.
86. Elgass, K., et al., *Recent advances into the understanding of mitochondrial fission*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(1): p. 150-61.