



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias

GA-TPP⁺C₁₀ produce disfunción mitocondrial, reduce la capacidad clonogénica, migratoria y resistencia a doxorubicina promovida por la estabilización de HIF1- α en células cancerosas de pulmón

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas

Charlotte Karin Palominos Osses

Directora y codirectores de tesis:

Dra. Victoria Guixe Leguia
Facultad de Ciencias

Dr. Félix Urra Faúndez
Dr. Jorge Ferreira Parker
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Miembros de la comisión:

Dra. Daniela Sauma
Dr. Álvaro Glavic
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Santiago de Chile
Junio, 2022

*A Polette Alexandra y José Sebastián,
que enfrentan nuevos y emocionantes desafíos.*

Agradecimientos

A mis padres, José y Egilda, por su entrega y paciencia infinita.

A mis hermanos, Polette y José, por las risas y el amor.

A la Dra. Mabel Catalán Díaz, Dr. José Jara Sandoval y Dr. Jorge Ferreira Parker, por instruirme durante los primeros años de mi trabajo en investigación.

Al Dr. Félix Urra Faúndez, Dr. Sebastián Fuentes-Retamal y Camila López Torres, por el apoyo, los consejos y el café incondicional recibido durante los años que trabajamos juntos.

A Constanza y Christopher, por su eterna amistad.

Y por último a Marcelo, por contenerme ante la desesperanza, impulsarme ante las nuevas aventuras y motivarme a ser mejor. Sos lo más grande.

Sin ustedes no podría haber llegado hasta acá. Infinitas gracias.

Financiamiento

La presente tesis fue desarrollada gracias a la Beca Magíster Nacional ANID N° 22191223 (Charlotte Palominos Osses). A su vez, este trabajo contó con el apoyo financiero del proyecto FONDECYT Regular N° 1180296 (Dr. Jorge Ferreira Parker), proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11201322 (Dr. Félix Urra Faúndez), proyecto FONDECYT Postdoctoral N° 3210667 (Dr. Sebastián Fuentes-Retamal) y del proyecto Anillo N° ACT210097. La tesis fue realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Índice General

Índice de Figuras	vi
Índice de Ilustraciones	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	x
1. Introducción	1
1.1. Aspectos generales y epidemiológicos del cáncer de pulmón	1
1.2. Plasticidad metabólica en el cáncer	3
1.3. Hipoxia y microambiente tumoral	6
1.4. Rol del α KGDHc en la progresión del cáncer	8
1.5. Inhibidores del α KGDHc con promisorios efectos antitumorales	10
2. Hipótesis	13
3. Objetivo General	13
4. Objetivos Específicos	13
5. Materiales y métodos	14
5.1. Compuesto en estudio	14
5.2. Cultivos celulares	14
5.3. Análisis de la viabilidad celular	14
5.4. Análisis del ciclo celular	15
5.5. Respiración celular y tasa de acidificación celular en tiempo real	16
5.6. Determinación de los niveles de ATP intracelular	16
5.7. Determinación de potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ROS mitocondrial	17
5.8. Western blotting	18
5.9. Determinación de actividad enzimática de α KGDHc	19
5.10. Migración celular	19
5.11. Ensayo de formación de colonias	20
5.12. Análisis estadístico	20
6. Resultados	21
6.1. Caracterización del efecto de GA-TPP ⁺ C ₁₀ sobre la bioenergética mitocondrial en líneas celulares de cáncer de pulmón, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.	21

6.2. GA-TPP+C ₁₀ produce la inhibición del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDHc) y la degradación vía proteosomal de la subunidad E1 OGDH en condiciones miméticas a hipoxia.....	23
6.3. GA-TPP+C ₁₀ produce disfunción mitocondrial en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, en condiciones miméticas a hipoxia.....	26
6.4. GA-TPP+C ₁₀ induce adaptación metabólica dependiente de AMPK en células cancerosas de pulmón en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.	29
6.5. GA-TPP+C ₁₀ inhibe la formación de colonias, migración celular y resistencia a quimioterápicos, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.	39
7. Discusión.....	47
8. Resumen de resultados y conclusión.....	53
9. Referencias	55

Índice de Figuras

Figura 1. Caracterización de los parámetros mitocondriales de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, A549 y NCI-H1975.	22
Figura 2. Los niveles proteicos de la subunidad E1 OGDH del α KGDHc aumentan con la estabilización de HIF1- α por CoCl ₂ y GA-TPP+C ₁₀ disminuye sus niveles tanto en normoxia como en la condición de mimético de hipoxia.	24
Figura 3. GA-TPP+C ₁₀ induce la degradación vía proteosomal de HIF1- α y OGDH, en condiciones normóxicas y miméticas a hipoxia.	25
Figura 4. GA-TPP+C ₁₀ produce una inhibición de la actividad del α KGDHc, tanto en condición de normoxia como mimético a hipoxia.	26
Figura 5. Efecto de GA-TPP+C ₁₀ sobre la bioenergética mitocondrial de las líneas celulares de cáncer de pulmón, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.	28
Figura 6. GA-TPP+C ₁₀ induce un cambio metabólico hacia la glicólisis, mediante la activación de AMPK, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.	32
Figura 7. La activación de AMPK inducida por GA-TPP+C ₁₀ mantiene la supervivencia celular.	33
Figura 8. AMPK participa en los cambios del nivel de la subunidad E1 OGDH del α KGDHc inducidos por GA-TPP+C ₁₀ , en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia en células A549.	35
Figura 9. Los niveles de VDAC aumentan con el tratamiento de GA-TPP+C ₁₀ en normoxia.	36
Figura 10. Los complejos de la OXPHOS aumentan con el tratamiento de GA-TPP+C ₁₀ , tanto en condiciones de normoxia como de mimético a hipoxia en la línea celular A549.	37
Figura 11. El aumento de las proteínas mitocondriales de membrana es dependiente de AMPK, en la línea A549.	38
Figura 12. La inhibición del complejo III de la cadena transportadora de electrones disminuyó la viabilidad en conjunto con el tratamiento de GA-TPP+C ₁₀ , en la línea celular A549.	39
Figura 13. GA-TPP+C ₁₀ inhibe la formación de colonias en normoxia y mimético a hipoxia.	40
Figura 14. GA-TPP+C ₁₀ disminuye los niveles de PCNA, a través de la activación de AMPK, en normoxia.	42
Figura 15. GA-TPP+C ₁₀ inhibe la migración de las líneas celulares de cáncer de pulmón, en condiciones de mimético a hipoxia.	43
Figura 16. La inhibición de la migración celular inducida por GA-TPP+C ₁₀ , tanto en condición de normoxia y mimético a hipoxia, es independiente de AMPK y de la adición de α KG exógeno.	45

Figura 17. GA-TPP+C ₁₀ vence la resistencia a quimioterápicos generada en condiciones de mimético a hipoxia.	46
---	----

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Rol de α KGDHc en la vía oxidativa y reductiva del ciclo TCA.	9
Ilustración 2. Estructura química de GA-TPP+C ₁₀	14
Ilustración 3. Mecanismo de acción propuesto para GA-TPP+C ₁₀	54

Abreviaturas

αKGDHc	Complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATP	Adenosín trifosfato
Ca²⁺	Calcio
CaMKK2	Proteína quinasa quinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina II
CC	Compuesto c o dorsomorfina
CoA	Coenzima A
CP	Cáncer de pulmón
CPCNP	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
CPCP	Carcinoma de pulmón de células pequeñas
CTE	Cadena transportadora de electrones
DHE	Dihidroetidio
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle
m-αKGDH	Dimetil- α -cetoglutarato
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECAR	Tasa de acidificación extracelular
EMT	Transición epitelio-mesénquima
FAO	Oxidación de ácidos grasos
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
GA-TPP⁺C₁₀	(10-((2,5-dihydroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
HEPES	Ácido 2- [4- (2-hidroxi)etil] piperazin-1-il] etanosulfónico
HIF1-α	Factor de transcripción inducible por hipoxia 1- α

IPP	Inhibidor de proteasas y fosfatasas
K_m	Constante de Michaelis-Menten
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NNT	Nicotinamida nucleótido transhidrogenasa
O₂	Oxígeno
OCR	Tasa de consumo de oxígeno
OGDH	Oxoglutarato deshidrogenasa
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear celular en proliferación
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PHD	Prolil-hidroxilasa
PI	Yoduro de propidio
P_i	Fosfato inorgánico
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Thr172	Treonina 172
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
TPP⁺	Catión trifenilfosfonio
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
V_{max}	Velocidad máxima
ΔΨ_m	Potencial de membrana mitocondrial

Resumen

La plasticidad metabólica de las células cancerosas es el principal factor limitante de la eficacia de fármacos quimioterápicos, siendo uno de los mayores obstáculos en el tratamiento clínico. Las mitocondrias participan promoviendo la proliferación y metástasis, características que las hacen un atractivo blanco terapéutico.

Previamente demostramos que el ácido gentísico unido al catión trifenilfosfonio (GA-TPP⁺C₁₀) produce disfunción mitocondrial, por inhibición de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y actividad del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDH), desencadenando la muerte de células tumorales. A pesar de lo anterior, el efecto de GA-TPP⁺C₁₀ sobre el metabolismo en células cancerosas con el factor de transcripción inducible por hipoxia 1- α (HIF1- α) estabilizado permanecen sin ser estudiado.

En este trabajo describimos que el compuesto GA-TPP⁺C₁₀ desencadena esa inhibición mitocondrial en un modelo *in vitro* de adenocarcinoma de pulmón en condiciones miméticas a hipoxia, producida por estabilización de los niveles proteicos de HIF1- α con CoCl₂. Esta inhibición está caracterizada por la disminución del potencial de membrana mitocondrial, de los niveles de ATP y de la respiración determinada por Seahorse XFe96.

Este compuesto induce cambios adaptativos del metabolismo celular, produciendo un remodelamiento metabólico desde la OXPHOS hacia la glicólisis dependiente de AMPK. Además, GA-TPP⁺C₁₀ promueve un aumento significativo de proteínas de las membranas mitocondriales, acompañado de una reducción de los niveles proteicos de la subunidad E1-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH) del α KGDHc dependiente de AMPK, y de su actividad enzimática en normoxia y mimético a hipoxia. GA-TPP⁺C₁₀ disminuye los niveles del antígeno nuclear celular en proliferación (PCNA) dependiente de AMPK, lo que produce la detención del ciclo celular en fase G1. Además, disminuye de la formación de colonias,

migración celular y revierte la resistencia a doxorrubicina producida por la estabilización de HIF1- α .

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la inhibición mitocondrial inducida por GA-TPP+C₁₀ tiene efectos antitumorales en condiciones de normoxia como en una condición mimético a hipoxia, lo cual puede tener relevancia terapéutica en el cáncer de pulmón.

1. Introducción

1.1. Aspectos generales y epidemiológicos del cáncer de pulmón

El cáncer consiste en un gran y complejo grupo de patologías que constituyen una de las principales causas de muerte a nivel mundial [1]. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer estimó que hasta el año 2020, 19.3 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer y casi 10 millones de personas murieron a causa de este. A su vez, se prevé que para el año 2030 la incidencia del cáncer continúe aumentando hasta alcanzar las 24.6 millones de personas [1]. A nivel nacional, el cáncer se encuentra en el primer lugar dentro de las causas de muerte, con un 26% de las defunciones en Chile, desplazando de dicho lugar a las enfermedades cardiovasculares (25.6%) [2].

Las patologías cancerosas se caracterizan por la proliferación descontrolada de células mutadas que ya no responden a las señales paracrinas/autocrinas de su tejido de origen, que regulan la diferenciación, proliferación y muerte celular; lo que conlleva a la formación de tumores [3]. Con la progresión del crecimiento tumoral, éste irrumpe en la función de los tejidos en los cuales se desarrolla, impactando en las funciones fisiológicas de los mismos y generando una serie de sintomatologías que son claves para su detección [3]. Además, con la progresión tumoral, las células cancerosas pueden activar procesos de migración y crecimiento independiente de anclaje, que propician la formación de tumores secundarios y metástasis [3].

Una de las grandes dificultades que posee la ciencia para tratar estas enfermedades es que existe una heterogeneidad intra e inter tumoral creada por células cancerosas con diferente expresión génica, las que acumulan numerosas mutaciones que provocan insensibilidad a las señalizaciones de control desde el microambiente circundante del tumor

[3]. Dado lo anterior, se ha vuelto imprescindible la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que posea una gran selectividad por las células tumorales, como también que estén presentes en un amplio especto de estas patologías cancerosas.

Actualmente, el cáncer de pulmón (CP) es la principal causa de muerte por cáncer (18%) y es el segundo tipo de cáncer más común a nivel mundial (con un 11.4% si consideramos ambos sexos), siendo solamente superado por el cáncer de mama (11.7%) [1]. Su diagnóstico se asocia a una pobre sobrevida, en donde más de la mitad de los pacientes diagnosticados con CP mueren dentro del año posterior al diagnóstico y la supervivencia a 5 años es de un 17.8% [4].

En cuanto a los tratamientos actualmente disponibles para el CP, el principal corresponde a la cirugía, en el cual se extirpa completamente el tumor pulmonar y los ganglios linfáticos cercanos al tórax. Posteriormente se administra una terapia coadyuvante, en la cual se busca eliminar cualquier célula cancerosa de pulmón remanente, con el objetivo de reducir el riesgo de recidiva [5] Los tipos de terapia coadyuvante utilizados incluyen la radioterapia y terapias sistémicas, como quimioterapia, terapia dirigida contra blancos moleculares específicos e inmunoterapia [6]. Las actuales terapias contra el cáncer se dirigen generalmente a la proliferación clonal descontrolada de las células cancerosas, lo cual ha demostrado ser una estrategia limitada para los tumores sólidos en los que la capacidad de invadir y producir metástasis cobran un rol fundamental [7].

Es debido a la poca efectividad de estas terapias para erradicar el CP, así también la gran cantidad de efectos secundarios que limitan la calidad de vida de los pacientes es que surge de manera relevante la búsqueda de nuevos tratamientos quimioterápicos selectivos que contribuyan al tratamiento de estas patologías.

1.2. Plasticidad metabólica en el cáncer

El metabolismo alterado de las células cancerosas fue estudiado en detalle, en primer lugar, por Warburg en 1920 [8, 9]. Este señaló que las células tumorales se caracterizan por poseer un metabolismo glicolítico exacerbado en condiciones aeróbicas [10], que le permiten sustentar su característico potencial replicativo ilimitado [3]. Para dar explicación a este fenómeno, Warburg indicó que las células cancerosas poseen daño a nivel mitocondrial [8], uno de los sellos distintivos de la oncogénesis. A su vez, la alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) mitocondrial también validó esta hipótesis [11].

Contrario a estas observaciones, en la actualidad se conoce que las mitocondrias tumorales no son completamente disfuncionales. En efecto, ellas son cruciales para la producción de niveles similares o superiores de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), empleados como fuentes de carbono y nitrógeno para la síntesis de macromoléculas, con las cuales satisfacen las elevadas demandas metabólicas de las células cancerosas durante la proliferación y metástasis [12]. Además, se ha descrito que cuando aumenta la glicólisis aeróbica en las células cancerosas, la fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *oxidative phosphorylation*) continúa activa y funcional [13, 14]. Junto con lo anterior, sus mitocondrias pueden utilizar otras vías metabólicas para la obtención de intermediarios metabólicos que mantengan activa la cadena transportadora de electrones (CTE) y la producción de ATP, tales como la oxidación de ácidos grasos (FAO) y la glutaminólisis [15, 16].

Bajo estrés metabólico, la demanda energética es mantenida a través de cambios dinámicos en el metabolismo celular [17]. Este proceso, conocido como plasticidad metabólica, permite a las células cancerosas remodelar las vías productoras de energía,

como por ejemplo: cambios metabólicos entre glicólisis versus la OXPHOS; cambiar de sustratos mitocondriales oxidables (piruvato, glutamina versus ácidos grasos) y la síntesis de intermediarios metabólicos del ciclo TCA (como la inducción de la vía reductiva versus la descarboxilación oxidativa), el cual depende de cambios en la disponibilidad de sustratos, tales como el oxígeno (O_2), glucosa y aminoácidos [18, 19].

Dada la alta plasticidad metabólica, ante entornos hostiles la función mitocondrial puede incrementarse, estableciendo una respuesta adaptativa para así promover el crecimiento y supervivencia tumoral [20, 21]. En estas circunstancias de estrés metabólico, la quinasa sensora de energía llamada proteína quinasa activada por AMP, AMPK, promueve la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH), la cual cataliza piruvato a acetil-CoA, manteniendo el influjo de sustratos para el funcionamiento del ciclo TCA [22-25]. Esto se correlaciona con un alto consumo de glutamina para la síntesis de ATP mitocondrial [26, 27].

La mitocondria es esencial para la motilidad y metástasis en células cancerosas de mama, en las cuales se ha observado la activación del coactivador del receptor gamma 1- α activado por el proliferador de peroxisomas (PPARGC1A, también conocido como PGC-1 α) para aumentar la biogénesis mitocondrial y la OXPHOS [28]. En relación a este punto, también se ha señalado que el correcto ensamblaje de los componentes de la OXPHOS son necesarios para la formación de tumores y metástasis [29, 30]. Por otra parte, Viale et al. 2014 demostraron que en modelos de cáncer pancreático murinos que dependen de la oxidación mitocondrial del piruvato derivado de la glicolisis, son resistentes a la apoptosis mediada por la ablación del oncogén KRAS [31]. Consecuentemente, la inhibición de la función mitocondrial reduce la capacidad invasiva de estas células cancerosas [26, 32, 33].

Además de su rol energético, la OXPHOS permite la generación de precursores metabólicos esenciales para la proliferación celular, a través del ciclo TCA. Por ejemplo, permite la síntesis *de novo* de aminoácidos como el aspartato, fuente de carbono para la síntesis de purinas y pirimidinas [34-36].

En condiciones hipóxicas, las células cancerosas mantienen la proliferación celular a través del metabolismo de la glutamina a través de la vía reductiva del ciclo TCA [37]. La utilización mitocondrial de la glutamina comienza con la conversión de esta en α -cetoglutarato (α KG) por la glutaminasa y la glutamato deshidrogenasa. Posteriormente, el α KG puede ser oxidado por el complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDHc) a succinil-CoA y luego a succinato, a través de la reacción oxidativa del ciclo TCA o carboxilada reductivamente por la isocitrato deshidrogenasa a isocitrato y luego citrato. Este ciclo reductivo ha mostrado ser favorable en células con HIF1- α estabilizado [38, 39] o en células que poseen comprometida su capacidad en el transporte de electrones [40]. A su vez, el citrato derivado de la glutamina puede ser transportado por el citoplasma para generar acetil-CoA mediante procesos anabólicos como la síntesis de ácidos grasos [38, 41]. Actualmente, se ha observado que el α KG cumple un rol clave en los cambios metabólicos que promueven metástasis, la proliferación celular y la supervivencia bajo hipoxia y disfunción de la OXPHOS [42-44].

Dada la plasticidad metabólica de las células cancerosas, el metabolismo mitocondrial dependiente de la actividad de OGDH podría representar una potencial blanco para nuevas estrategias antitumorales.

1.3. Hipoxia y microambiente tumoral

En el microambiente tumoral, existen fluctuaciones locales de la disponibilidad de sustratos oxidables (piruvato, glutamina, glucosa) y O_2 , que determinan los cambios dinámicos del metabolismo de las células tumorales. El crecimiento y rápida proliferación de las células cancerosas está asociado a un desarrollo desordenado y aberrante de la vasculatura, generando áreas tumorales con diferentes concentraciones de O_2 [45]. De éstas se pueden distinguir tres regiones tisulares (1) la región normóxica, de tejido viable y proliferativo localizado cerca de los vasos sanguíneos funcionales, (2) la región necrótica, la cual surge a distancias de 150 μm de los vasos sanguíneos, donde las células se vuelven anóxicas y mueren y (3) la región hipóxica, que son áreas del tejido tumoral en donde los niveles de O_2 cercanos al 1% [46]. A su vez, en los tumores humanos se distinguen dos tipos de hipoxia [47, 48]. La hipoxia isquémica, la cual es generalmente transitoria y está dada por un suministro deficiente de O_2 como consecuencia de un flujo sanguíneo inadecuado. La hipoxia crónica, por el contrario, está limitada por la difusión, como resultado de un desequilibrio en el suministro y la demanda de O_2 debido a un aumento en la distancia de difusión, que surge a una distancia aproximada de 100 μm desde un vaso sanguíneo funcional [49]. Ambas condiciones se correlacionan a un mal pronóstico de la patología, así como con un mal resultado de las terapias contra el cáncer [50, 51].

En las células normales, la hipoxia generalmente conduce a la muerte celular. Sin embargo, la hipoxia puede inducir un estrés significativo que desencadena cambios en la expresión de genes que permiten que las células tumorales se adapten a este microambiente tumoral, permaneciendo viables [20]. En consecuencia, la hipoxia ejerce una presión selectiva sobre subpoblaciones de células de una forma dependiente de la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF1- α [48]. Este factor de transcripción es ubicuamente expresado. Sin embargo, posee una estricta regulación de su

actividad mediante modificaciones postraduccionales. En específico, la estabilización de HIF1- α es regulada por la hidroxilación del dominio de degradación dependiente de O₂ en los residuos de prolina 402 y 564 por proteínas de dominio prolil-hidroxilasas (PHDs). Estas modificaciones favorecen la interacción con la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL) y su subsecuente degradación proteosomal [52, 53]. La subunidad inhibidora de HIF1, HIF1AN o FIH1, también puede reprimir la actividad transcripcional de HIF1- α en normoxia mediante la hidroxilación del residuo Asp803 de la proteína [54]. Para las modificaciones postraduccionales de HIF1- α , estas enzimas requieren O₂ para sus reacciones catalíticas. Por lo tanto, la hipoxia inhibe estas modificaciones postraduccionales de HIF1- α , estabilizando la proteína y también manteniendo su actividad transcripcional.

La estabilización de HIF1- α aumenta la expresión de genes involucrados en la angiogénesis, la transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *epithelial mesenchymal transition*), invasión, metástasis, reprogramación metabólica y resistencia a las terapias contra el cáncer [20, 55, 56]. Las células tumorales hipóxicas utilizan vías metabólicas menos dependientes del O₂ para satisfacer su demanda energética y así sustentar la progresión tumoral [57]. Estas células usan fuentes alternativas de energía, como la glutamina, para generar citrato en un ciclo TCA truncado mediante la carboxilación reductiva y mantener de esta manera la proliferación [58]. Además, producen gran cantidad de lactato debido al aumento de la glicólisis, generando un microambiente tumoral ácido [59-61] que contribuye a la resistencia a quimioterápicos [62, 63].

Debido a lo anterior, comprender el metabolismo dependiente de HIF1- α en poblaciones de células cancerosas bajo hipoxia parece ser una aproximación prometedora para nuevos tratamientos del cáncer.

1.4. Rol del α KGDHc en la progresión del cáncer

El ciclo TCA está compuesto de una serie de reacciones bioquímicas que ocurren en la matriz mitocondrial, que permiten a los organismos aeróbicos oxidar las fuentes de combustible y proporcionar energía y macromoléculas y establecer el equilibrio redox [64]. A pesar del dogma de que las células cancerosas eluden el ciclo TCA y utilizan principalmente la glicólisis aeróbica, la evidencia actual demuestra que ciertas células cancerosas dependen en gran medida del ciclo TCA [64, 65]. Éste permite que las células se adapten y modifiquen sus flujos metabólicos según la disponibilidad de sustratos energéticos. A su vez, los metabolitos producidos mediante el ciclo TCA afectan drásticamente la expresión epigenética de las células tumorales [66]. En este sentido, la evidencia emergente sobre el rol del ciclo TCA durante la tumorigénesis, valida las enzimas que lo componen como potenciales blancos farmacológicos, que aún permanecen pobremente explorados [67].

El α KGDHc forma parte del ciclo TCA. Está compuesto de tres subunidades que oxidan, descarboxilan el α -cetoglutarato y unen coenzima A (CoA) al α -cetoglutarato para formar succinil-CoA y NADH, designadas como E1 (oxoglutarato deshidrogenasa, gen *OGDH*), E2 (dihidrolipoamida S-succiniltransferasa, gen *DLST*) y E3 (dihidrolipoamida deshidrogenasa, gen *DLD*), respectivamente [68, 69]. Su actividad enzimática depende de la disponibilidad de ATP, fosfato inorgánico (Pi) y NAD⁺ producidos por la glicólisis y el complejo I de la cadena transportadora de electrones (CTE), que controlan el estado redox mitocondrial, el flujo de metabolitos y diversas vías de señalización [68]. Con respecto a la OGDH, en humanos hay tres variantes de su gen mediante *splicing alternativo*, V1 (114 kDa), V2 (48 kDa) y V3 (114 kDa), aunque las diferencias funcionales de estas enzimas permanecen sin ser reportadas [58].

Por otra parte, nuevos estudios han descrito el rol del α KGDHc para mantener la función dual del ciclo TCA para el crecimiento celular, generando equivalentes reductores para OXPHOS por la CTE y al mismo tiempo produce precursores metabólicos como el aspartato [70, 71], los cuales apoyan la proliferación celular [68]. Esto también se ha evaluado en modelos *in vitro* de células con una respiración mitocondrial defectuosa, en donde se requiere una mínima actividad de α KGDHc para la sobrevivencia celular [70, 71]. Lo mismo ocurre en condiciones hipóxicas, en las cuales prima la vía reductiva del ciclo TCA, donde el complejo enzimático central es la OGDH, que brinda el NADH necesario para establecer el flujo de esta vía, a través de la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT)(ver **Ilustración 1**) [34]. Por lo tanto, la identificación de compuestos dirigidos a este complejo enzimático ha surgido como un promisorio blanco terapéutico.

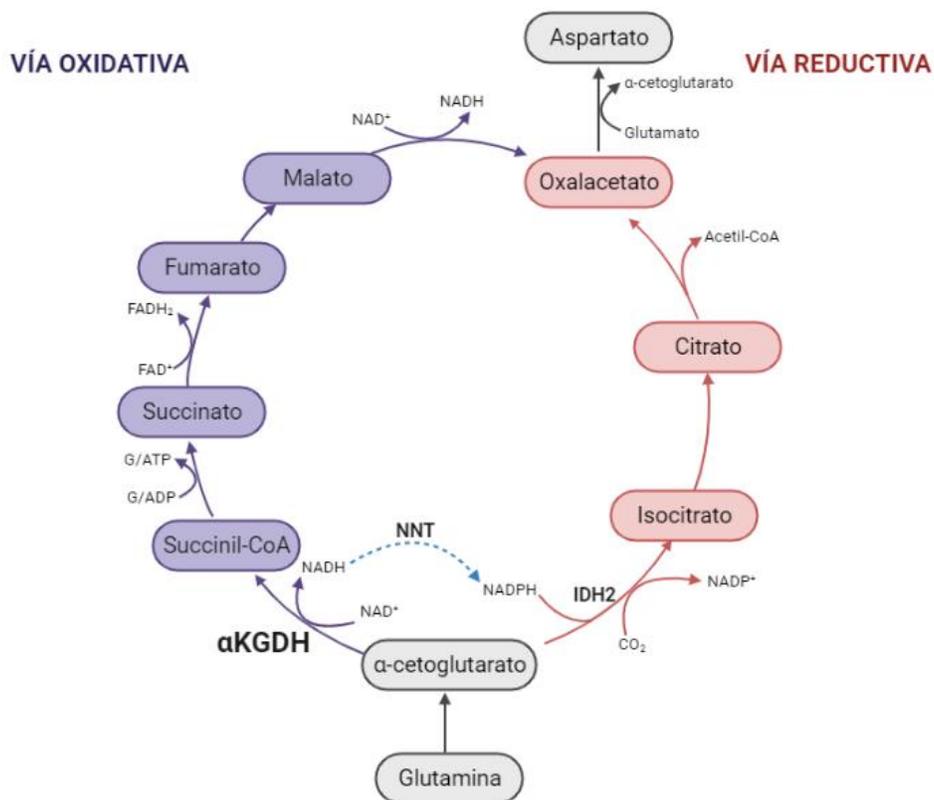


Ilustración 1. Rol de α KGDHc en la vía oxidativa y reductiva del ciclo TCA. Adaptado de Mullen et al. Nature, 2011. 481(7381): p. 385-8.

1.5. Inhibidores del α KGDHc con promisorios efectos antitumorales

α KGDHc es uno de los complejos enzimáticos mitocondriales más sensibles a los cambios del microambiente tumoral y participa en la respuesta metabólica adaptativa del cáncer [72]. En la actualidad, se ha estudiado el papel de α KGDHc en las células cancerosas utilizando inhibidores de su actividad, tal como succinil fosfonato, un análogo de fosfonato de 2-oxoglutarato que inhibe el α KGDHc y en consecuencia, aumenta la muerte de células cancerosas [73]. A su vez, el inhibidor ácido succínico(S)-2-[amino(2,6-diclorobenzoilo)], conocido como AA6, ha sido empleado en modelo de ratón ortotópico de cáncer de mama, la cual reduce notablemente la formación de metástasis y contrarresta de manera eficiente la invasión tumoral, inhibiendo la EMT [65].

Por otro lado, se ha estudiado el compuesto CPI-613, el cual es un análogo del ácido lipoico que inhibe dual o simultáneamente la actividad de las enzimas PDH y OGDH, dos cetoácidos deshidrogenasas del ciclo TCA que tienen el ácido lipoico como cofactor [74, 75]. Si bien este compuesto inhibe el flujo de carbono a través el ciclo TCA de manera selectiva en células tumorales, se ha descrito que tiene una baja potencia, siendo utilizado en concentraciones cercanas a las 250-500 μ M [76]. A su vez, al ser un inhibidor dual, no inhibe de forma específica a la OGDH. Sin embargo, CPI-613 se ha vuelto un prometedor compuesto antitumoral, formando parte de una serie de ensayos clínicos terminados y en curso bajo el nombre de Devimistat. Este fármaco ha sido administrado tanto como agente único como en combinación con tratamientos quimioterápicos estándar para neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos, y ha ofrecido resultados clínicos prometedores (NCT00741403, NCT01832857) [77].

A partir de la necesidad de desarrollar nuevos quimioterápicos selectivos hacia células tumorales, es que se comenzaron a estudiar moléculas con la capacidad de

acumularse en las mitocondrias de células de carcinoma de manera selectiva [78]. Esto se fundamenta en que estas mitocondrias poseen un alto potencial de transmembrana ($\Delta\Psi_m$), de -180 mV, estando cargado negativamente en la cara interna, y siendo más grande que la de cualquier otro organelo o célula no tumoral de cualquier tejido, que poseen un $\Delta\Psi_m$ de -30 a -60 mV [79]. Esto permite que compuestos catiónicos con gran lipofilia, puedan atravesar las membranas independiente de transportadores y acumularse dentro de la mitocondria en función a una mayor diferencia de $\Delta\Psi_m$, determinado por la Ley de Nernst [80]. Esta ley predice que estos compuestos se acumularán unas 10 veces más por cada 60 mV de aumento en la diferencia de voltaje del $\Delta\Psi_m$ [81]. Es decir, a diferencia de los tejidos no tumorales, las células de carcinoma acumularían estos compuestos de manera selectiva en la matriz mitocondrial, de 100 a 1000 veces más.

Debido a esto, diversos compuestos de origen natural o sintéticos incorporan cationes lipofílicos como por ejemplo el catión trifenilfosfonio (TPP^+) para llevar selectivamente compuestos antitumorales a la mitocondria [82-84]. A partir de estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, se han mostrado que ácidos hidroxibenzóicos naturales unidos a TPP^+ inducen apoptosis *in vitro* como *in vivo* [85-87]. Dentro de este grupo de moléculas, se encuentra el ácido gentísico o ácido 2,5-dihidrobenczoico, unido a TPP^+ ($\text{GA-TPP}^+\text{C}_{10}$) [86, 88]. Este compuesto es un polifenol que se encuentra comúnmente en una serie de productos de origen vegetal [89], es un derivado del ácido acetilsalicílico [90] y actualmente se han comprobado sus diversos efectos farmacológicos, tales como los antiinflamatorios, neuro y hepatoprotectores, antimutagénica y antimicrobial [91-93].

$\text{GA-TPP}^+\text{C}_{10}$ es compuesto mitocondriotrópico capaz de producir una inhibición compleja de la bioenergética mitocondrial dependiente del tiempo en modelos celulares de cáncer de mama, la cual está caracterizada por 1) una fase inicial de captación mitocondrial

con un efecto desacoplante de la OXPHOS, 2) inhibición del complejo I mitocondrial y 3) una fase tardía de acumulación mitocondrial con inhibición mixta de la actividad del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDHc). Estos eventos producen la detención del ciclo celular en fase G1 y muerte celular selectiva de células de cáncer de mama a 24 y 48 horas, respectivamente [88, 93].

A pesar del rol de α KGDHc en la adaptación metabólica para mantener la supervivencia celular [70] y metástasis [65] en osteocarcinomas y cáncer de mama, en la actualidad se desconoce su participación en la supervivencia y proliferación de células de CP, durante la estabilización de HIF1- α . Por lo tanto, tomando ventaja de nuestras observaciones previas que identifican a GA-TPP⁺C₁₀ como un inhibidor de α KGDHc [88], este proyecto tiene como centro el fenotipo metabólico de células cancerosas de pulmón, explorando la modulación farmacológica de α KGDHc en la adaptación metabólica, con HIF1- α estabilizado.

2. Hipótesis

GA-TPP+C₁₀ produce disfunción mitocondrial, disminuyendo formación de colonias, migración celular y resistencia a quimioterápicos, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia a través del eje OGDH/AMPK en líneas celulares de cáncer de pulmón.

3. Objetivo General

Caracterizar la disfunción mitocondrial inducida por GA-TPP+C₁₀ y su efecto sobre la formación de colonias, migración celular y resistencia a quimioterápicos, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia, de manera dependiente al eje OGDH/AMPK en líneas celulares de cáncer de pulmón.

4. Objetivos Específicos

1. Caracterizar el efecto de GA-TPP+C₁₀ sobre la bioenergética mitocondrial en células cancerosas de pulmón, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.
2. Establecer los cambios adaptativos del metabolismo celular dependiente al eje OGDH/AMPK producidos en respuesta al tratamiento con GA-TPP+C₁₀, en células cancerosas de pulmón en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.
3. Evaluar los efectos de la inhibición mitocondrial producido por GA-TPP+C₁₀ sobre la formación de colonias, migración celular y resistencia a quimioterápicos, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.

5. Materiales y métodos

5.1. Compuesto en estudio

El compuesto conjugado a TPP⁺ utilizado en el presente estudio (ver **Ilustración 2**) fue sintetizado en el Laboratorio de Productos Bioactivos, Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca (Dr. Ramiro Araya-Maturana), de acuerdo a lo publicado en Sandoval-Acuña, 2016 [86]. Se utilizó Dorsomorfina (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) a 1 μ M de acuerdo a lo publicado en Kim & Choi, 2010 [94]. Las soluciones fueron preparadas en dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemania).

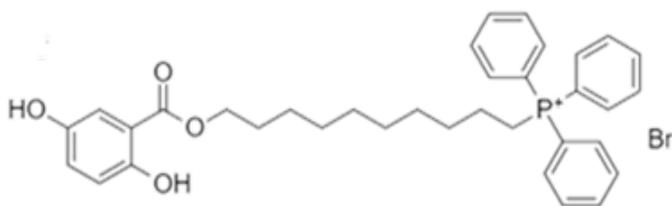


Ilustración 2. Estructura química de GA-TPP⁺C₁₀. Bromuro de ((10-((2,5-dihidroxibenzoil) oxi) decil) trifenilfosfonio.

5.2. Cultivos celulares

Las líneas celulares de pulmón humano A549 (ATCC® CCL-185™) y NCI-H1975 (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 μ g/mL (Thermo Scientific), 6 g/L de HEPES (Calbiochem), y 2 g/L de Bicarbonato de sodio (MERCK), en ausencia de piruvato. Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada.

5.3. Análisis de la viabilidad celular

Se determinó el porcentaje de viabilidad celular a partir del 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 1×10^5 células por pocillo en placas de 12 pocillos, las cuales fueron incubadas por 24 horas. Posteriormente estas fueron estimuladas con GA-TPP⁺C₁₀, incubándose el tiempo señalado en cada tratamiento. Posteriormente el medio fue colectado, las células tripsinizadas, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Estas fueron posteriormente resuspendidas en 100 μ L de buffer 1X de annexin V binding buffer, el cual contiene AV 10 μ L/100 μ L y PI 1 μ L/1000 μ L. Incubándose las células por 15 minutos 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 expresaron como células vivas (porcentaje de células anexina-V-/PI-).

5.4. Análisis del ciclo celular

Se determinó el porcentaje de células en cada fase del del ciclo celular. El contenido de ADN celular fue analizado mediante citometría de flujo. Las líneas celulares A549 y NCI-H1975 fueron sembradas en placas de 12 pocillos, (1×10^5 célula/pocillo), posteriormente fueron estimuladas con GA-TPP⁺C₁₀ 20 μ M por 48 horas en condiciones de cultivo, en condiciones normóxicas y miméticas a hipoxia (preestímulo de 24 horas de CoCl₂ 400 μ M). Al finalizar el tratamiento, las células fueron centrifugadas a 1000 \times g durante 5 minutos y lavadas en 1 mL de PBS frío. Luego los pellets celulares fueron resuspendidos en 1 mL de medio de tinción de yoduro de propidio (PI) (citrato de sodio 4 mM, Triton X-100 0,1%, PI 50 μ g/mL y ARNasa 200 μ g/mL) e incubados durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. El análisis fue realizado mediante citometría de flujo (LSRFortessa BD Biosciences). Las longitudes de onda empleadas fueron 488_{Ex}/575_{Em} nm para PI. Los datos se expresaron como el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. El procesamiento de datos se realizó a través del software Weasel (versión 3.0.2) y FlowJo (versión 10.0.7).

5.5. Respiración celular y tasa de acidificación celular en tiempo real

Las líneas celulares A549 y NCI-H1975 (18.000 células/pocillo) fueron sembradas en placas XFe96 V3-PS y mantenidas por 24 horas a 37°C y 5% CO₂, incubadas en medio con glucosa y glutamina, sin piruvato. Para emular la condición hipóxica se preestimularon las células con CoCl₂ 400 µM por 24 h. Posteriormente, una hora antes del ensayo, el medio es reemplazado por medio de ensayo (DMEM no tamponado sin rojo fenol, con glutamina 4mM y glucosa 10 mM, pH=7,4). La función mitocondrial fue evaluada usando GA-TPP⁺C₁₀ a 10 y 20 µM, oligomicina 1 µM, FCCP 50 nM y rotenona 1 µM/antimicina A 1 µM. Para el análisis de la capacidad glicolítica, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de ensayo (DMEM no tamponado sin rojo fenol, con glutamina 4mM, sin glucosa, pH = 7,4). La glicólisis fue evaluada adicionando GA-TPP⁺C₁₀ 20 µM con o sin un preestímulo con dorsomorfina a 1 µM, glucosa 10mM, oligomicina 1 µM, y 2-deoxyglucosa (2-DG). Las mediciones de la tasa de consumo de oxígeno (OCR, del inglés *oxygen consumption rate*) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR, del inglés *extracellular acidification rate*) fueron registradas mediante el análisis de la excitación y emisión de las longitudes de onda 532/650 nm para el O₂ y 470/530 nm para protones. Cada experimento se realizó por triplicado.

5.6. Determinación de los niveles de ATP intracelular

Se sembraron 1x10⁴ células/pocillo de las líneas celulares A549 y NCI-H1975 en placas de 96 pocillos. Estas fueron incubadas en medio de cultivo estándar por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Ambas líneas celulares fueron preestimuladas con 400 µM de CoCl₂ durante 24 horas. Posteriormente, fueron tratadas por 4 horas con 20 µM de GA-TPP⁺C₁₀.

La medición se realizó siguiendo las especificaciones indicadas por el fabricante del kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, EE. UU.), con

las siguientes modificaciones. Se retiró 50 μL de medio y la medición se realizó con 50 μL del kit. El contenido total fue transferido a una placa opaca y medido en un espectrofluorímetro lector de placas Varioskan® (Thermo Scientific).

Con el fin de determinar cómo la caída de ATP está mediada por la enzima sensora de ATP, AMPK, se realizó la medición repitiendo las mismas condiciones anteriormente señaladas i) en un medio sin glucosa y con 10 mM de galactosa y 2) previo al tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀ se estimuló con 1 μM de dorsomorfina, un inhibidor de AMPK, durante 1 hora.

5.7. Determinación de potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ROS mitocondrial

Se utilizó el indicador fluorescente tetrametil rodamina metil éster (TMRM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) en modo *non-quenching*. Para esto se sembraron 1×10^5 células A549 y NCI-H1975 por pocillo, en placas de 12 pocillos. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS estéril para eliminar trazas de compuesto y estimuladas con TMRM 5 nM por 30 minutos. Luego, el exceso de fluoróforo fue lavado y las células fueron resuspendidas en 200 μL de PBS para ser analizados mediante citometría de flujo FACS (FACSAria®III, BD Biosciences) $540_{\text{Ex}}/595_{\text{Em}}$ nm.

Los niveles de ROS (superóxido) intracelular fueron determinados usando el indicador fluorescente dihidroetidio (DHE, Sigma Aldrich). Fueron sembradas 5×10^4 células A549 y NCI-H1975 por pocillo, en placas de 12 pocillos. Al día siguiente, las células fueron estimuladas con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μM durante 24 horas. La condición mimética hipóxica se estimuló 24 horas previas con CoCl₂ 400 μM . Se usó como control, el vehículo DMSO, y como control positivo antimicina 1 μM , la cual fue agregada al mismo tiempo que el indicador fluorescente. DHE fue preparada en PBS a 5 μM . Se incubó las muestras por 30 minutos a

37°C. El indicador fluorescente fue medido mediante citometría de flujo FACS (FACSAria®III, BD Biosciences) 510_{Ex}/580_{Em} nm.

5.8. 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 A549 y NCI-H1975 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. 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 (IPP) (CellSignalling, Danvers, MA, EE.UU.). A excepción de las muestras en las cuales se debía detectar HIF1- α , las cuales fueron preparadas con un buffer de lisis SDS 0.1% más el IPP. Posteriormente, el lisado fue centrifugado a 3000 g a 4°C durante 15 minutos, el sobrenadante recolectado y se cuantificó su concentración de proteínas de acuerdo al kit Pierce™ BCA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Luego, una muestra de 50 μ g de proteínas fue separada a través de un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida al 8 o 12,5% (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. Luego de ser lavadas con TBST, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP) por 2 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 (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

Listado de anticuerpos usados para Western blot:

HIF1- α (D2U3T) CellSignalling, #14179, 1:1000; OGDH (E1W8H) CellSignalling, #26865, 1:1000 ;Phospho-AMPK α (Thr172) (D79.5E), CellSignalling, #4188, 1:1000; AMPK α CellSignalling, #2532, 1:1000; PCNA (D3H8P) CellSignalling, #13110 1:1000, β -Actin (D6A8) CellSignalling, #8457, 1:1000; Total OXPHOS, Abcam, AB110413, 1:500; VDAC1, Santa Cruz Biotechnology, (B-6), SC-390996 1:500; goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, SC-2004, 1:5000; goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, SC-2005.

5.9. Determinación de actividad enzimática de α KGDHc

Para medir la actividad enzimática se usó el kit α KGDH Activity Assay Colorimetric Kit (K678, BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.). Para ello, se sembraron 1×10^5 células A549 y NCI-H1975 en placas de 6 pocillos, al día siguiente se estimularon con CoCl_2 a $400 \mu\text{M}$. Luego se estimuló con $\text{GA-TPP}^+\text{C}_{10}$ a $20 \mu\text{M}$ por 24 horas. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, el pellet fue resuspendido en $100 \mu\text{L}$ de α KGDH assay buffer y se dejó por 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 g por 5 minutos. Del sobrenadante se extrajeron $48 \mu\text{L}$ los cuales se pasaron a placas de 96 pocillos en el que se adicionó el mix de reacción (α KGDH Assay Buffer, developer y substrate). Luego se midió la absorbancia durante 1 hora a 450 nm en el equipo Varioskan Flash® microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

5.10. Migración celular

La migración celular se evaluó utilizando una cámara Boyden (Transwell Costar, $6,5 \text{ mm}$ de diámetro, tamaño de poro de $8 \mu\text{m}$) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Brevemente, los lados inferiores de los insertos fueron revestidos con fibronectina (2 µg/mL, durante la noche a 4°C) y fueron resuspendidas 10.000 células A549 y NCI-H1975 en medio sin suero en la parte superior del inserto de la cámara, las cuales fueron incubadas a 37°C durante 2 horas. Previamente, las células fueron tratadas durante 24 horas con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 µM y en conjunto al tratamiento con CoCl₂ a 400 µM. Además, se realizaron diversos preestímulos con el inhibidor de AMPK dorsomorfina (1 µM), dimetil-α-cetoglutarato (dm-αKG) 5 mM o metil-succinato (5 mM). A las 2 horas, los insertos fueron removidos, lavados y el lado inferior se tiñó con solución de tinción acuosa de cristal violeta 0,25%, metanol 20%, por 30 minutos. Posteriormente, 4 campos por inserto fueron fotografiados al azar, y las células fueron contabilizadas utilizando el software imageJ 1.47v (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

5.11. Ensayo de formación de colonias

500 células de la línea A549 y NCI-H1975 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una concentración de 500 células/pocillo, e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Luego, fueron preestimuladas con 400 µM de CoCl₂ durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con 20 µM de GA-TPP⁺C₁₀ por 6 horas. Concluido esto, se lavó con PBS, se renovó el medio de incubación por uno libre de compuestos, a excepción de las condiciones con CoCl₂, y ambas líneas celulares fueron incubadas por 7 días. Las colonias fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol por 30 minutos. El número de colonias fue calculado usando el software ImageJ 1.47v (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

5.12. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio ± SD 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.

6. Resultados

Previamente demostramos que los decilhidroxibenzoatos reducen la proliferación celular en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, oral y colorrectal, presentando en todos los casos un valor de IC_{50} cercano a 10 μM a 48 horas de estímulo [86].

Con el objetivo de caracterizar la disfunción mitocondrial inducida por GA-TPP⁺C₁₀ en condiciones miméticas a hipoxia en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, se realizaron los siguientes experimentos:

6.1. Caracterización de los parámetros mitocondriales de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

A pesar de que las líneas celulares A549 y NCI-H1975 son clasificadas como líneas adenocarcinoma de pulmón, ambas presentan diferentes tipos de mutaciones. La línea celular NCI-H1975 posee mutaciones en los genes *EGFR*, *CDKN2A*, *PIK3CA* y *TP53* [95], mientras que la línea celular A549 tiene mutaciones en los genes *CDKN2A*, *KRAS* y *LKB1* [96], y no presenta mutaciones en los genes *EGFR*, *PIK3CA*, *TP53* [97]. Si bien existen antecedentes sobre parámetros mitocondriales de la línea celular A549 [98], hasta la fecha se desconocen estos parámetros en las células NCI-H1975. A su vez, se desconoce si estas mutaciones generan cambios en su fenotipo metabólico, en comparación a las células A549.

Por esto se caracterizaron diversos parámetros mitocondriales en ambas líneas celulares. Se observó que tanto las células NCI-H1975 como A549 no presentan diferencias

significativas en la razón ECAR/OCR (**Fig. 1A**). Sin embargo, A549 presenta una mayor eficiencia de acoplamiento (**Fig. 1B**) y potencial de membrana mitocondrial (**Fig. 1C**), comparado con NCI-H1975. Por último, se caracterizaron los niveles proteicos de los complejos II, III, V de la cadena respiratoria para ambas líneas (**Fig. 1D**) y no hubo diferencias significativas.

En conclusión, los datos presentados sugieren que ambas líneas tumorales tienen similar contribución de la respiración y glicólisis en su metabolismo. Sin embargo, A549 tiene un mayor potencial de membrana y eficiencia de acoplamiento. A su vez, estas diferencias radicarían en los tipos de mutaciones que ambas líneas celulares poseen.

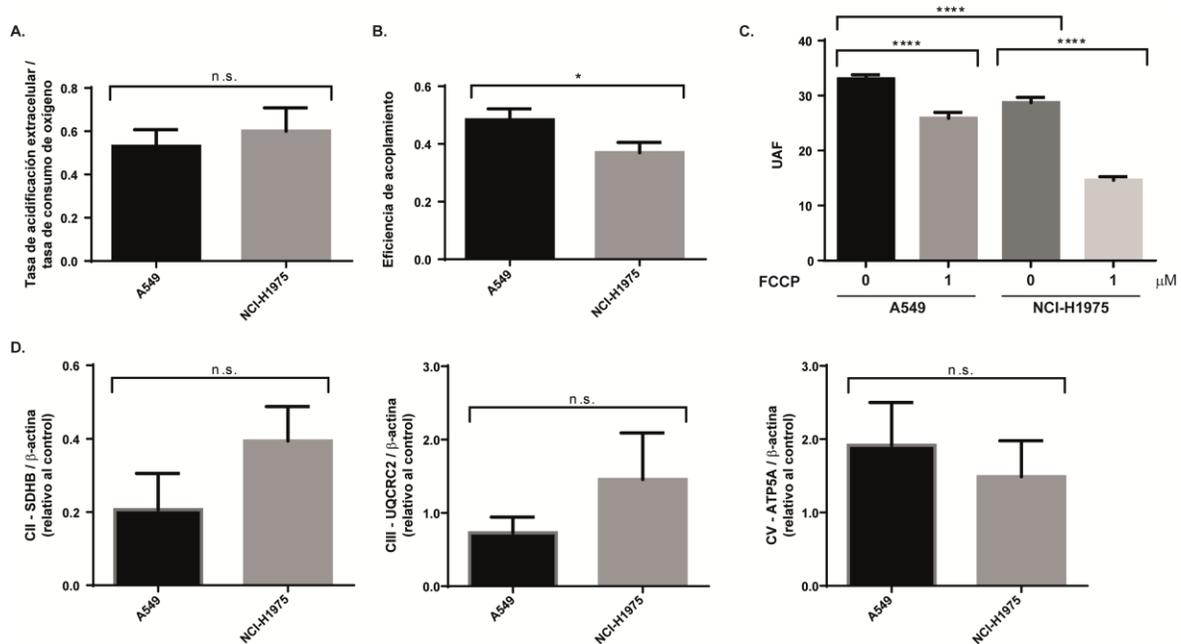


Figura 1. Caracterización de los parámetros mitocondriales de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, A549 y NCI-H1975. A. Razón entre la tasa de acidificación extracelular (ECAR) y la tasa de consumo de oxígeno (OCR). B. Eficiencia de acoplamiento. C. Potencial de membrana mitocondrial en respuesta al desacoplante FCCP, a través del indicador fluorescente TMRM en *non-quenching mode*, expresado en unidades de arbitrarias de fluorescencia (UAF). D. Nivel de la subunidad succinato deshidrogenasa (SDHB) (Complejo II), complejo ubiquinol-citocromo c reductasa (UQCRC2) (Complejo III) y subunidad α de la ATP sintasa F1 (ATP5A) (Complejo V), de la cadena transportadora de electrones, mediante Western blot. Los valores son expresados como promedio \pm SD, N = 3, * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,001$, n.s. no significativo, con respecto al control.

6.2. GA-TPP⁺C₁₀ produce la disminución de la actividad del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDHc) y la degradación vía proteosomal de la subunidad E1 OGDH, en condiciones miméticas a hipoxia.

CoCl₂ impide la degradación del HIF1- α en condiciones normóxicas, a través de la inhibición de las proлил-hidroxilasas (PHD) [99]. Lo anterior promueve la estabilización de HIF1- α y la consiguiente activación de la transcripción de genes blanco de un microambiente tumoral hipóxico [20]. Previamente fue descrito que GA-TPP⁺C₁₀ inhibe la actividad del α KGDHc, afectando el metabolismo mitocondrial en modelos de cáncer de mama [88]. Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual induce esta inhibición y si éste es dependiente o no de la estabilización de HIF1- α .

En el presente estudio se evaluó el efecto de GA-TPP⁺C₁₀ sobre los niveles proteicos de HIF1- α y de la subunidad E1 del α KGDHc, OGDH, en condiciones normóxicas y miméticas a hipoxia. Se observó que los niveles de HIF1- α se estabilizaron con el tratamiento de CoCl₂ a 400 μ M por 24 h. GA-TPP⁺C₁₀ disminuye los niveles de HIF1- α a 10 y 20 μ M por 24 h, en ambas líneas celulares (**Fig. 2A-B**). De igual forma, los niveles de OGDH aumentaron significativamente con el mimético de hipoxia en la línea celular A549. El tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀ también disminuyó de manera significativa el nivel de OGDH tanto en normoxia como con el mimético de hipoxia. Sin embargo, solo es significativo en las células A549 (**Fig. 2A**).

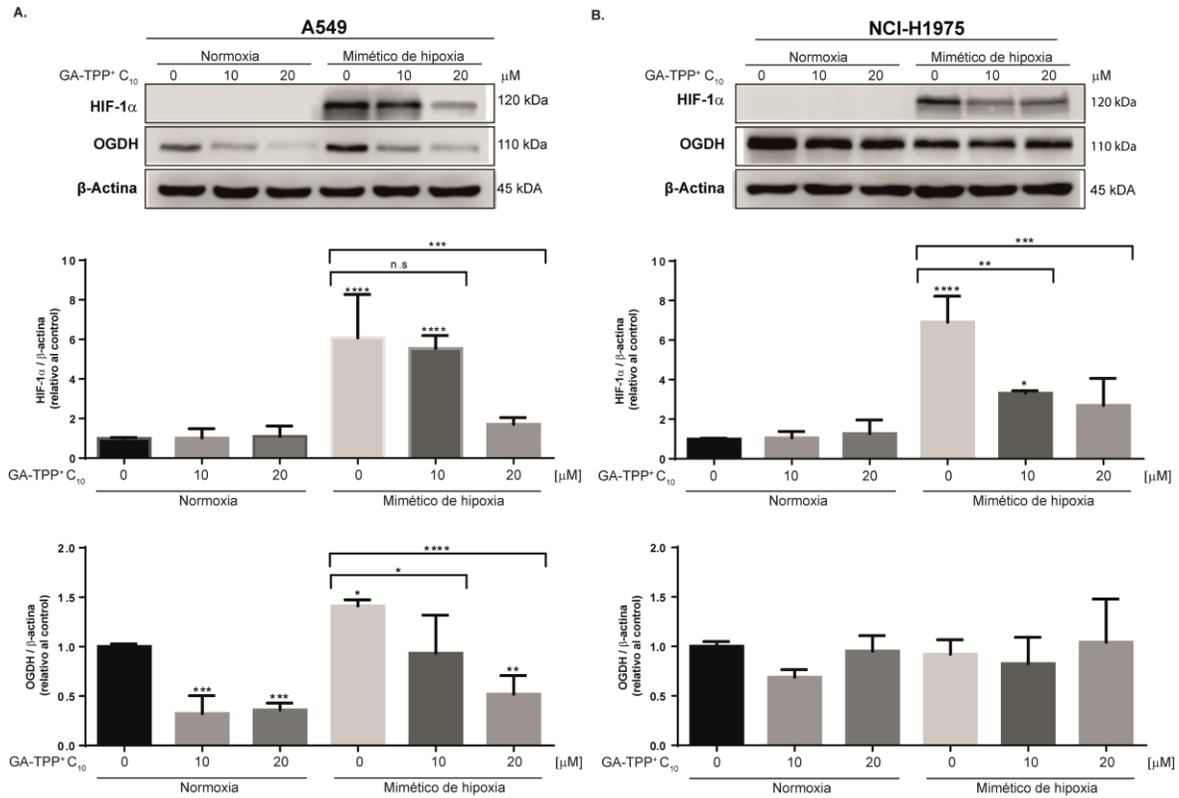


Figura 2. Los niveles proteicos de la subunidad E1 OGDH del α KGDHc aumentan con la estabilización de HIF1- α por CoCl₂ y GA-TPP+C₁₀ disminuye sus niveles tanto en normoxia como en la condición de mimético de hipoxia. Se estimularon tanto A. A549 como B. NCI-H1975, durante 24 horas con GA-TPP+C₁₀ a 20 μ M, en conjunto con CoCl₂ a 400 μ M. Luego se evaluaron los niveles de la subunidad E1 OGDH y HIF1- α mediante Western blot. Se utiliza β -actina como control de carga. Los valores son expresados como promedio \pm SD, N = 4, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,001$, n.s. = no significativo, con respecto al control.

Adicionalmente, debido a la disminución observada en los niveles proteicos de HIF1- α y OGDH inducida por GA-TPP+C₁₀, se determinó si dicha disminución se debía a una degradación mediante la vía proteosomal.

Para ello se utilizó un preestímulo con el inhibidor del proteosoma MG-132, a 10 μ M durante 1 hora. Se observó que GA-TPP+C₁₀ a 20 μ M por 24 h produce la disminución de HIF1- α en condiciones miméticas a hipoxia, la cual se ve revertida con el preestímulo con MG-132. A su vez, la disminución de OGDH producida por GA-TPP+C₁₀, tanto en normoxia como con el mimético a hipoxia, se ve revertida con el inhibidor del proteosoma. Por

consecuentemente, podemos indicar que GA-TPP+C₁₀ induce la degradación vía proteosomal de ambas proteínas (**Fig. 3**).

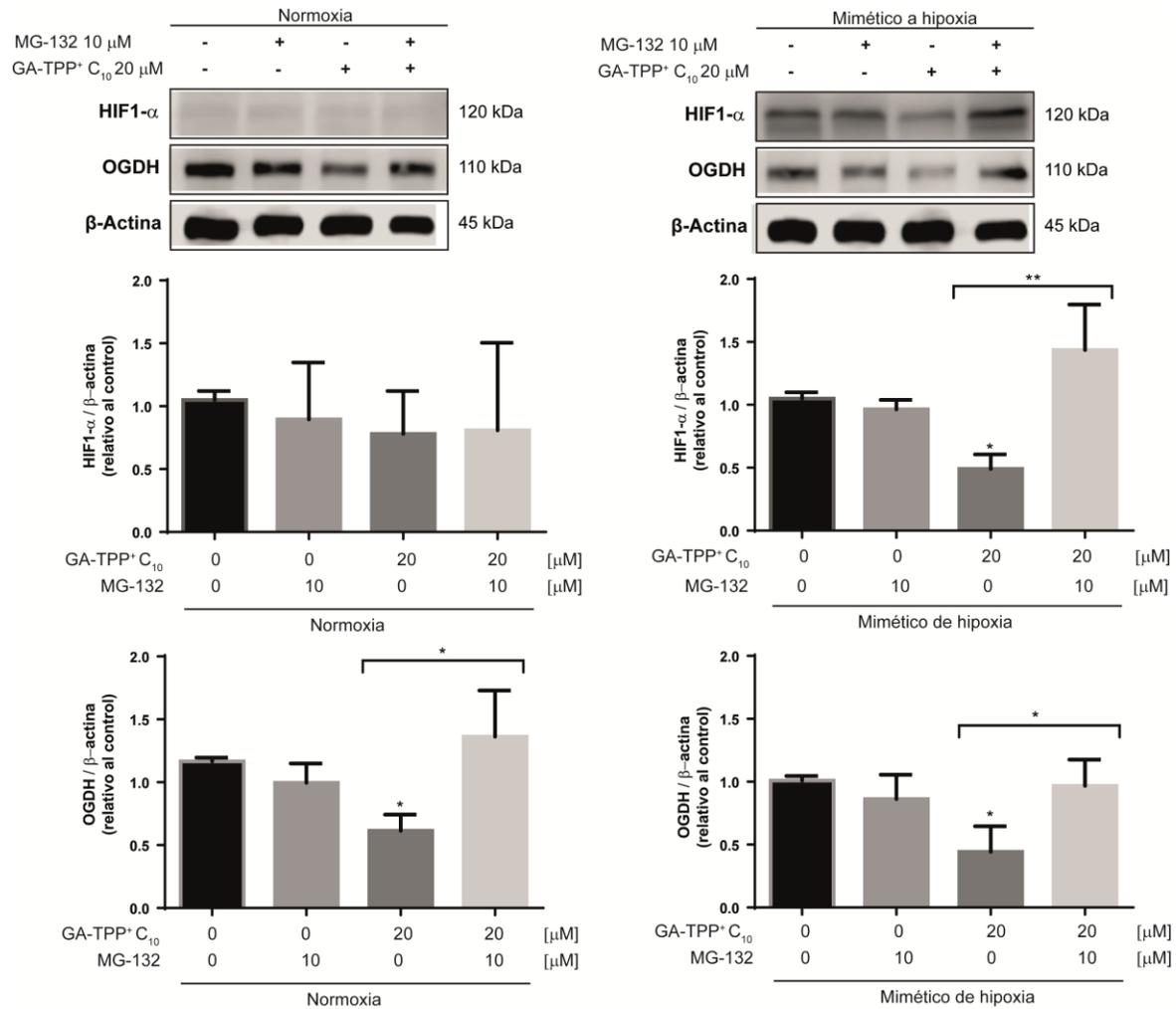


Figura 3. GA-TPP+C₁₀ induce la degradación vía proteosomal de HIF1-α y OGDH, en condiciones normóxicas y miméticas a hipoxia. La línea celular A549 fue incubada por 24 h con GA-TPP+C₁₀ a 20 μM, en conjunto con CoCl₂ a 400 μM. En ciertas condiciones se preestimuló con MG-132, un inhibidor del proteosoma, durante 1 h. Luego se evaluaron los niveles de HIF1-α y la subunidad E1 OGDH, mediante Western blot. Se utiliza β-actina como control de carga. Los valores son expresados como promedio ± SD, N = 4, **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01, con respecto al control.

Se ha demostrado que GA-TPP+C₁₀ logra disminuir los niveles de la subunidad E1 OGDH del αKGDHc en la condición mimética a hipoxia (**Fig. 2**). A su vez, estudios anteriores describieron su efecto inhibitorio sobre el αKGDHc en un modelo de cáncer de mama y pulmón en normoxia [88]. Por esto se estudió el efecto de GA-TPP+C₁₀ en la actividad del αKGDHc en la condición de mimética a hipoxia.

Luego de una exposición de 24 horas de GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μM, se determinó que este compuesto produce una disminución de la actividad del αKGDHc, en la condición mimética a hipoxia (**Fig. 4**).

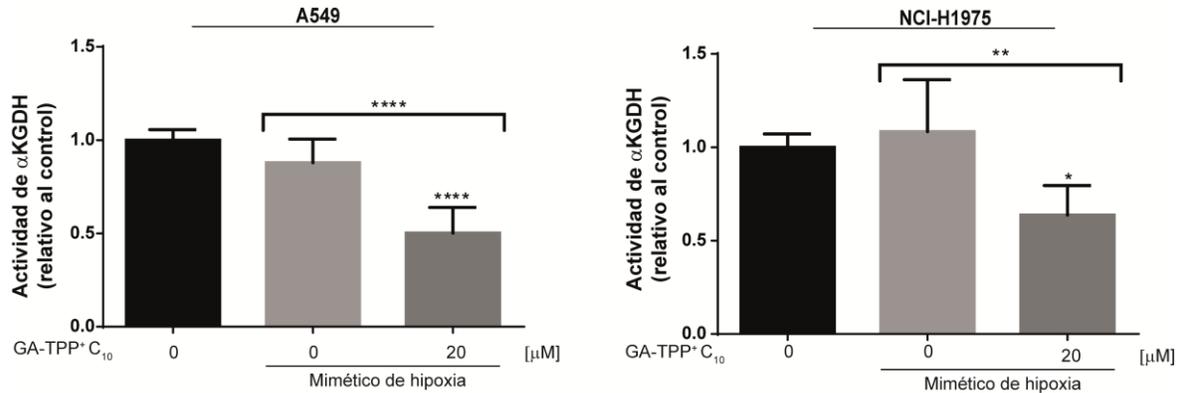


Figura 4. GA-TPP⁺C₁₀ produce una disminución de la actividad del αKGDHc, en la condición mimética a hipoxia. Ambas líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, A549 y NCI-H1975, fueron incubadas por 24 h a 20 μM de GA-TPP⁺C₁₀, posterior a ello se midió su actividad enzimática. Los valores son expresados como promedio ± SD, N = 3 en duplicado. **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,005, **** *p* ≤ 0,001, n.s. = no significativo, con respecto al control.

En conjunto, los datos presentados sugieren que GA-TPP⁺C₁₀ induce la degradación vía proteosomal de HIF1-α y OGDH. Por consiguiente, la degradación de la subunidad E1 OGDH produce la disminución de la actividad de αKGDHc, en la condición mimética a hipoxia.

6.3. GA-TPP⁺C₁₀ produce disfunción mitocondrial en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, en la condición mimética a hipoxia.

Estudios previos determinaron que GA-TPP⁺C₁₀ produce disfunción mitocondrial, por inhibición de la OXPHOS y actividad del αKGDHc, desencadenando la muerte de células cancerosas de mama [88]. A pesar de lo anterior, el efecto de GA-TPP⁺C₁₀ sobre el metabolismo en la condición mimética a hipoxia en células cancerosas de pulmón, permanece sin ser estudiado.

Luego de una exposición de 24 horas de GA-TPP⁺C₁₀ a 10 y 20 μ M se evaluó el efecto de este compuesto sobre la bioenergética mitocondrial, determinando la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y los niveles del potencial de membrana mitocondrial y de especies reactivas de oxígeno, en la condición mimética a hipoxia. Se observó que GA-TPP⁺C₁₀ disminuye significativamente la OCR, tanto en normoxia como con el mimético de hipoxia, en ambas líneas celulares (**Fig. 5A**). A su vez, en la condición mimética a hipoxia, el tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μ M por 24 h disminuye significativamente el potencial de membrana mitocondrial (**Fig. 5B**) y aumentan los niveles de especies reactivas de oxígeno (**Fig. 5C**), en comparación al basal.

En conclusión, GA-TPP⁺C₁₀ genera disfunción mitocondrial, disminuyendo la respiración mitocondrial tanto en normoxia como con el mimético de hipoxia, en ambas líneas celulares. A su vez, en la condición con el mimético de hipoxia, GA-TPP⁺C₁₀ disminuye significativamente el potencial de membrana mitocondrial y aumentan los niveles de especies reactivas de oxígeno.

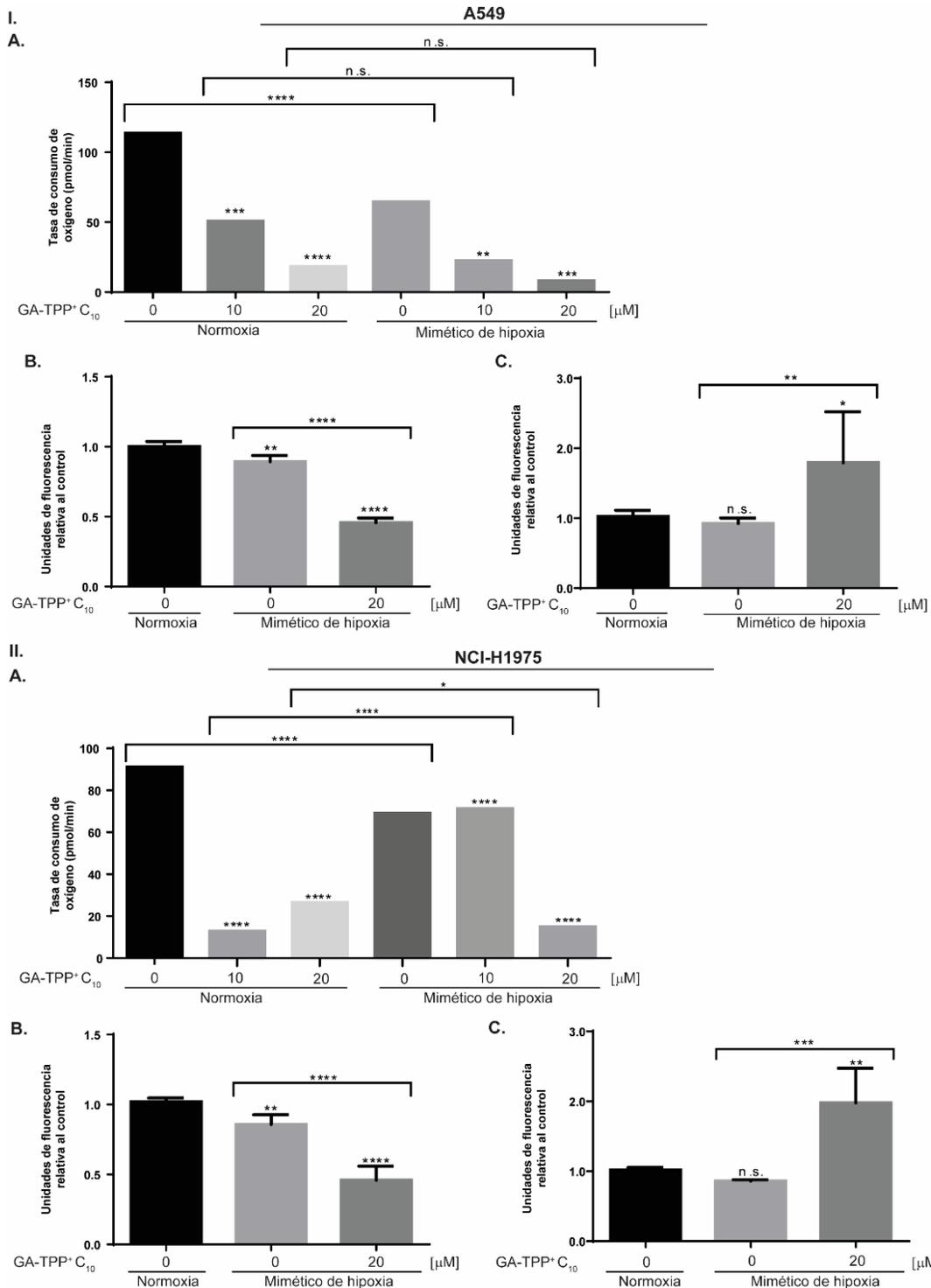


Figura 5. Efecto de GA-TPP+C₁₀ sobre la bioenergética mitocondrial de las líneas celulares de cáncer de pulmón, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia. Tanto en (I) A549 como en (II) NCI-H1975 se midieron distintos parámetros bioenergéticos tales como la A. tasa de consumo de oxígeno (OCR), B. potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando el indicador fluorescente TRMR en *non-quenching mode*, y C. especies reactivas de oxígeno (ROS) utilizando el indicador fluorescente dihidroetidio (DHE); a 24 horas de estimulación con GA-TPP+C₁₀ a 20 μ M. La condición “mimético de hipoxia” fue producida con CoCl₂ (400 μ M). Los valores son expresados como promedio \pm SD, N = 3 en duplicado. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,001$, n.s. = no significativo, con respecto al control.

6.4. GA-TPP⁺C₁₀ induce adaptación metabólica dependiente de AMPK en células cancerosas de pulmón en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.

Los resultados anteriores indican que GA-TPP⁺C₁₀ genera disfunción mitocondrial, disminuyendo la respiración mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial (**Fig. 5**). Por ende, se evaluó si este compuesto pudiese afectar otros parámetros bioenergéticos en las células tumorales, tales como los niveles de ATP intracelular y la eficiencia de acoplamiento (medida de la capacidad de síntesis de ATP acoplada a la respiración mitocondrial).

Como se aprecia en la **Figura 6A**, luego del estímulo por 4 horas con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 µM, este compuesto genera una disminución de los niveles de ATP intracelular en ambas líneas celulares. Sin embargo, esta disminución es significativa solo en la línea celular A549 y en la condición normóxica. A su vez, GA-TPP⁺C₁₀ disminuye significativamente la eficiencia de acoplamiento, tanto en normoxia como con el mimético de hipoxia, en ambas líneas celulares (**Fig. 6C**).

Debido a que la disminución de los niveles de ATP intracelular no fue pronunciada, en comparación a la drástica caída en el OCR (**Fig. 5A**) y en la eficiencia de acoplamiento (**Fig. 6C**), se propuso que GA-TPP⁺C₁₀ podría inducir un remodelamiento metabólico hacia la glicólisis para mantener los niveles de ATP adecuados para promover la supervivencia celular. Este aumento de la glicólisis bajo una inhibición del metabolismo mitocondrial, podría ser mediada por la quinasa dependiente de AMP, AMPK [100].

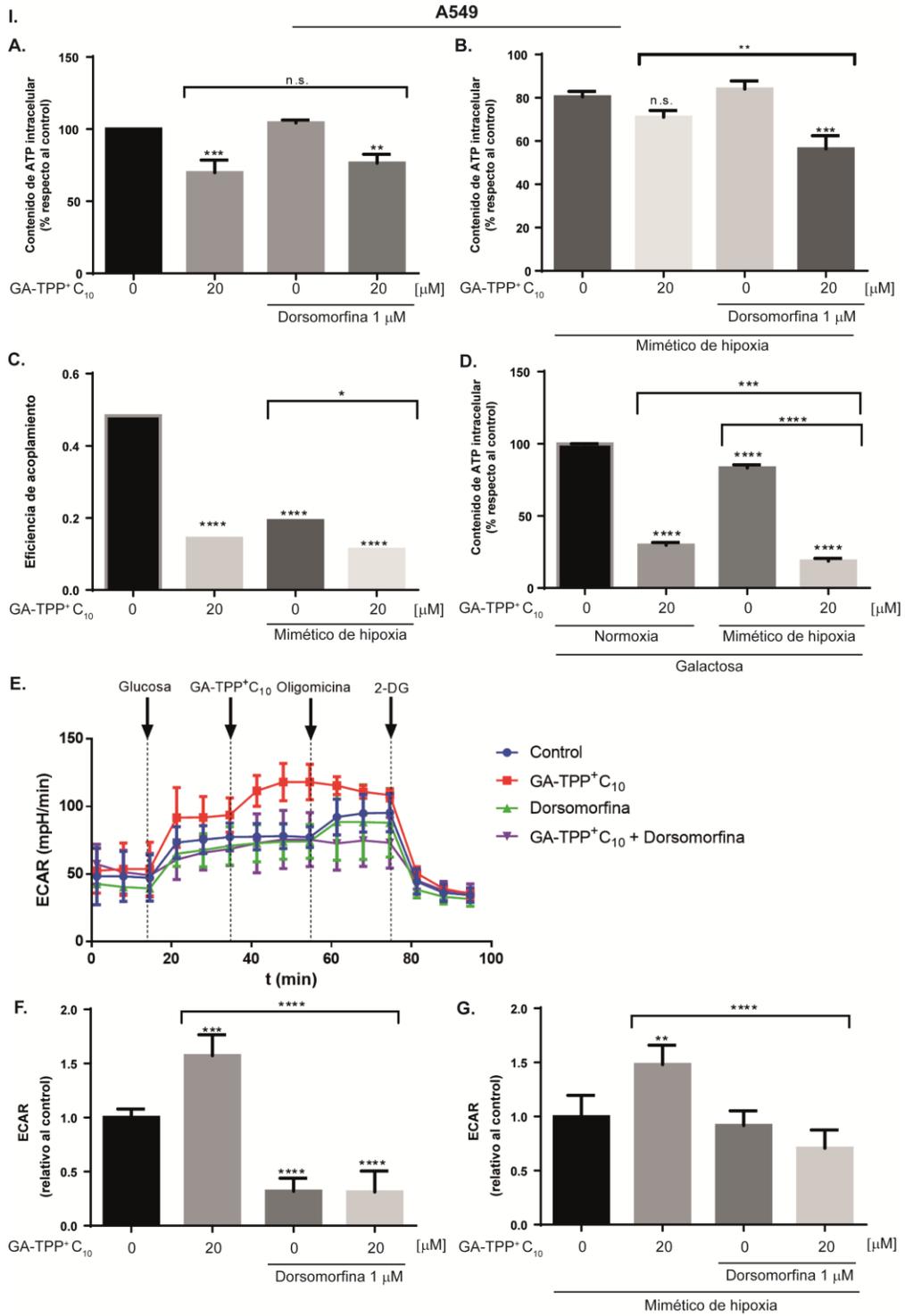
Por esto, se evaluaron los niveles de ATP intracelular, esta vez con un tratamiento previo utilizando dorsomorfina, un inhibidor de AMPK. Se observó una disminución significativa de los niveles de ATP intracelular en la línea A549. Sin embargo, solo fue significativa en la condición mimética a hipoxia (**Fig. 6A-B**). Consistente con lo anterior, se evaluaron los niveles de ATP intracelular en un medio sin glucosa y suplementado con

galactosa, en el cual no hay producción neta de ATP mediante la glicólisis. Por lo tanto, las células cancerosas dependen estrictamente de la fosforilación oxidativa. En esta condición, el tratamiento de GA-TPP⁺C₁₀ disminuye drásticamente los niveles de ATP intracelular (**Fig. 6D**). En conclusión, esto sugiere que GA-TPP⁺C₁₀ induce cambios adaptativos del metabolismo energético en ambas líneas celulares.

Finalmente, para comprobar si GA-TPP⁺C₁₀ produce un remodelamiento metabólico desde la OXPHOS hacia la glicólisis, se evaluó la tasa de acidificación extracelular (ECAR) como una medida de la operación de la glicólisis. Se observó que GA-TPP⁺C₁₀ induce un aumento de la tasa glicolítica (**Fig. 6E-G**) en ambas líneas celulares, en normoxia y mimético a hipoxia. A su vez, para determinar si el remodelamiento metabólico hacia la glicólisis es dependiente de AMPK, se evaluó el ECAR posterior a un pretratamiento con dorsomorfina, el inhibidor de AMPK. Se observó que dorsomorfina revirtió el aumento de la tasa glicolítica producido por GA-TPP⁺C₁₀ (**Fig. 6E-G**).

El efecto de GA-TPP⁺C₁₀ sobre los niveles de fosforilación de AMPK fueron evaluados mediante western blot, junto al tratamiento previo con dorsomorfina (inhibidor de AMPK). En forma consistente a lo evaluado en la figura anterior, se observó que GA-TPP⁺C₁₀ aumenta la fosforilación de la subunidad α de AMPK (treonina 172, fosforilación activante de la quinasa), la cual se ve prevenida a su vez con tratamiento de dorsomorfina, en ambas líneas celulares, en normoxia (**Fig. 7A-B**). En última instancia, se observó que la combinación con el inhibidor de AMPK disminuye significativamente la viabilidad en la línea A549 tanto en normoxia como con el mimético a hipoxia a 48 h (**Fig. 7C**).

En conjunto, estos resultados confirman que GA-TPP⁺C₁₀ genera un remodelamiento metabólico desde la OXPHOS hacia la glicólisis, a través de la señalización de AMPK y utilizando como sustrato la glucosa, para mantener las necesidades energéticas y con ello la supervivencia celular.



(continuación ...)

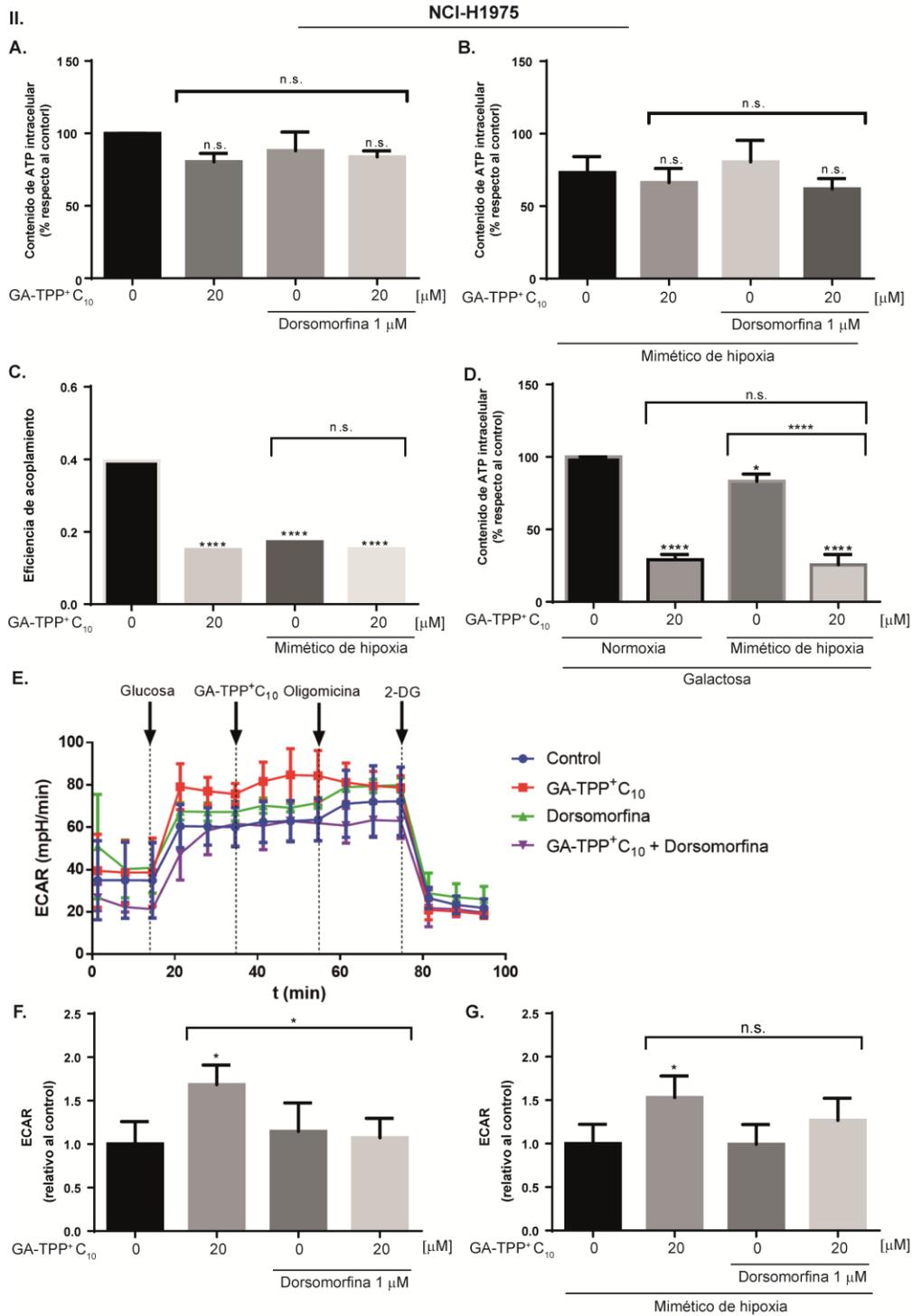


Figura 6. GA-TPP⁺C₁₀ induce un cambio metabólico hacia la glicólisis, mediante la activación de AMPK, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia. Las líneas celulares de cáncer de pulmón I. A549 y II. NCI-H1975 fueron previamente tratadas por 24 h con CoCl₂ (400 μM), posteriormente se estimuló durante 4 horas con GA-TPP⁺C₁₀ (20 μM), y en el caso que lo corresponda con el inhibidor de AMPK, dorsomorfina (1 μM). A. Niveles de ATP celular, en condiciones de normoxia y B. mimético a hipoxia C. Eficiencia de acoplamiento. D. Niveles de ATP celular, en medio sin glucosa y con galactosa 10 mM. E-F. Perfil cinético de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en normoxia y G. en condición mimética a hipoxia. Los valores son expresados como promedio ± SD, N = 3. **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,005, *****p* ≤ 0,001, n.s. = no significativo, con respecto al control.

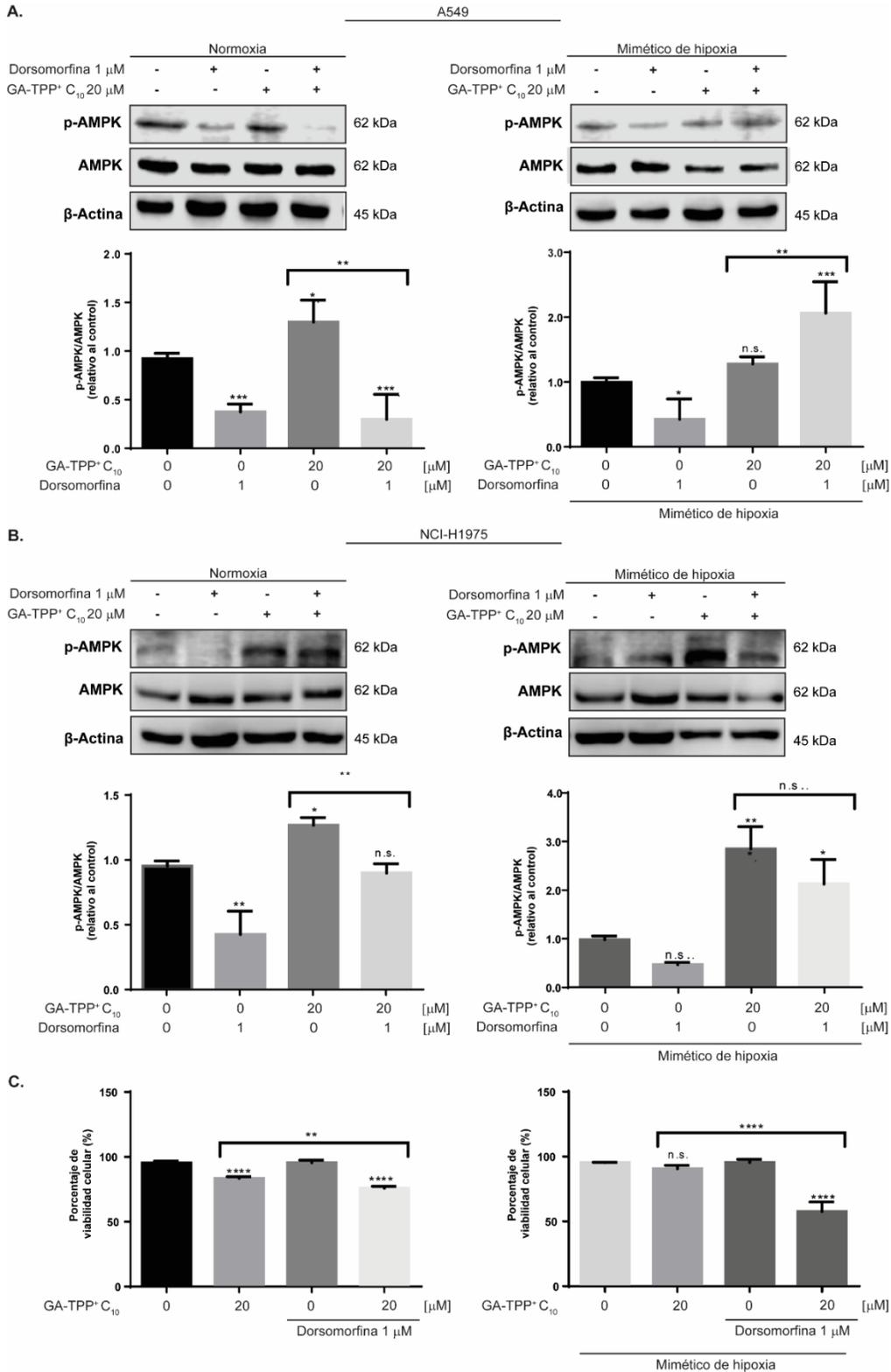


Figura 7. La activación de AMPK inducida por GA-TPP⁺C₁₀ mantiene la supervivencia celular. A. Niveles de p-AMPK y AMPK total, a través de Western blot. Se utiliza β -actina como control de carga. B. Viabilidad celular en la línea celular A549 a 48 horas de estímulo, a través del análisis FACS utilizando anexina V y yoduro de propidio. Los valores son expresados como promedio \pm SD, N = 3 * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,005, **** p \leq 0,001, n.s. = no significativo, con respecto al control.

Anteriormente se determinó que GA-TPP⁺C₁₀ induce la disminución de los niveles de la subunidad E1 OGDH (**Fig. 2**) y genera una activación de AMPK (**Fig. 7A-B**). Por esto, se evaluó la participación de esta quinasa en los cambios de OGDH.

Como se aprecia en la **Figura 8**, la inhibición de AMPK con dorsomorfina, en conjunto al tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀, aumenta los niveles de proteína de la subunidad E1 OGDH en ambas líneas celulares. Sin embargo, solo es significativa en normoxia (**Fig. 8A-B**). En conclusión, la degradación vía proteosomal de OGDH inducida por GA-TPP⁺C₁₀ es dependiente de AMPK, en ambas celulares de adenocarcinoma de pulmón en condición normóxica.

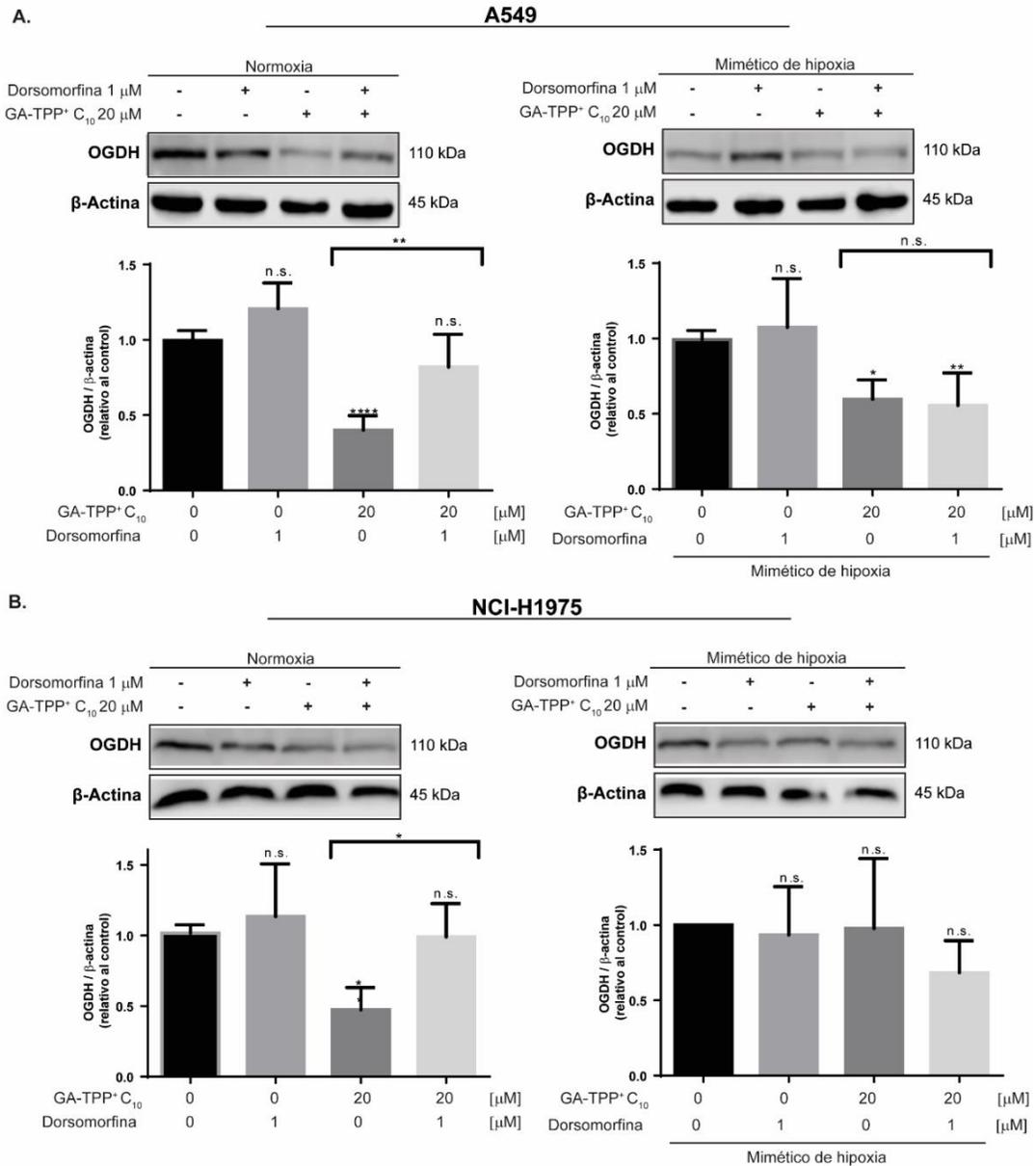


Figura 8. AMPK participa en los cambios del nivel de la subunidad E1 OGDH del α KGDHc inducidos por GA-TPP⁺C₁₀, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia en células A549. Western blot de OGDH a 24 horas de estimulación con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μ M, en conjunto con CoCl₂ a 400 μ M y dorsomorfinina 1 μ M, en las líneas celulares A. A549 y B. NCI-H1975. Se utiliza β -actina como control de carga. Los valores son expresados como promedio \pm SD, N =3. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$, n.s. = no significativo, con respecto al control.

Dada esta disminución en los niveles de la subunidad E1 OGDH del α KGDHc mediada por AMPK (Fig. 8), y la disminución de la OCR (Fig.5A), se evaluaron los niveles de la proteína de la membrana mitocondrial externa, VDAC, y proteínas de la membrana mitocondrial interna, los complejos de la CTE (I, II, III y V).

Se observó que GA-TPP+C₁₀ induce un aumento de VDAC tanto en normoxia como con el mimético de hipoxia, en ambas líneas celulares (**Fig. 9**). Por su parte, GA-TPP+C₁₀ induce un aumento significativo de los complejos de la CTE, tanto en normoxia como con el mimético de hipoxia, en la línea A549 (**Fig. 10A**), excepto del complejo I. Esta tendencia también puede observarse en algunos complejos en la línea celular NCI-H1975 (**Fig. 10B**). Sin embargo, solamente es estadísticamente significativa en el complejo III. A su vez, se observó que, en la línea celular A549 en condición normóxica, el aumento de las proteínas mitocondriales de membrana es dependiente de la actividad de AMPK (**Fig. 11**).

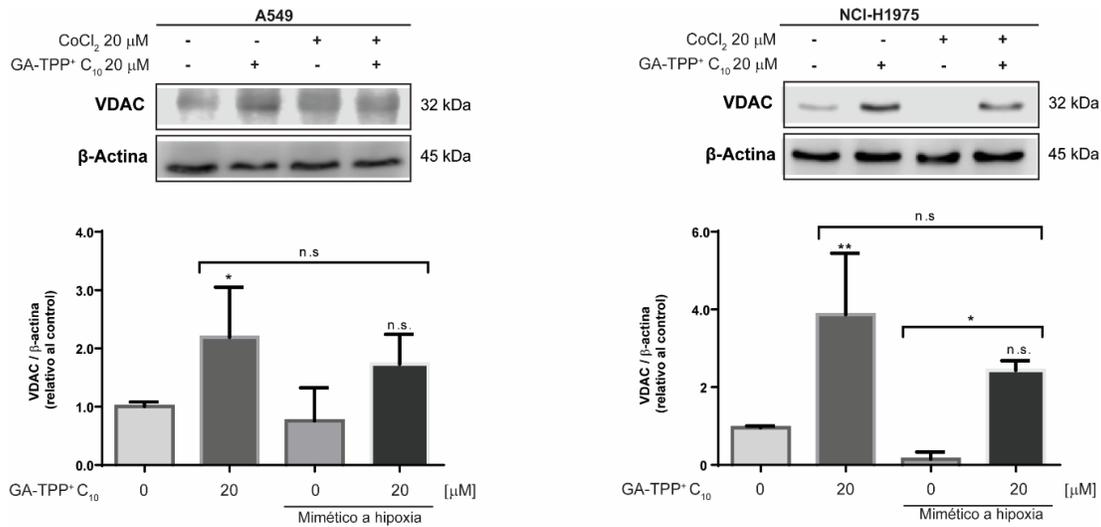


Figura 9. Los niveles de VDAC aumentan con el tratamiento de GA-TPP+C₁₀ en normoxia. Western blot de VDAC a 24 horas de estimulación con GA-TPP+C₁₀ a 20 μ M, en conjunto con CoCl₂ a 400 μ M, en las líneas células A549 y NCI-H1975. Se utiliza β -actina como control de carga. Los valores son expresados como promedio \pm SD, N =3. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, n.s. = no significativo, con respecto al control.

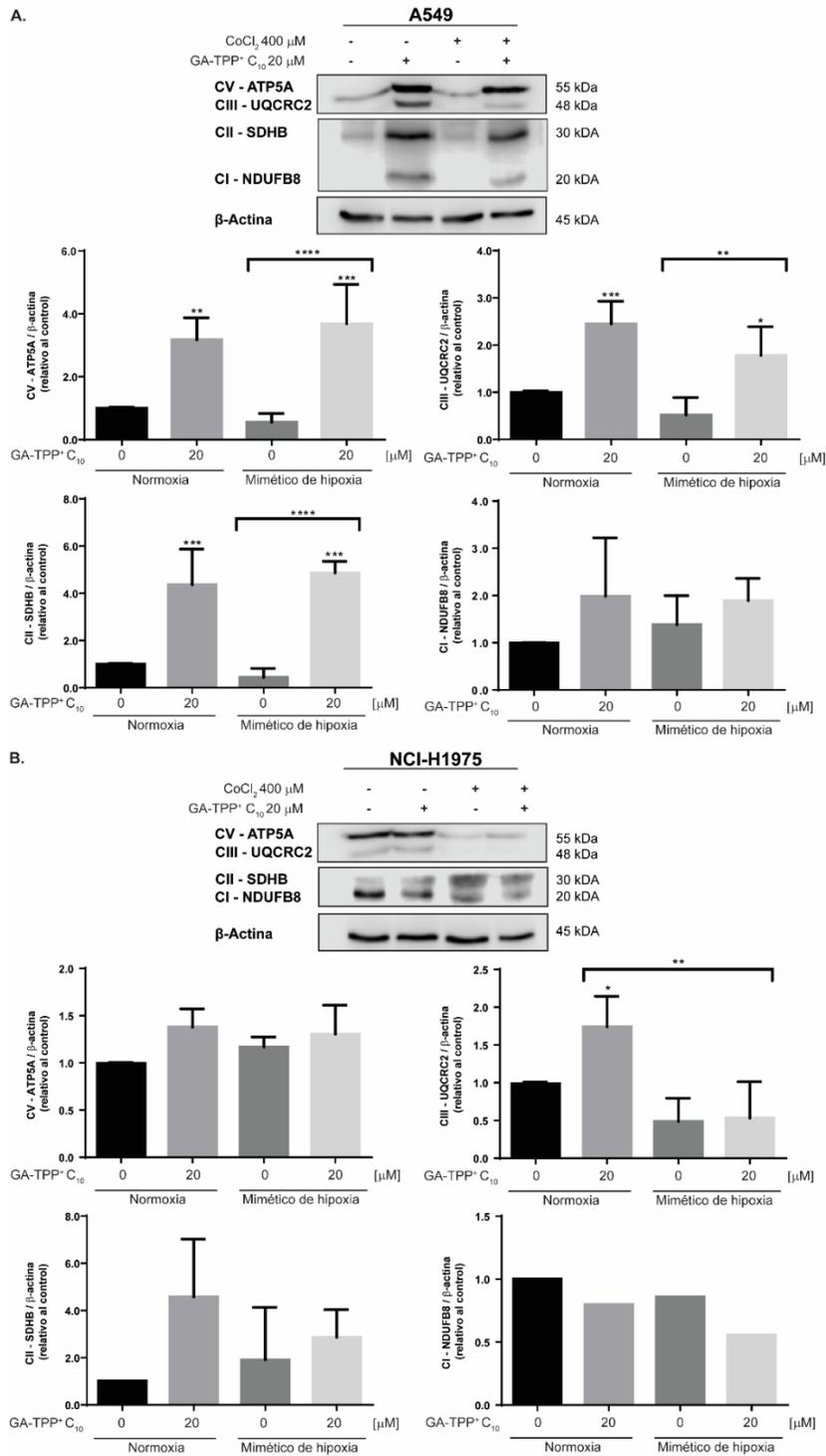


Figura 10. Los complejos de la OXPHOS aumentan con el tratamiento de GA-TPP⁺C₁₀, tanto en condiciones de normoxia como de mimético a hipoxia en la línea celular A549. Nivel de la subunidad NADH deshidrogenasa (NDUFB8) (Complejo I), subunidad succinato deshidrogenasa (SDHB) (Complejo II), complejo ubiquinol-citocromo c reductasa (UQCRC2) (Complejo III) y subunidad α de la ATP sintasa F1 (ATP5A) (Complejo V), de la cadena transportadora de electrones, fueron medidos por Western blot a 24 horas de estimulación con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μM, en conjunto con CoCl₂ a 400 μM, en las líneas células A. A549 y B. NCI-H1975. Se utiliza β-actina como control de carga. Los valores son expresados como promedio ± SD, N = 4. **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,005, **** *p* ≤ 0,001 con respecto al control.

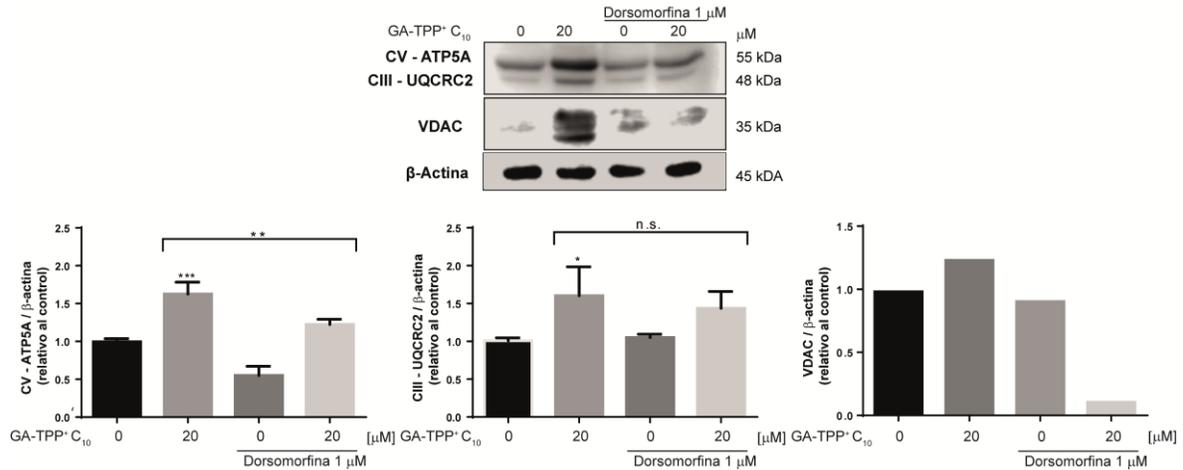


Figura 11. El aumento de las proteínas mitocondriales de membrana es dependiente a AMPK, en la línea A549. Western blot del complejo V, complejo III y VDAC a 24 horas de estimulación con GA-TPP+C₁₀ a 20 μM. Se utiliza β-actina como control de carga. Los valores son expresados como promedio ± SD, N =3 (para los complejos V y III) y N = 1 (para VDAC). **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,005, n.s. = no significativo, con respecto al control.

Dado el aumento en el nivel del complejo III de la cadena transportadora de electrones (CTE), se evaluó si este aumento participa en la supervivencia celular. Este fenómeno podría estar mediado a través del restablecimiento del flujo de electrones en la CTE mediante la lanzadera de la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa mitocondrial (GPDHm), la cual entrega electrones a la ubiquinona y de ella al complejo III [101].

A través de la combinación de GA-TPP+C₁₀ a 20 μM, junto al inhibidor del complejo III antimicina A 0,25 μM (concentración no letal), se observó una disminución parcial pero significativa de la viabilidad de las células A549 a las 48 h (**Fig. 12**).

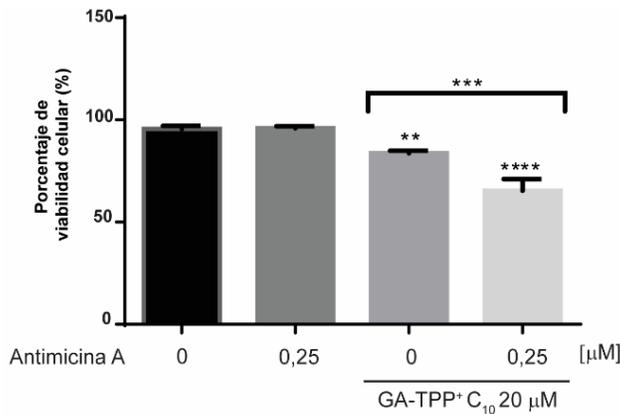


Figura 12. La inhibición del complejo III de la cadena transportadora de electrones disminuyó la viabilidad en conjunto con el tratamiento de GA-TPP+C₁₀, en la línea celular A549. Viabilidad celular a través del análisis FACS utilizando anexina V/P. Se estimuló durante 48 horas con GA-TPP+C₁₀ a 20 μM, en conjunto con antimicina a 0,25 μM. Los valores son expresados como promedio ± SD, N = 4. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,001$, con respecto al control.

En conjunto, estos resultados sugieren que la disfunción mitocondrial producida por GA-TPP+C₁₀ desencadena adaptaciones metabólicas, tales como el aumento de los niveles del complejo III para restablecer el flujo de electrones en la CTE, lo cual está parcialmente involucrado en la mantención de la sobrevivencia celular.

6.5. GA-TPP+C₁₀ inhibe la formación de colonias, migración celular y resistencia a quimioterápicos, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.

Dada la inhibición de la bioenergética celular por GA-TPP+C₁₀, se evaluó si ésta impacta en parámetros de malignidad de las células de adenocarcinoma, tales como la formación de colonias, migración celular y resistencia a quimioterápicos tradicionales, en condiciones de normoxia y mimético a hipoxia.

Recientemente se ha demostrado que un microambiente tumoral hipóxico promueve procesos metastásicos, entre ellos la capacidad de resistir al anoikis (muerte celular programada producida tras la pérdida de contacto de la célula con la matriz extracelular [102]) y así poder formar tumores secundarios alejados del tumor de origen [102].

Por esto se evaluó el efecto de GA-TPP⁺C₁₀ sobre la formación de colonias tanto en normoxia como en condición mimética a hipoxia. La condición basal con el mimético a hipoxia aumentó la formación de colonias. A su vez, el tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μM por 6 h inhibió la formación de colonias de manera significativa, tanto en normoxia como con el mimético a hipoxia, en ambas líneas celulares (**Fig. 13**).

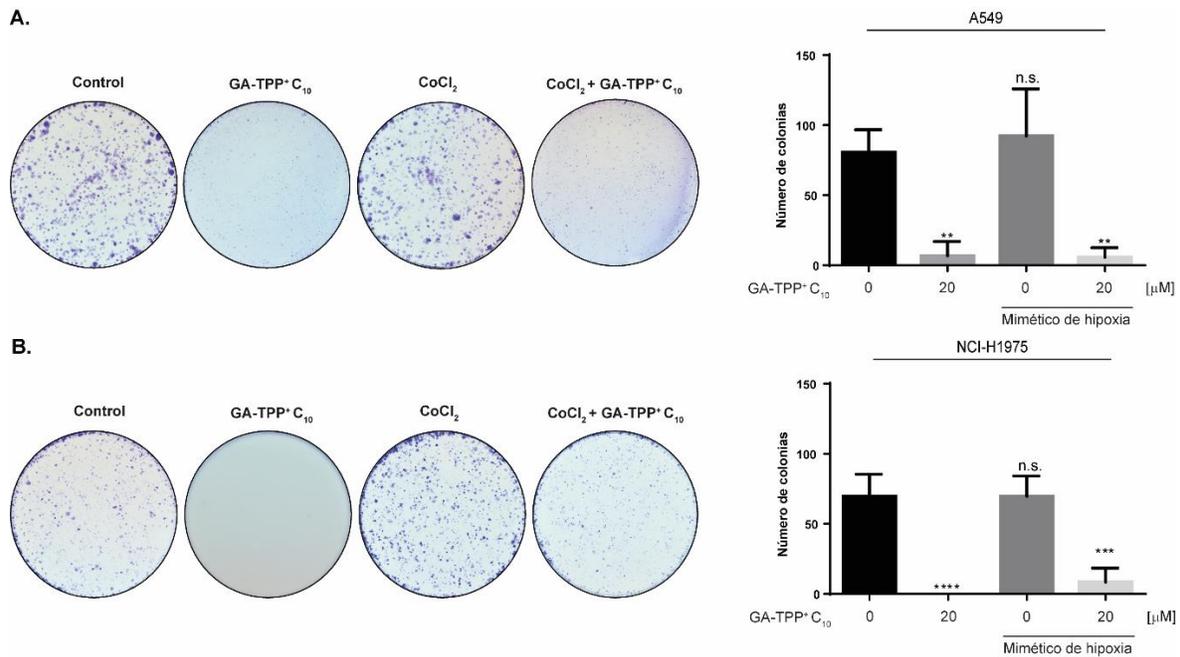


Figura 13. GA-TPP⁺C₁₀ inhibe la formación de colonias en normoxia y mimético a hipoxia. Se evaluó la capacidad de formación de colonias en las líneas celulares A. A549 y B. NCI-H1975, luego de un estímulo de 6 horas con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μM, en conjunto con CoCl₂ a 400 μM. Los valores son expresados como promedio ± SD, N=4. ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,005, **** *p* ≤ 0,001, n.s. = no significativo, con respecto al control.

El antígeno nuclear celular en proliferación o PCNA, a menudo denominado "anillo maestro del genoma", es una proteína con forma de anillo que rodea la cadena de ADN y actúa como un andamio para favorecer la síntesis de ADN y regular los procesos de replicación y reparación [103], motivo por el cual es indispensable en los procesos oncogénicos de crecimiento, proliferación y supervivencia de las células cancerosas [104]. Además, esta proteína se ve sobreexpresada en diversas líneas celulares no pequeñas de pulmón [105].

Considerando lo anterior, se evaluó el efecto de GA-TPP⁺C₁₀ sobre los niveles de PCNA, en ambas líneas celulares de cáncer de pulmón. En la condición basal con el mimético de hipoxia, aumentan los niveles de PCNA en ambas líneas celulares. Sin embargo, es solo significativa en la línea A549. Además, el tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀ induce una disminución en los niveles de esta proteína en normoxia y mimético de hipoxia, en ambas líneas celulares (**Fig. 14A-B**).

A su vez, para evaluar si la activación de AMPK inducida por GA-TPP⁺C₁₀ participa en la disminución observada de PCNA, se preestimuló con dorsomorfina. Se observó el rescate de la condición normal en el tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀ y dorsomorfina, en ambas líneas celulares. Sin embargo, solo es significativa en la condición normóxica (**Fig. 14A-B**). Además, se observó que GA-TPP⁺C₁₀ genera una detención del ciclo celular en fase G1, en ambas líneas celulares (**Fig. 14C**).

En conjunto, estos resultados sugieren que GA-TPP⁺C₁₀ tiene un efecto antiproliferativo mediado por la detención del ciclo celular y disminución de los niveles de PCNA, a través de la activación de AMPK en normoxia.

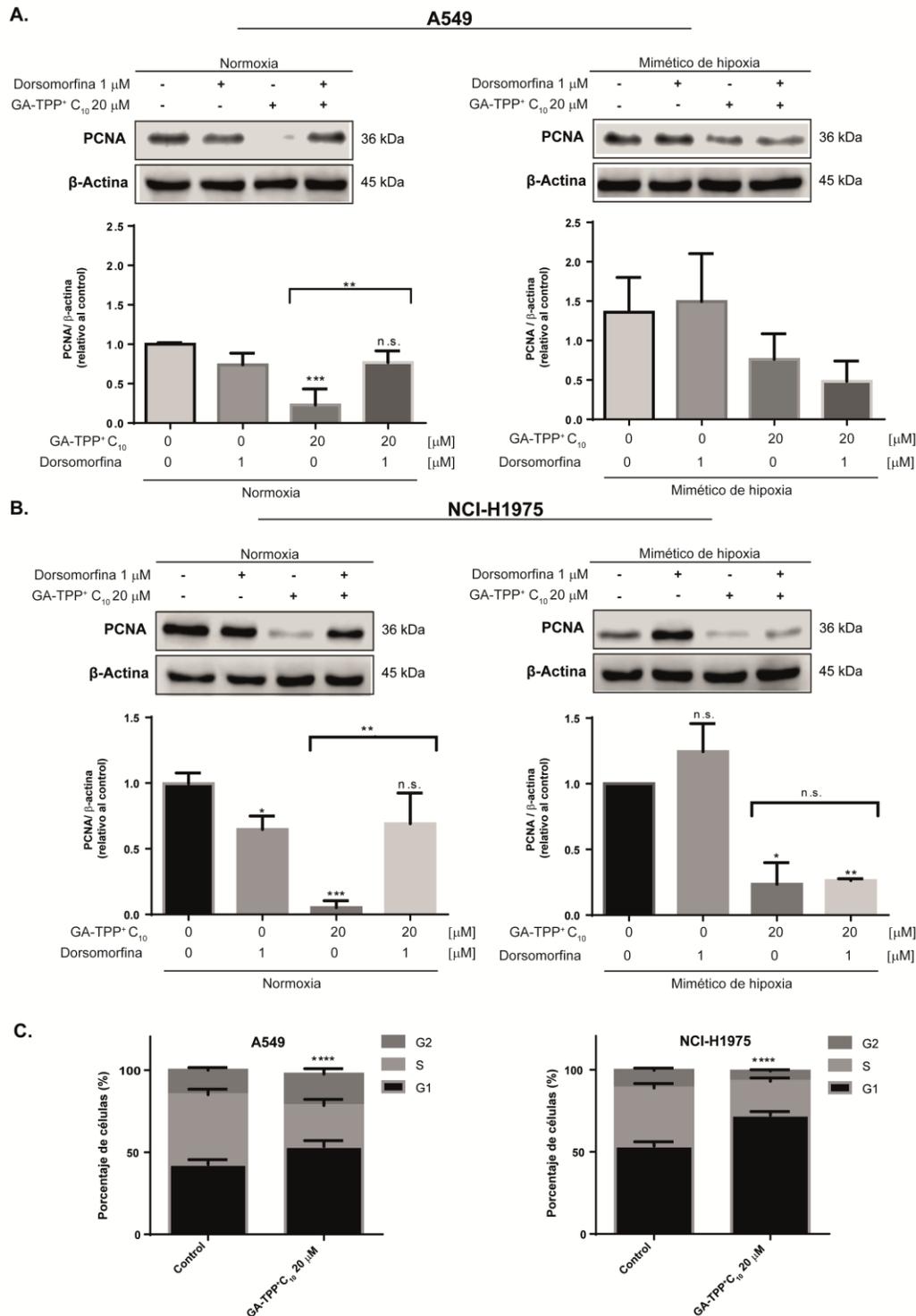


Figura 14. GA-TPP⁺C₁₀ disminuye los niveles de PCNA, a través de la activación de AMPK, en normoxia. Western blot de PCNA a 24 horas de estimulación con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μ M, en conjunto con CoCl₂ a 400 μ M y dorsomorfina 1 μ M en las líneas celulares A. A549 y B. NCI-H1975. Se utiliza β -actina como control de carga. C. Efecto de GA-TPP⁺C₁₀ en el ciclo celular después de 48 horas en A549 y NCI-H1975, medido a través de citómetro de flujo. Los valores son expresados como promedio \pm SD, N = 4. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,001$, n.s. = no significativo, con respecto al control. C. significancia medida en relación al control en fase G1.

La migración de las células cancerosas es un paso esencial en el proceso metastásico [106], estableciéndose una relación directa entre la estabilización de HIF1- α y el aumento de la migración en otros modelos tumorales [107]. Además, se ha reportado anteriormente que la activación de AMPK inhibe la migración celular, atenuando la formación de lamelipodios, a través de la fosforilación de Pdlim5 en la Serina 177, la cual suprime la vía de señalización de Rac1-complejo Arp2/3 [108].

Por esto se determinó el efecto de GA-TPP+C₁₀ en la migración celular, en la condición mimética a hipoxia. Se observó que la condición basal de mimético a hipoxia aumenta la migración, la cual es disminuida con el tratamiento de GA-TPP+C₁₀ en ambas líneas celulares (**Fig. 15A-B**).

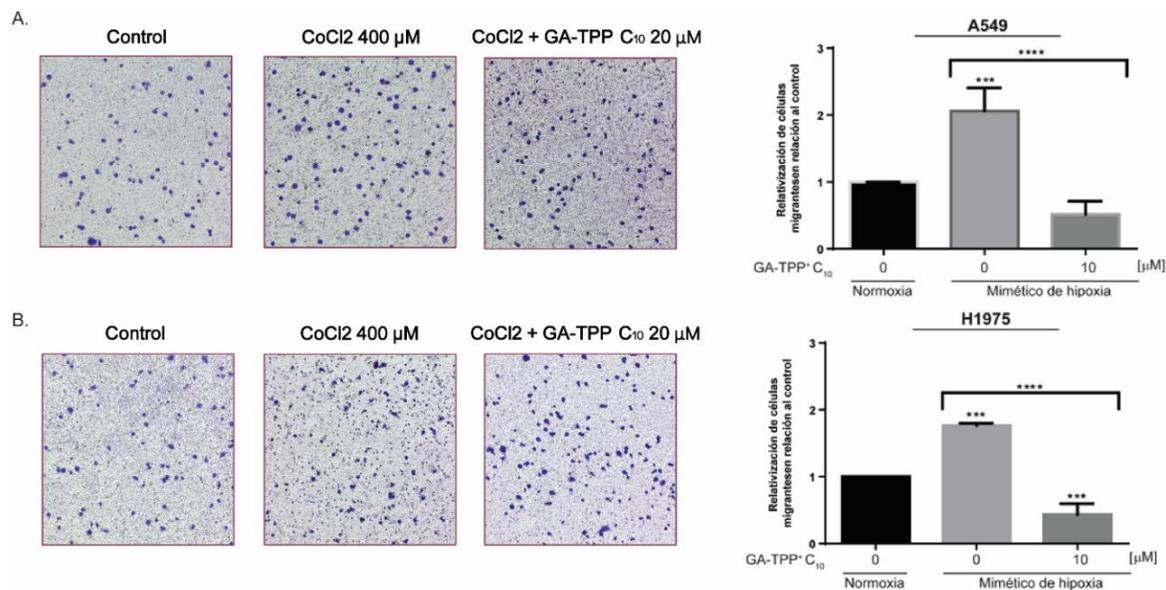


Figura 15. GA-TPP+C₁₀ inhibe la migración de las líneas celulares de cáncer de pulmón, en condición mimética a hipoxia. Las líneas celulares A. A549 y B. NCI-H1975 fueron estimuladas durante 24 horas con GA-TPP+C₁₀ a 20 μM, en conjunto con CoCl₂ a 400 μM. Posteriormente, se colocaron en una cámara Transwell para evaluar su migración. Los valores son expresados como promedio ± SD, N = 4. *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,001$ con respecto al control.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los cuales indican la activación de AMPK inducida por GA-TPP+C₁₀ (**Fig. 7**), se evaluó si la inhibición de la migración celular observada previamente podía verse afectada por la inhibición de esta quinasa. Por otra

parte, dada la inhibición del α KGDHc inducida por GA-TPP⁺C₁₀ (**Fig. 4**), se evaluó si la inhibición de la migración celular observada previamente se debe a la acumulación de su sustrato, α KG, el cual podría a su vez inducir la fosforilación de AMPK.

Para ello se trató previamente con dorsomorfina (1 μ M) y luego con GA-TPP⁺C₁₀ (20 μ M) por 24 h. La inhibición de AMPK por dorsomorfina no afectó la inhibición de la migración ya generada por GA-TPP⁺C₁₀ en la línea A549, ni en normoxia ni con el mimético de hipoxia (**Fig. 16A-B**).

Por otro lado, se trató previamente con dm- α KG (5 mM) y luego con GA-TPP⁺C₁₀ (20 μ M) por 24 h. La adición de α KG exógeno no aumentó la inhibición de la migración generada por GA-TPP⁺C₁₀ en la línea A549, ni en normoxia ni con el mimético de hipoxia (**Fig. 16C-D**).

Adicionalmente, se añadió metil-succinato al medio celular, el precursor permeable de succinato, para determinar si la incorporación de este sustrato que alimenta tanto el ciclo TCA como la OXPHOS, podría revertir el efecto de GA-TPP⁺C₁₀ sobre la migración celular. Se observó que metil-succinato revierte la inhibición de la migración inducida por GA-TPP⁺C₁₀ en las células A549. Sin embargo, solo es significativo en la condición mimética a hipoxia (**Fig. 16E-F**).

En conjunto con estos resultados, podemos señalar que la disfunción mitocondrial inducida por GA-TPP⁺C₁₀ inhibe la migración celular, de manera independiente a la activación de AMPK. A su vez, mediante la adición de sustrato metil-succinato, las células A549 pudieron mantener un ciclo TCA y una respiración mitocondrial funcional, para sustentar la migración celular.

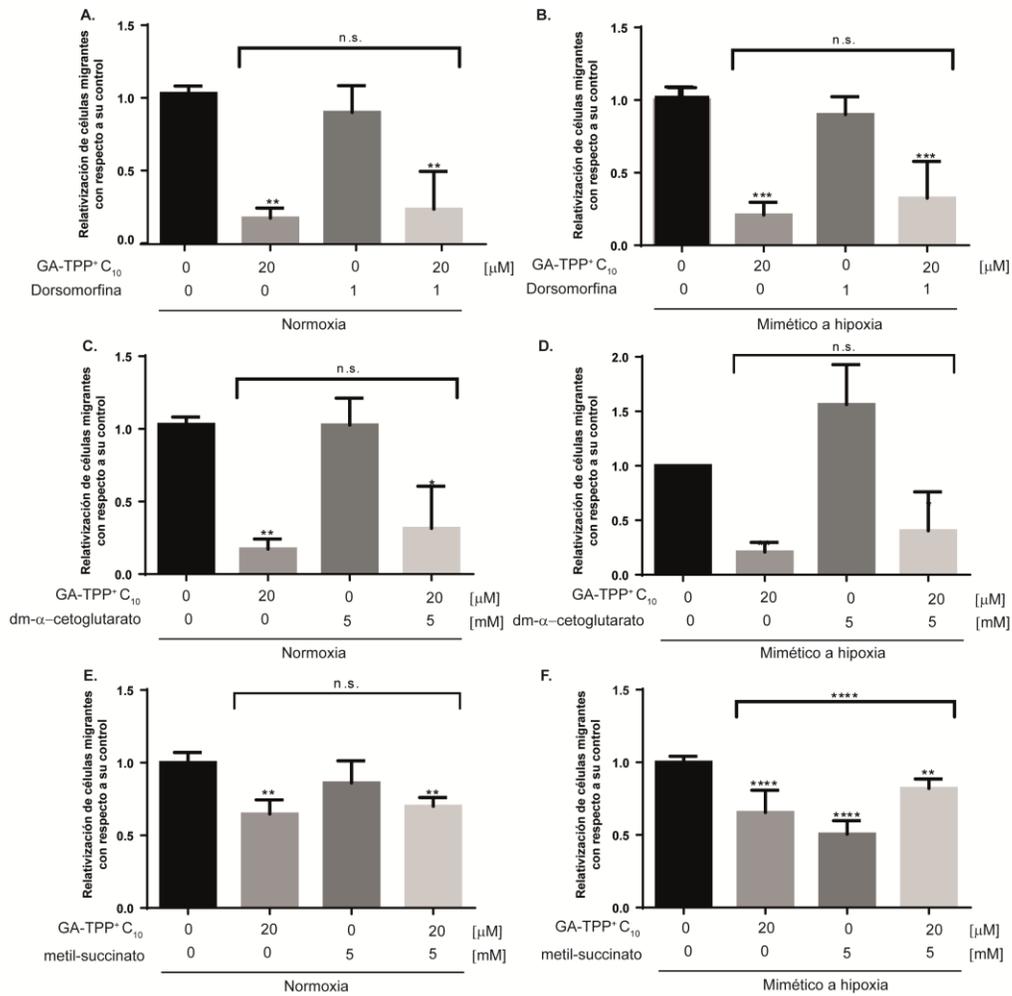


Figura 16. La inhibición de la migración celular inducida por GA-TPP⁺C₁₀, tanto en condición de normoxia y mimético a hipoxia, es independiente de AMPK y de la adición de αKG exógeno. La línea celular A549 fue estimulada durante 24 horas con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μM, en conjunto con CoCl₂ a 400 μM y (A-B) dorsomorfina 1 μM, (C-D) dimetil-α-cetoglutarato (dm-αKG) 5 mM o metil-succinato (5 mM) (E-F). Posteriormente, se colocaron en una cámara Transwell para evaluar su migración. Los valores son expresados como promedio ± SD, N = 3 (E-F. N=2) ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,005, *****p* ≤ 0,001, n.s. = no significativo, con respecto al control.

La resistencia a quimioterápicos constituye uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer [109]. Una de las poblaciones de células cancerosas que posee esa característica son las *cancer stem cells* o células madre tumorales, las cuales al estar en un microambiente tumoral hipóxico, tienen estabilizado el factor de transcripción inducible por hipoxia o HIF1-α [110].

Por esto se evaluó si GA-TPP⁺C₁₀ podía vencer la resistencia a quimioterápicos generada en esta condición mimético a hipoxia. Se observó que en la condición mimética a hipoxia aumenta significativamente la viabilidad frente al tratamiento con doxorubicina 50 nM por 48 h en comparación al tratamiento usado en normoxia. Consistente con la literatura, esto sugiere una mayor resistencia a estímulos de muerte por quimioterápicos en condición hipóxica [111]. A la vez, cuando se administra doxorubicina con GA-TPP⁺C₁₀ en conjunto, se observa una disminución de la viabilidad celular (**Fig. 17**).

En conclusión, estos datos sugieren que GA-TPP⁺C₁₀ vence la resistencia a doxorubicina generada en condiciones miméticas a hipoxia.

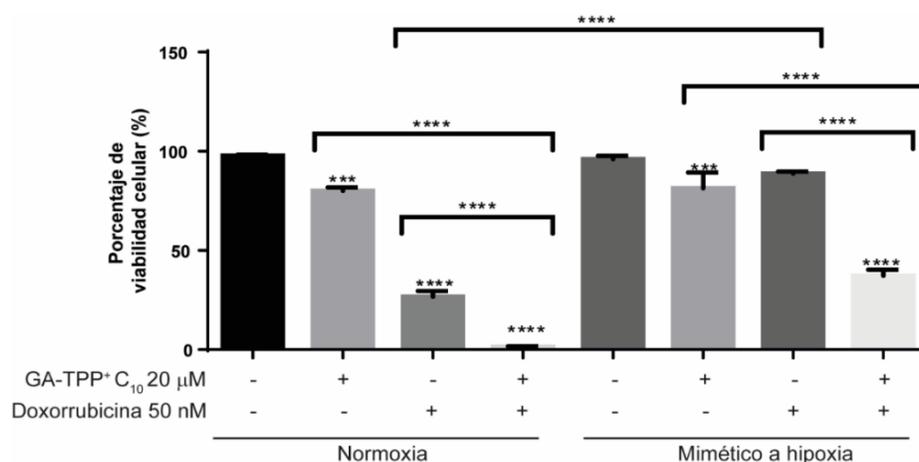


Figura 17. GA-TPP⁺C₁₀ vence la resistencia a quimioterápicos generada en condiciones de mimético a hipoxia. La línea celular A549 fue estimulada durante 48 horas con GA-TPP⁺C₁₀ a 20 μM, en conjunto con CoCl₂ a 400 μM y doxorubicina 50 nM; luego se evaluó la viabilidad celular mediante análisis FACS, a través de AV/PI. Los valores son expresados como promedio ± SD, N = 3. ***p ≤ 0,005, **** p ≤ 0,001, con respecto al control.

7. Discusión

α KGDHc es uno de los complejos enzimáticos más sensibles a los cambios del microambiente tumoral y es crucial en la adaptación metabólica de células tumorales. Sin embargo, todavía se desconocen los mecanismos que están involucrados en este fenómeno y cómo la adaptación metabólica dependiente de OGDH permite la supervivencia de las células cancerosas en hipoxia. Actualmente, considerando la escasa disponibilidad de inhibidores específicos para el α KGDHc, resulta fundamental la búsqueda de nuevas moléculas que inhiban de manera selectiva este complejo enzimático.

Previamente fue descrito que GA-TPP+C₁₀ inhibe la actividad del α KGDHc, afectando el metabolismo mitocondrial en modelos de cáncer de mama [88]. Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual induce esta inhibición y si éste es dependiente o no de la estabilización de HIF1- α .

En este trabajo se describe el mecanismo por el cual se produce la inhibición de la actividad del α KGDHc (**Fig. 4**). Se observó que GA-TPP+C₁₀ disminuye los niveles de OGDH mediante la degradación proteosomal independiente de la presencia de HIF1- α (**Fig. 2-3**), lo cual disminuye la actividad del α KGDHc anteriormente reportada [88]. Para todos los inhibidores conocidos de OGDH, este es el primer reporte de una degradación inducida por un compuesto.

En conjunto a la inhibición del α KGDHc producida por GA-TPP+C₁₀, se desencadena una disfunción mitocondrial caracterizada por una despolarización de la membrana mitocondrial, la disminución de la respiración mitocondrial, el aumento de ROS (**Fig. 5**), el cambio metabólico desde la OXPHOS hacia la glicólisis dependiente de AMPK (**Fig. 6**) y el aumento de las proteínas de la membrana externa e interna mitocondrial (VDAC y complejos de la CTE, respectivamente) (**Fig. 9-10**), de los cuales se demostró que tanto

el aumento observado de los complejos III y V, como el de VDAC, son dependientes de AMPK (**Fig. 11**).

Estos resultados, junto a la evidencia entregada por Fuentes-Retamal et al., 2020 [88] en modelos celulares de cáncer de mama, sugieren un aumento de la biogénesis mitocondrial, la cual busca apoyar la demanda energética de las células cancerosas bajo un estrés metabólico [28]. El principal regulador del metabolismo mitocondrial es PGC1 α , un factor de regulación co-transcripcional que induce la síntesis y ensamblaje de diferentes componentes del CTE a través de la activación de una serie de factores de transcripción (tales como los factores respiratorios nucleares 1 y 2, NRF-1 y NRF-2, que a su vez promueven la expresión del factor de transcripción mitocondrial A, TFAM [30]) y de vías de señalización de supervivencia del eje mTOR/AMPK [112]. Décadas de investigación han determinado que este fenómeno determina finalmente el efecto terapéutico de varios compuestos quimioterápicos cuyo blanco está relacionado con inducir disfunción en la OXPHOS [18, 113]. Por otra parte, la heterogeneidad metabólica que subyace en diferentes poblaciones de células cancerosas en un mismo tumor contribuye a una baja eficacia del tratamiento [114] y la adquisición de resistencia a fármacos antitumorales [115]. Por consiguiente, el estudio de las respuestas adaptativas del metabolismo de las células cancerosas debe abordarse para sí identificar nuevos blancos que puedan superar la plasticidad metabólica tumoral.

Los fenómenos anteriormente descritos forman parte de un mecanismo de adaptación ante el estrés metabólico inducido por el compuesto. El remodelamiento metabólico hacia la glicólisis no solo mantiene los niveles de ATP intracelular, sino que también entrega precursores que permiten el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones, a través de la lanzadera glicerol-3-fosfato deshidrogenasa hacia el complejo III [101]. A través del bloqueo del complejo III con Antimicina A, se puede sugerir que esta

vía podría estar contribuyendo a mantener una respiración parcialmente funcional (**Fig. 12**). Sin embargo, faltan experimentos que puedan determinar con certeza el rol de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en el metabolismo mitocondrial bajo inhibición de la actividad aKGDHc.

Cabe destacar que existieron marcadas diferencias en ciertos parámetros bioenergéticos entre ambas líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, como por ejemplo en los niveles de OGDH (**Fig. 2**), ATP intracelular (**Fig. 6**) y de los complejos OXPHOS (**Fig. 10**). La línea celular A549 ya había sido descrita anteriormente por Allen et al. 2016 [98] como una línea celular con un alto nivel de dependencia a la ablación de OGDH, el cual contribuye al metabolismo del ciclo TCA y es necesaria para el crecimiento de las células A549 *in vitro* e *in vivo*. No existe un reporte tal para NCI-H1975. Sin embargo, la diferencia entre ambas líneas celulares radica en las mutaciones que éstas poseen. La línea celular NCI-H1975 posee mutaciones en los genes *EGFR*, *CDKN2A*, *PIK3CA* y *TP53* [95], mientras que la línea celular A549 tiene mutaciones en los genes *CDKN2A*, *KRAS* y *LKB1* [96], y no presenta mutaciones en los genes *EGFR*, *PIK3CA*, *TP53* [97]. La utilización de estas líneas celulares radica en la representación de la heterogeneidad genética que existe dentro del adenocarcinoma, el tipo de cáncer de pulmón más común [116].

p53 es la proteína “guardiana del genoma”, que al exportarse al núcleo interactúa con ciertas proteínas vinculadas al control del ciclo celular. A su vez, p53 se exporta a la mitocondria e interactúa con proteínas BH3 de tipo anti y pro-apoptóticas [117]. Actualmente se conoce que en aquellas líneas celulares que poseen p53 mutada, se pierde el control del ciclo celular. Sin embargo, la interacción con la mitocondria perdura, favoreciendo la liberación de citocromo c y, por consiguiente, formando el apoptosoma que desencadena la apoptosis [117]. Sin embargo, la mutación activante de RAS, KRAS, podría ser definitiva en términos metabólicos entre las líneas celulares. Esta mutación genera un

desacoplamiento entre la glicólisis y la glutaminólisis que vuelve a las líneas celulares con KRAS, como la línea celular A549, dependientes a la glutamina [118]. Dado que la OGDH es el cuello de botella donde termina la glutaminólisis, debiese existir cierta dependencia a esta enzima.

Por otro lado, la proliferación descontrolada es una de las características fundamentales de las células cancerosas [3]. En este proceso, la célula cancerosa debe replicar su material genético [103]. En la fase G1 del ciclo celular aumenta la expresión de las proteínas involucradas en el proceso de replicación del ADN, a llevarse a cabo en la fase S [105]. Entre esas proteínas se encuentra PCNA, la cual es esencial en los procesos de regulación del ciclo celular y la replicación del ADN. Como se puede apreciar en este trabajo, el compuesto GA-TPP⁺C₁₀ disminuye los niveles proteicos de PCNA, de manera dependiente de AMPK (**Fig. 14**), como lo señalaron anteriormente Mi et al., 2019 [119]; lo cual detiene el ciclo celular en G1. Presumiblemente, la detención del ciclo en G1 se produce por una disminución en la inhibición que genera PCNA sobre p21, el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina [103].

Por otra parte, la estabilización fisiológica o mimética de HIF1- α , puede generar adaptaciones en el flujo de carbonos en el ciclo TCA [38, 39]. En este escenario, cobra relevancia la carboxilación reductiva y en específico la enzima OGDH, la cual es el cuello de botella tanto de la vía oxidativa como reductiva del ciclo TCA, brindando el NADH necesario para mantener la respiración mitocondrial y síntesis de precursores requeridos para la proliferación celular [34]. Por lo tanto, utilizando CoCl₂, un inhibidor de PHD, para estabilizar HIF1- α , se evaluaron los niveles de OGDH, la formación de colonias, migración y resistencia a doxorrubicina en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Se observó que todas estas características de malignidad se vieron aumentadas con la estabilización de HIF1- α . En forma contraria, el tratamiento con GA-TPP⁺C₁₀ disminuyó la

formación de colonias (**Fig. 13**), la migración celular (**Fig. 15**), la resistencia a la doxorubicina inducida por el mimético de hipoxia (**Fig. 17**) y la disminución de los niveles proteicos tanto de OGDH como de HIF1- α , mediante la degradación proteosomal (**Fig. 2**).

Con respecto a la disminución de HIF1- α inducida por el compuesto, estudios señalan que la acumulación del sustrato de la PHD, α KG, ha mostrado aumentar la afinidad de la PHD por el O₂ y de esa manera, promover la hidroxilación y degradación de HIF1- α , a pesar de encontrarse estabilizado [120]. A su vez, la inhibición del complejo I mitocondrial, al igual que una deficiencia en la NNT, ambas llevarían a una acumulación de NADH y consecuentemente, a un aumento en α KG, disminuyendo además la tasa del ciclo TCA [121, 122]. Sin embargo, nuestros resultados señalan que al igual que la OGDH, GA-TPP+C₁₀ también induce la degradación vía proteosomal de HIF1- α (**Fig. 3**).

Además, considerando que en la actualidad se conoce que la hipoxia altera el metabolismo de la glutamina [58], en esta tesis se observó que en la condición basal con HIF1- α estabilizado, había una tendencia en las células A549 que indicaban una inhibición en la actividad enzimática del α KGDHc. Este resultado sugeriría lo anteriormente reportado por Sun et al., 2014 [58], quienes señalan que la estabilización de HIF1- α mediante hipoxia fisiológica induce la inhibición de la actividad enzimática del α KGDHc, a través de la ubiquitinación y proteólisis de la variante de empalme de 48 kDa de la subunidad E1 OGDH2, mediante la activación de la E3 ubiquitina ligasa, SIAH2. Tomando en consideración esto, en nuestro estudio aún queda por establecer si el efecto de GA-TPP+C₁₀ produce cambios en expresión génica y abundancia proteica de las isoformas de OGDH.

Por otra parte, a través del tratamiento previo con un precursor permeable de succinato, metil-succinato, se pudo observar la reversión del efecto inhibitorio en la migración celular en la línea A549, en condiciones miméticas a hipoxia (**Fig. 16F**). El

complejo succinato deshidrogenasa (SDH) cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo TCA y mantiene el transporte de electrones funcional a través de la ubiquinona de la CTE [123]. A su vez, reportes han destacado el rol de metabolitos como el succinato en la inhibición de las prolil hidroxilasas responsables de la degradación proteosomal de HIF1- α , y su consecuente acumulación [124]. Mediante esta adición al medio celular, las células A549 en condiciones miméticas a hipoxia pudieron mantener un ciclo TCA y OXPHOS funcional, que brindaron la energía necesaria para sustentar la migración celular.

En síntesis, los datos obtenidos en esta tesis sugieren fuertemente que OGDH es el blanco de GA-TPP+C₁₀. A su vez, la activación de AMPK inducida por el compuesto puede inducir la degradación vía proteosomal de OGDH, siendo uno de los pasos primarios para inducir disfunción mitocondrial, en el cual radica su efecto antitumoral.

8. Resumen de resultados y conclusión

El compuesto GA-TPP+C₁₀ inhibe el α KGDHc en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón con HIF1- α estabilizado. Esta inhibición es provocada por la inducción de la degradación vía proteosomal de la subunidad E1 OGDH dependiente de AMPK.

En conjunto a la inhibición del α KGDHc producida por GA-TPP+C₁₀, se desencadena una disfunción mitocondrial caracterizada por la alteración de una serie de parámetros bioenergéticos que provocan el efecto antitumoral citostático en las líneas celulares de cáncer de pulmón. Ante este estrés celular, se desencadena un cambio metabólico desde la OXPHOS hacia la glicólisis, dependiente de AMPK. A través de este mecanismo de adaptación, las células cancerosas mantienen parcialmente funcional la respiración mitocondrial, con el cual apoyan la supervivencia celular (**Ilustración 3**).

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman el efecto inhibitorio de GA-TPP+C₁₀ sobre la formación de colonias, migración celular y resistencia a quimioterápicos en condiciones miméticas a hipoxia. En base a lo anterior, es fundamental que el estudio de este compuesto sobre células cancerosas en un microambiente tumoral hipóxico prosiga en estudio, con el fin de comprobar su efecto sobre esta población. Además de comprobar su efecto en estudios *in vivo*, evaluando así su utilización como un posible tratamiento para el cáncer de pulmón.

A su vez, que GA-TPP+C₁₀ sea el primer compuesto en estudio que induzca la degradación de OGDH, amerita que pueda seguir siendo estudiado para comprender a cabalidad esta enzima y el complejo enzimático del cual forma parte.

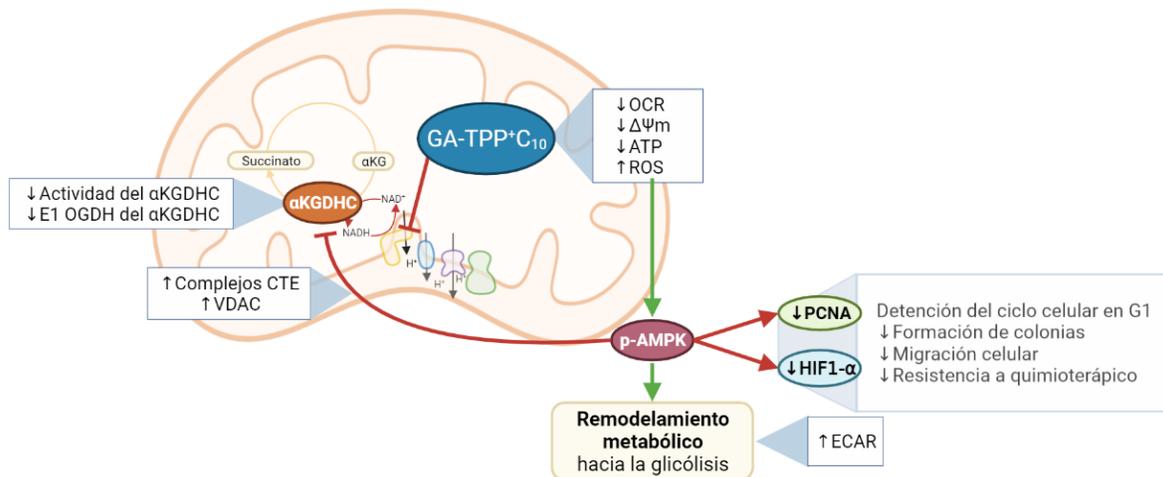


Ilustración 3. Mecanismo de acción propuesto para GA-TPP+C₁₀. El compuesto GA-TPP+C₁₀ inhibe el αKGDHC, mediante la degradación proteosómica de OGDH dependiente de AMPK. A su vez, el compuesto induce la alteración de una serie de parámetros bioenergéticos, tal como la disminución del OCR, caída de ΔΨ_m y los niveles de ATP intracelular y un aumento de ROS. El estrés metabólico inducido por el compuesto provoca la activación de AMPK, que genera una respuesta adaptativa dependiente de esta quinasa, tal como un aumento de la vía glicolítica y aumento de proteínas mitocondriales de membrana. Además, el estrés metabólico desencadenado por GA-TPP+C₁₀ disminuye los niveles de PCNA, generando la detención del ciclo celular en G1, disminuye los niveles de HIF1-α en la condición mimética a hipoxia y características de malignidad que se encuentran aumentadas en esta condición, tales como la formación de colonias, migración celular y la resistencia a doxorrubicina.

9. Referencias

1. IARC, *The Global Cancer Observatory*. 2020.
2. (INE), I.N.d.E., *Anuario de Estadísticas Vitales 2019*. 2021: Morandé 801 piso 22, Santiago de Chile. p. 120.
3. Hanahan, D.W., R., *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**: p. 646-674.
4. NIH *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011*. Available online: . 2014.
5. Burotto, M., et al., *Lung Cancer in Chile*. J Thorac Oncol, 2019. **14**(9): p. 1504-1509.
6. ASCO. *Lung cancer - non-small cell: statistics*. 2019 [cited 2019 10 de septiembre]; Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-non-small-cell/>.
7. Gandalovičová, A., et al., *Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges*. Trends in Cancer, 2017. **3**(6): p. 391-406.
8. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 267-9.
9. Hayashi, Y., et al., *Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer*. Cancer Sci, 2019. **110**(5): p. 1510-1517.
10. 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.
11. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. Free Radic Res, 2010. **44**(5): p. 479-96.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Urra, F.A., et al., *Extracellular Matrix Signals as Drivers of Mitochondrial Bioenergetics and Metabolic Plasticity of Cancer Cells During Metastasis*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 751301.
18. Urra, F.A., B. Weiss-López, and R. Araya-Maturana, *Determinants of Anti-Cancer Effect of Mitochondrial Electron Transport Chain Inhibitors: Bioenergetic Profile and Metabolic Flexibility of Cancer Cells*. Curr Pharm Des, 2016. **22**(39): p. 5998-6008.
19. Urra, F.A., et al., *Extracellular Matrix Signals as Drivers of Mitochondrial Bioenergetics and Metabolic Plasticity of Cancer Cells During Metastasis*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021. **9**.
20. Cannino, G., Ciscato, F., Masgras, I., Sánchez-Martín, C., Rasola, A., *Metabolic Plasticity of Tumor Cell Mitochondria*. Front. Oncol., 2018. **8**: p. 333.
21. Vyas, S., Zaganjor, E., Haigis, M.C., *Mitochondria and Cancer*. Cell, 2016. **28**(3): p. 555-566.
22. Cai, Z., et al., *Phosphorylation of PDHA by AMPK Drives TCA Cycle to Promote Cancer Metastasis*. Mol Cell, 2020. **80**(2): p. 263-278.e7.
23. Saito, Y., et al., *AMPK Protects Leukemia-Initiating Cells in Myeloid Leukemias from Metabolic Stress in the Bone Marrow*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(5): p. 585-96.

24. Jeon, S.M., N.S. Chandel, and N. Hay, *AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress*. *Nature*, 2012. **485**(7400): p. 661-5.
25. Kishton, R.J., et al., *AMPK Is Essential to Balance Glycolysis and Mitochondrial Metabolism to Control T-ALL Cell Stress and Survival*. *Cell Metab*, 2016. **23**(4): p. 649-62.
26. Yang, L., et al., *Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer*. *Mol Syst Biol*, 2014. **10**(5): p. 728.
27. Fiorillo, M., et al., *Bedaquiline, an FDA-approved drug, inhibits mitochondrial ATP production and metastasis in vivo, by targeting the gamma subunit (ATP5F1C) of the ATP synthase*. *Cell Death & Differentiation*, 2021. **28**(9): p. 2797-2817.
28. LeBleu, V.S., et al., *PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis*. *Nat Cell Biol*, 2014. **16**(10): p. 992-1003, 1-15.
29. Bajzikova, M., Kovarova, J., Coelho, A. R., Boukalova, S., Oh, S., Rohlenova, K., . . . Neuzil, J. , *Reactivation of Dihydroorotate Dehydrogenase-Driven Pyrimidine Biosynthesis Restores Tumor Growth of Respiration-Deficient Cancer Cells*. . *Cell Metab.*, 2018.
30. LeBleu, V.S., O'Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., . . . Kalluri, R., *PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis*. . *Nat Cell Biol.*, 2014. **16**(10): p. 1001-1015. .
31. Viale, A., et al., *Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function*. *Nature*, 2014. **514**(7524): p. 628-32.
32. Kim, D.-H. and D. Wirtz, *Recapitulating cancer cell invasion in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. **108**(17): p. 6693.
33. Caneba, C.A., et al., *Pyruvate uptake is increased in highly invasive ovarian cancer cells under anoikis conditions for anaplerosis, mitochondrial function, and migration*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **303**(8): p. E1036-52.
34. Sullivan, Lucas B., et al., *Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells*. *Cell*, 2015. **162**(3): p. 552-563.
35. Birsoy, K., Wang, T., Chen, WW., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., Sabatini, DM., *An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis*. *Cell*, 2015. **30**(3): p. 540-51.
36. Van Vranken, J.G. and J. Rutter, *You Down With ETC? Yeah, You Know D!* *Cell*, 2015. **162**(3): p. 471-3.
37. Holleran, A.L., et al., *Glutamine metabolism in AS-30D hepatoma cells. Evidence for its conversion into lipids via reductive carboxylation*. *Mol Cell Biochem*, 1995. **152**(2): p. 95-101.
38. Metallo, C.M., et al., *Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia*. *Nature*, 2011. **481**(7381): p. 380-4.
39. Wise, D.R., et al., *Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(49): p. 19611-6.
40. Mullen, A.R., et al., *Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria*. *Nature*, 2011. **481**(7381): p. 385-8.
41. Gameiro, P.A., et al., *In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation*. *Cell Metab*, 2013. **17**(3): p. 372-85.
42. Elia, I., G. Doglioni, and S.M. Fendt, *Metabolic Hallmarks of Metastasis Formation*. *Trends Cell Biol*, 2018. **28**(8): p. 673-684.
43. Burr, S.P., et al., *Mitochondrial Protein Lipoylation and the 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex Controls HIF1 α Stability in Aerobic Conditions*. *Cell Metab*, 2016. **24**(5): p. 740-752.

44. Cardenas, C., et al., *Cancer cells with defective oxidative phosphorylation require endoplasmic reticulum-to-mitochondria Ca(2+) transfer for survival*. *Sci Signal*, 2020. **13**(640).
45. Al Tameemi W, D.T., Al-Jumaily RMKh, Forsyth NR, *Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism*. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019. **7**: p. 4.
46. Hall, E.J., and Giaccia, A. J. (2006). , *Radiobiology for the Radiologist.*, ed. L.W. Wilkins. 2006, Philadelphia, PA.
47. Vaupel, T., Hoeckel, *Treatment resistance of solid tumors*. *Med. Oncol.* , 2001. **18**: p. 243–259.
48. Harrison, V., *Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response*. . *Oncologist*, 2004. **9**: p. 4-9.
49. Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., and Jain, R. K., *Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation*. . *Nat. Med.*, 1997. **3**: p. 177–182.
50. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. *Oncogene*, 2010. **29**(5): p. 625-634.
51. Höckel, M., and Vaupel, P., *Biological consequences of tumor hypoxia*. . *Semin. Oncol.* , 2001. **38**: p. 36-41.
52. Kaelin, W.G., *Proline hydroxylation and gene expression*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 115-28.
53. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. *Nature*, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
54. Mahon, P.C., K. Hirota, and G.L. Semenza, *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity*. *Genes Dev*, 2001. **15**(20): p. 2675-86.
55. Rankin, E.B. and A.J. Giaccia, *Hypoxic control of metastasis*. *Science*, 2016. **352**(6282): p. 175-80.
56. Zhang, H., et al., *HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(5): p. 407-20.
57. van Gisbergen, M.W., et al., *Mitochondrial Dysfunction Inhibits Hypoxia-Induced HIF-1α Stabilization and Expression of Its Downstream Targets*. *Frontiers in oncology*, 2020. **10**: p. 770-770.
58. Sun, R.C. and N.C. Denko, *Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth*. *Cell Metab*, 2014. **19**(2): p. 285-92.
59. Harris, A.L., *Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth*. *Nature Reviews Cancer*, 2002. **2**(1): p. 38-47.
60. Damaghi, M., J. Wojtkowiak, and R. Gillies, *pH sensing and regulation in cancer*. *Frontiers in Physiology*, 2013. **4**(370).
61. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
62. Walenta, S. and W.F. Mueller-Klieser, *Lactate: mirror and motor of tumor malignancy*. *Seminars in Radiation Oncology*, 2004. **14**(3): p. 267-274.
63. Blatt, S., et al., *Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years*. *Clinical Oral Investigations*, 2016. **20**(8): p. 2097-2104.

64. Anderson, N., Mucka, P., Kern, J.G. & Feng, H., *The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism*. Protein Cell, 2018. **9**: p. 216–237.
65. Atlante, S., et al., *α -ketoglutarate dehydrogenase inhibition counteracts breast cancer-associated lung metastasis*. Cell Death and Disease 2018. **9**: p. 756.
66. DeBerardinis, R.J.e.a., *Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis*. . Proc. Natl Acad. Sci. USA., 2007. **104**: p. 19345–19350.
67. Morin, A., Letouze, E., Gimenez-Roqueplo, A. P. & Favier, J., *Oncometabolites driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy*. Int. J. Cancer., 2014. **135**: p. 2237–2248.
68. Vatrinet, R., Leone, G., De Luise, M., Girolimetti, G., Vidone, M., Gasparre, G., Porcelli, A.M., *The α -ketoglutarate dehydrogenase complex in cancer metabolic plasticity*. Cancer Metab., 2017. **2**: p. 3.
69. Patel, M.S. and R.A. Harris, *Mammalian α -keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects*. Faseb j, 1995. **9**(12): p. 1164-72.
70. Mullen, A.R., Hu, Z., Shi, X., Jiang, L., Boroughs, L.K., et al., *Oxidation of Alpha-Ketoglutarate Is Required for Reductive Carboxylation in Cancer Cells with Mitochondrial Defects*. Cell Rep., 2014. **7**: p. 1679-1690.
71. Allen, E.L., Ulanet, D.B., Pirman, D., Mahoney, C.E., Coco, J., Si, Y., Chen, Y., et al., *Differential Aspartate Usage Identifies a Subset of Cancer Cells Particularly Dependent on OGDH*. Cell Rep., 2016. **11**(3): p. 876-890.
72. Vander Heiden, M.G.D., R. J. , *Understanding the intersections between metabolism and cancer biology*. Cell, 2017. **168**: p. 657–669.
73. Bunik, V., Mkrtychyan G, Grabarska A, Oppermann H, Daloso D, Araujo WL, Juszcak M, Rzeski W, Bettendorff L, Fernie AR, et al., *Inhibition of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase impairs viability of cancer cells in a cell-specific metabolism-dependent manner*. Oncotarget., 2016. **7**(18): p. 26400-21.
74. Solmonson, A. and R.J. DeBerardinis, *Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation*. J Biol Chem, 2018. **293**(20): p. 7522-7530.
75. Córdova-Delgado, M., et al., *FRI-1 Is an Anti-Cancer Isoquinolinequinone That Inhibits the Mitochondrial Bioenergetics and Blocks Metabolic Shifts by Redox Disruption in Breast Cancer Cells*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(10).
76. Gao, L., et al., *CPI-613 rewires lipid metabolism to enhance pancreatic cancer apoptosis via the AMPK-ACC signaling*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2020. **39**(1): p. 73.
77. Vasan, K., M. Werner, and N.S. Chandel, *Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy*. Cell Metab, 2020. **32**(3): p. 341-352.
78. Battogtokh, G., Cho, YY., Lee, JY., Lee, HS., Kang, HC., *Mitochondrial-Targeting Anticancer Agent Conjugates and Nanocarrier Systems for Cancer Treatment*. Front Pharmacol., 2018. **9**: p. 922.
79. Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Lopez, M., Joseph, J., Zielonka, J., Dwinell, MB., *A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds*. Redox Biol., 2018. **14**: p. 316-327.
80. Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., Kalyanaraman, B., *Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications*. Chem Rev., 2017. **117**: p. 10043-10120.

81. Ross, M.F., et al., *Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology*. *Biochemistry (Mosc)*, 2005. **70**(2): p. 222-30.
82. Fulda, S., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Targeting mitochondria for cancer therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(6): p. 447-64.
83. Boukalova, S., et al., *Mitocans: Mitochondrially Targeted Anti-cancer Drugs*. 2018: p. 613-635.
84. Modica-Napolitano, J.S. and J.R. Aprile, *Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells*. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2001. **49**((1-2)): p. 63-70.
85. Jara, J.A., Castro-Castillo, V., Saavedra-Olavarria, J., Peredo, L., Pavanni, M., Jana, F., . . . Ferreira, J., *Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice*. *J Med Chem.*, 2014. **57**: p. 2440-2454.
86. Sandoval-Acuña, C., Fuentes-Retamal, S., *Destabilization of mitochondrial functions as a target against breast cancer progression: Role of TPP+-linked-polyhydroxybenzoates*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2016. **309**: p. 2-14.
87. Peredo-Silva, L., Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Pavani, M., Maya, J. D., Castro-Castillo, V., . . . Ferreira, J., *Derivatives of alkyl gallate triphenylphosphonium exhibit antitumor activity in a syngeneic murine model of mammary adenocarcinoma*. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 2017. **329**: p. 334-346.
88. Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Peredo-Silva, L., . . . , Kemmerling, U., Urra, F.A., Ferreira, J., *Complex Mitochondrial Dysfunction by TPP+- Gentisic Acid and Mitochondrial Translation Inhibition by Doxycycline Evokes Synergistic Lethality in Breast Cancer Cells*. *Front Oncol.*, 2019.
89. Juurlink, B.H.J., et al., *Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system*. *Nutrition Journal*, 2014. **13**(1): p. 63.
90. Bigler, J., et al., *CYP2C9 and UGT1A6 genotypes modulate the protective effect of aspirin on colon adenoma risk*. *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3566-9.
91. 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.
92. 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.
93. Urra F.A., F.-R.S., Palominos C., Araya-Maturana R. , *Recent advances in molecular mechanisms of anticancer natural products that target mitochondrial bioenergetics.*, in *Studies in Natural Products Chemistry*. 2021, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. p. 1–41.
94. Kim, J.E. and H.C. Choi, *Losartan Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation through Activation of AMP-Activated Protein Kinase*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2010. **14**(5): p. 299-304.
95. Nelson, A., et al. *P3.03-016 Morphometric Genotyping Identifies Lung Cancer Cells Harboring Target Mutations*. *Journal of Thoracic Oncology* 2017 [cited 12; p. S2278-S2279.].
96. 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.
97. Korrodi-Gregório, 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.

98. Allen, E.L., et al., *Differential Aspartate Usage Identifies a Subset of Cancer Cells Particularly Dependent on OGDH*. Cell Rep, 2016. **17**(3): p. 876-890.
99. Li, Q.F., et al., *Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 α expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1 α* . Cell Research, 2006. **16**(6): p. 548-558.
100. Chaube, B., et al., *AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis*. Cell Death Discovery, 2015. **1**(1): p. 15063.
101. Mráček, T., Z. Drahota, and J. Houštěk, *The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2013. **1827**(3): p. 401-410.
102. Adeshakin, F.O., et al., *Mechanisms for Modulating Anoikis Resistance in Cancer and the Relevance of Metabolic Reprogramming*. Frontiers in Oncology, 2021. **11**.
103. Strzalka, W. and A. Ziemienowicz, *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation*. Annals of Botany, 2010. **107**(7): p. 1127-1140.
104. Smith, S.J., et al., *Molecular Targeting of Cancer-Associated PCNA Interactions in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Using a Cell-Penetrating Peptide*. Molecular Therapy - Oncolytics, 2020. **17**: p. 250-256.
105. Wang, L., et al., *Proliferating cell nuclear antigen promotes cell proliferation and tumorigenesis by up-regulating STAT3 in non-small cell lung cancer*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018. **104**: p. 595-602.
106. Paul, C.D., P. Mistriotis, and K. Konstantopoulos, *Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces*. Nature Reviews Cancer, 2017. **17**(2): p. 131-140.
107. Barrak, N.H., M.A. Khajah, and Y.A. Luqmani, *Hypoxic environment may enhance migration/penetration of endocrine resistant MCF7- derived breast cancer cells through monolayers of other non-invasive cancer cells in vitro*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 1127.
108. Yan, Y., et al., *Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6137.
109. Vasan, N., J. Baselga, and D.M. Hyman, *A view on drug resistance in cancer*. Nature, 2019. **575**(7782): p. 299-309.
110. Zhang, X., De Milito, A., Demiroglu-Zergeroglu, A., Gulbo, J., D'Arcy, P. & Linder, S., *Eradicating Quiescent Tumor Cells by Targeting Mitochondrial Bioenergetics*. Trends in Cancer, 2016. **2**: p. 657-663.
111. Cao, Y., et al., *Tumor cells upregulate normoxic HIF-1 α in response to doxorubicin*. Cancer Res, 2013. **73**(20): p. 6230-42.
112. Scarpulla, R.C., *Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network*. (0006-3002 (Print)).
113. Birsoy, K., et al., *Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides*. Nature, 2014. **508**(7494): p. 108-12.
114. Lehuédé, C., et al., *Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis*. Cancer Res, 2016. **76**(18): p. 5201-8.
115. McCann, C. and E.M. Kerr, *Metabolic Reprogramming: A Friend or Foe to Cancer Therapy?* Cancers (Basel), 2021. **13**(13).
116. 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.
117. Schuler, M., et al., *p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 7337-42.

118. Gaglio, D., et al., *Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth*. Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 523.
119. Mi, L., et al., *ACSS2/AMPK/PCNA pathway-driven proliferation and chemoresistance of esophageal squamous carcinoma cells under nutrient stress*. Mol Med Rep, 2019. **20**(6): p. 5286-5296.
120. Pan, Y., et al., *Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 912-25.
121. Ho, H.Y., et al., *Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) deficiency dysregulates mitochondrial retrograde signaling and impedes proliferation*. Redox Biol, 2017. **12**: p. 916-928.
122. Iommarini, L., et al., *Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(6): p. 1453-66.
123. Rustin, P., A. Munnich, and A. Rötig, *Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme*. Eur J Hum Genet, 2002. **10**(5): p. 289-91.
124. Selak, M.A., et al., *Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase*. Cancer Cell, 2005. **7**(1): p. 77-85.