

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico**

**“Evaluación del efecto de CPI-613, un inhibidor de α KGDH, sobre el
metabolismo mitocondrial, viabilidad, sensibilidad a etopósido y migración en
células de cáncer de mama triple negativo con carboxilación reductiva”**

Fernanda Belén Soriano Toro

Tutor: Félix A. Urra

Laboratorio de Plasticidad Metabólica y Bioenergética

Programa de Farmacología Clínica y Molecular

ICBM

24 de Julio, 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico**

**“Evaluación del efecto de CPI-613, un inhibidor de α KGDH, sobre el
metabolismo mitocondrial, viabilidad, sensibilidad a etopósido y migración en
células de cáncer de mama triple negativo con carboxilación reductiva”**

Fernanda Belén Soriano Toro

Tutor: Félix A. Urra

Una firma manuscrita en tinta negra que parece decir 'Felix Urra'.

Laboratorio de Plasticidad Metabólica y Bioenergética

Programa de Farmacología Clínica y Molecular

ICBM

24 de Julio, 2023

Santiago, 18 de octubre de 2023

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La **Srta. Fernanda Belén Soriano Toro**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Evaluación del efecto de CPI-613, un inhibidor de PDH y α KGDH, sobre el metabolismo y viabilidad de células de cáncer de mama triple negativo con carboxilación reductiva”**, dirigida por el **Dr. Félix Urra**, académico del Laboratorio de Plasticidad Metabólica y Bioenergética del Programa de Farmacología Clínica y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Este trabajo fue revisado por la comisión integrada por: **Dr. Luis Toro** académico del Departamento de Medicina Interna Norte de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y el **Dr. Ramiro Araya**, académico de la Universidad de Talca.

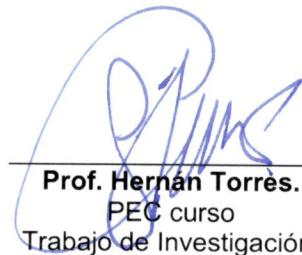
La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Dr. Luis Toro	6.91	25%
Corrector 2 Dr. Ramiro Araya	7.00	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	6.90	25%
Nota final tesis profesional	6.95	

En consecuencia la estudiante **Fernanda Belén Soriano Toro** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Prof. Marioly Müller
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



Prof. Hernán Torres.
PEC curso
Trabajo de Investigación

Para Teo

Estoy muy agradecida por la guía que me brindó el profesor Félix Urra durante todo este interesante y muchas veces, estresante proceso, por la confianza que depositó en mí y su siempre buena disposición para crear espacios donde conversar largamente sobre los resultados, su interpretación y proyecciones futuras de todo ello.

Agradezco a todo el equipo del Laboratorio de Plasticidad Metabólica y Bioenergética, en especial a Christopher Chavez, Yarela Herrera, Francisco Guajardo y Sebastián Fuentes por su disposición, apoyo, confianza, compañía y conversaciones que hicieron muy enriquecedora mi experiencia.

Agradezco a mi familia por su apoyo desde la distancia, preocupación y confianza en mis capacidades, ir a verlos y desconectarme de la realidad santiaguina me ayudó varias tardes a avanzar en mi investigación. Gracias Teo por acompañarme durmiendo y soñando cosas de perritos.

Por supuesto, también agradezco profundamente a mis amigos; Faby y Feli, por su compañía y por los momentos de distensión que creamos con la moderación justa porque la fecha de entrega estaba cerca. A Mario, gracias por compartir sus espacios conmigo e interesarse por mi tema de tesis, tus preguntas, comentarios y sugerencias me ayudaron mucho, y gracias a Lequi, por estar y existir junto a mí.

Todo el desarrollo de esta tesis fue posible gracias al financiamiento del proyecto de FONDECYT de iniciación Nro 11201322 y al proyecto interno de la Universidad de Chile Nro UI-024/20

ÍNDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Epidemiología del cáncer de mama triple negativo.	7
1.2. Carboxilación reductiva (CR) y el rol de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa.	10
1.3. CPI-613: una nueva molécula inhibidora de PDH y α KGDH con un potencial inexplorado en cáncer de mama triple negativo.	11
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVO GENERAL	13
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1. Cultivos celulares	15
5.2. Reactivos y compuestos en estudio	15
5.3. Modelo de carboxilación reductiva mediante estrategia farmacológica	15
5.4. Modelo de carboxilación reductiva mediante estrategia genética (p0)	16
5.5. Evaluación de respiración celular y tasa de acidificación extracelular en tiempo real	16
5.6. Generación de curva dosis-respuesta de antimicina A y rotenona	17
5.7. Western blot	17
5.7.1. Purificación de proteínas	17
5.7.2. Separación de proteínas	18
5.8. Determinación de potencial de transmembrana mitocondrial	18
5.9. Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)	19
5.10. Ensayo de migración celular	19
5.11. Evaluación de sensibilidad a quimioterapéuticos convencionales	20
5.12. Análisis estadístico	20
6. RESULTADOS	21
6.1. Definición de los modelos de carboxilación reductiva.	21
6.2. Cambios diferenciales en el consumo de oxígeno de sublíneas MDA-MB-231 con carboxilación reductiva.	22
6.3. Cambios diferenciales en la acidificación extracelular de sublíneas MDA-MB-231 con carboxilación reductiva.	25
6.4. Cuantificación de los niveles proteicos de α -cetoglutarato deshidrogenasa y proteínas de la cadena transportadora de electrones.	28
6.5. Medición de potencial de transmembrana mitocondrial y especies reactivas de oxígeno (ROS)	29
6.6. CPI-613 sensibiliza las células con RC y determina la respuesta a etopósido.	32
6.7. Efecto de CPI-13 sobre la capacidad migratoria de células MDA-MB-231 con respiración funcional y bajo carboxilación reductiva	33
7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIÓN	39

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Las células de cáncer de mama triple negativo (TNBC, del inglés, *triple negative breast cancer*) poseen una alta plasticidad metabólica, la cual les permite satisfacer sus requerimientos metabólicos mediante el desarrollo de una vía alterna al ciclo de Krebs. Esta ruta, conocida como carboxilación reductiva (CR), es independiente de las concentraciones de oxígeno y, algunas de las enzimas que componen normalmente este ciclo, entre ellas la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDH, del inglés, *α -ketoglutarate dehydrogenase*) continúan funcionando. Esto permite a las células cancerosas adquirir los intermediarios necesarios para su proliferación y sus requerimientos energéticos son sustentados a través de la glicólisis aeróbica. En cáncer se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que por un mecanismo redox la nueva molécula CPI-613 inhibe a la enzima α KGDH, aunque esto no se ha evaluado en líneas celulares de TNBC. Debido a que esta enzima cumple un rol fundamental en el metabolismo del cáncer, especialmente bajo condiciones de carboxilación reductiva, hipotetizamos que al inhibir su actividad podría disminuir selectivamente la viabilidad de aquellas células de TNBC con carboxilación reductiva, al modificarse su metabolismo mitocondrial y de esa manera sensibilizarse en un tratamiento combinado con el quimioterapéutico etopósido. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto de CPI-613 sobre la función mitocondrial, viabilidad celular, sensibilidad a etopósido y capacidad migratoria en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, con respiración defectuosa y funcional. **METODOLOGÍA:** En placas de cultivo, se generaron dos modelos de células MDA-MB-231 (TNBC) con carboxilación reductiva mediante una estrategia farmacológica y otra genética. Posteriormente, se compararon con células de TNBC con respiración funcional, contrastando parámetros de metabolismo mitocondrial, viabilidad celular, sensibilidad a etopósido y capacidad migratoria. **RESULTADOS:** Los modelos farmacológicos y genéticos de carboxilación reductiva fueron generados y validados

exitosamente. Se evidenció una disminución de la viabilidad en células MDA-MB-231 con carboxilación reductiva, comparadas con células no tratadas, relacionada a un aumento de mROS y a una disminución del potencial de membrana. Por otro lado, tanto células con respiración funcional como con carboxilación reductiva se sensibilizan dentro del mismo rango a un tratamiento combinado con etopósido y CPI-613. Finalmente, al evaluar la capacidad migratoria diferencial en ambos modelos, no se obtuvieron resultados concluyentes.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS: Antimicina A y rotenona (0,25 - 0,5 μM) y el plásmido pMA3790, permiten la adecuada generación de modelos de carboxilación reductiva. el compuesto CPI-613 generó cambios diferenciales en células con CR en comparación con células con respiración normal en los parámetros de viabilidad, generación de especies reactivas de oxígeno y potencial de la transmembrana mitocondrial. Futuros estudios son necesarios para entender el mecanismo de acción de CPI-613 y su eficacia al conjugarse con otros quimioterápicos y en la capacidad migratoria de células de TNBC con carboxilación reductiva.

Palabras clave: cáncer de mama triple negativo, CPI-613, carboxilación reductiva, α -cetoglutarato deshidrogenasa, metabolismo del cáncer, etopósido.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del cáncer de mama triple negativo.

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más frecuente en mujeres, representando un 16% de todos los cánceres femeninos y es la principal causa de muerte por esta enfermedad en mujeres a nivel mundial. Las tasas de incidencia y de mortalidad son variables según la ubicación geográfica, grupo étnico y realidad socioeconómica, siendo más elevadas en países desarrollados que en vías de desarrollo [1].

En Chile, actualmente los datos son comparables con los de países desarrollados. Sin embargo, la ausencia de registros nacionales completos impide conocer de manera precisa su epidemiología a lo largo de nuestro país.

El cáncer de mama abarca un grupo muy heterogéneo de subtipos, existiendo dos formas de clasificación cruciales para definir diagnóstico y guiar el tratamiento: la clasificación histológica y la clasificación molecular, siendo esta última la más importante a la hora de desarrollar una terapia dirigida, donde las expresiones de los receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) y el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2, del inglés, *human epidermal growth factor receptor 2*) permiten una sub-clasificación en 4 grupos [2,3].

Dentro de la clasificación molecular se encuentra el cáncer de mama triple negativo (TNBC, del inglés, *triple negative breast-cancer*), el cual presenta la menor prevalencia en el mundo de entre todos los subtipos, representando entre un 10% y 15% de las neoplasias mamarias. Este subtipo tiende a afectar a mujeres jóvenes, siendo más prevalente en mujeres negras y/o hispanas; molecularmente se determina por la ausencia de expresión de RE y RP y por la ausencia de una expresión aumentada de HER-2. Esto se traduce en una presentación más agresiva, con desdiferenciación del tejido en células anaplásicas, con alta capacidad invasiva y potencial metastásico. Dichas características disponen un peor pronóstico con pocas opciones terapéuticas, siendo las más efectivas en CM aquellas dirigidas hacia los receptores antes mencionados, pero que en este caso no son aplicables [4].

Actualmente, la quimioterapia con agentes combinados es el tratamiento principal para TNBC, aunque presenta resultados muy heterogéneos dependientes de cada paciente y con aumentos poco representativos en la supervivencia [5, 6]. Se enfoca principalmente en disminuir la proliferación de las células cancerosas, mas no hacia las características de adaptación como cambios en el metabolismo de dichas células, cualidad que será abordada en la presente investigación.

En comparación con células normales, las células tumorales poseen una alta plasticidad metabólica que les permite adaptar sus necesidades energéticas según los requerimientos de la etapa en la que se encuentren: ya sea proliferando en la masa tumoral primaria o adaptándose para el proceso de metástasis, así como también en su capacidad de resistencia a la anoikis (muerte celular inducida por desanclaje de la matriz extracelular). Estas adaptaciones celulares están mediadas en gran medida por la bioenergética mitocondrial, conllevando a una remodelación de las vías metabólicas que implica cambios en las vías de producción de energía [7].

Estos cambios metabólicos pueden ser identificados según la composición y densidad de la matriz extracelular (ECM, del inglés, *extracellular matrix*). Normalmente esta se compone por cantidades variables de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas, los cuales tienen una conformación laxa. En contraste, una ECM asociada a tumores sufre modificaciones por metaloproteasas de matriz, que la alteran en cuanto a rigidez y porosidad, lo cual facilita la reorganización del tejido, favoreciendo así la infiltración celular y metástasis [8,9,10].

En varios tipos de cánceres, incluyendo TNBC, las células proliferantes del tumor primario que generan el volumen de la masa tumoral, obtienen energía mediante una vía diferente comparadas con células normales en el mismo proceso, siendo aquel, un evento estrechamente relacionado a las demandas metabólicas [11].

La respiración mitocondrial ocurre en la cadena transportadora de electrones y está conformada por los complejos respiratorios I, II, III y IV. Su actividad se sustenta en la disponibilidad de NADH y FADH₂ obtenidos del ciclo de Krebs (TCA, del inglés *tricarboxylic acid cycle*), moléculas que son oxidadas por los complejos I y II y cuyos electrones llegan al oxígeno como aceptor final. La energía liberada en la transferencia de electrones se utiliza para el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando así, un gradiente electroquímico acoplado a la fosforilación de ADP por ATP-sintasa. [12]

Las células cancerosas sustentan sus requerimientos energéticos mediante el aumento de la glicólisis aeróbica (conocido como efecto Warburg), con lactato como producto final. Este es un proceso independiente de la concentración de oxígeno en células tumorales. En cambio, las células normales proliferantes producen energía mayoritariamente mediante la oxidación del piruvato derivado de la glicólisis vía fosforilación oxidativa, es decir; en un proceso dependiente de oxígeno.

El TCA está compuesto por dos vías; una vía oxidativa dependiente de oxígeno y una vía reductiva e independiente de éste [13]. Entonces, las células para cumplir con los requerimientos metabólicos pueden “quebrar” el ciclo de Krebs, priorizando el desarrollo de la vía reductiva o también denominada carboxilación reductiva (CR), donde algunas enzimas continúan funcionando, entre ellas la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDH, del inglés, *α -ketoglutarate dehydrogenase*) e isocitrato deshidrogenasa (IDH). Uno de los principales objetivos de CR es la síntesis de intermediarios para la generación de ácidos nucleicos y lípidos, a partir de la metabolización de glutamina a través de la glutaminólisis. Esto permite a las células bajo CR entregar precursores biosintéticos para mantener una tasa proliferativa elevada [14].

Debido a esto, se describe que las células tumorales se vuelven independientes de la concentración de oxígeno y de la respiración mitocondrial, pero al requerir de la producción de ATP, esta se sustenta en la glucólisis aeróbica [8].

1.2. Carboxilación reductiva (CR) y el rol de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa.

La CR corresponde a un brazo del Ciclo de Krebs que involucra enzimas que no requieren disponibilidad de oxígeno para sus reacciones. Puede ser inducida por hipoxia o mediante inhibición farmacológica de la respiración mitocondrial, por ejemplo mediante inhibidores del complejo I (metformina, rotenona) y complejo III (antimicina A) [15]. También se ha descrito que ciertos tipos de cáncer esporádicos que presentan mutaciones en las enzimas mitocondriales succinato deshidrogenasa (SDH, complejo II que cataliza la conversión de succinato a fumarato) y fumarato hidratasa (FH, que cataliza la conversión de fumarato a malato en el ciclo de Krebs), exhiben una acumulación de succinato o fumarato respectivamente, manteniendo el metabolismo de carbonos mitocondrial exclusivamente vía CR dependiente de la glutaminólisis [16]. En estas condiciones, se ha descrito que los sustratos de entrada para la CR, en un reemplazo de glucosa, pueden ser glutamina y acetato.

La glutaminólisis da como resultado la producción de α -cetoglutarato (α -KG), ya sea después de la deshidrogenación del glutamato o mediante una reacción de transaminación. Posteriormente, α KGDH lo reduce formando isocitrato, el cual es procesado por IDH produciendo citrato, sustrato que es transportado hacia el citosol para contribuir a la biosíntesis de lípidos e intermediarios de ácidos nucleicos [13]. Cabe destacar, que este proceso ocurre en ausencia de la respiración mitocondrial y es altamente sensible a la concentración de calcio mitocondrial, dado que α KGDH e IDH son enzimas que requieren de calcio como cofactor para alcanzar una actividad enzimática óptima. Este calcio mitocondrial es finamente regulado por

la interacción entre el retículo endoplásmico y la mitocondria a través del receptor de IP3 (IP3R) y el uniportador de calcio mitocondrial (MCU), la cual es esencial para que células tumorales en CR puedan proliferar [17,18]

El complejo enzimático α KGDH está compuesto por tres subunidades designadas como E1, E2 y E3. La subunidad E1 corresponde a una deshidrogenasa que cataliza la descarboxilación de α -KG; es decir, realiza la conversión sustrato-producto. E2 al unirse a un residuo de lipoato, permite la función de E1 y E3, por lo que se ha descrito como una fuente importante de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mROS, del inglés, *mitochondrial reactive oxygen species*) que a su vez autorregulan la función de la enzima.

Se conoce que en cáncer, α -KGDH es fundamental para la reprogramación metabólica; controla el estado redox mitocondrial a través del equilibrio de los niveles de NADH y ROS, y dirige los flujos de metabolitos de TCA hacia vías energéticas, anabólicas y de señalización, permitiendo de esa forma la proliferación aumentada de la masa tumoral primaria [19].

1.3. CPI-613: una nueva molécula inhibidora de PDH y α KGDH con un potencial inexplorado en cáncer de mama triple negativo.

CPI-613, o en su nombre comercial Devimistat, es una nueva molécula antitumoral. Es un análogo de lipoato y por lo tanto, antagonista del ácido lipoico que actúa como un inhibidor selectivo de los complejos enzimáticos α KGDH y PDH, los cuales requieren de lipoato para mantener sus actividades enzimáticas. Aunque su mecanismo de acción no está comprendido a cabalidad, se ha descrito que realiza su efecto sobre α KGDH al unirse a la subunidad E2, provocando su inhibición mediada por el aumento de la producción de ROS desde la subunidad E3 [20]. Por otro lado, en la enzima PDH tiene un efecto regulador mediante la activación de la fosforilación sensible a lipoatos, la cual impide el flujo de carbono proveniente de la glucólisis, hacia el complejo [21]

Se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* que tiene efectos antiproliferativos e induce la muerte celular mediante apoptosis en varios modelos de células tumorales con células de hígado y plasma humano [22]. Además, ha sido probado *in vivo* en cáncer de pulmón y de páncreas de células no pequeñas en modelos de xenoinjerto con baja toxicidad de efectos secundarios [19]. Actualmente, CPI-613 se encuentra en evaluación en estudios clínicos de fase III para el tratamiento de pacientes con cáncer pancreático metastásico en combinación con el esquema antineoplásico FOLFIRINOX [23]

A pesar de lo anterior, hasta la fecha no se ha probado el efecto de CPI-613 en el metabolismo mitocondrial de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo y se desconoce si este compuesto podría sensibilizar a células de cáncer de mama triple negativo que presentan CR dependiente de la glutaminólisis.

Actualmente existe un número reducido de investigaciones sobre el metabolismo de células cancerosas de mama como un posible blanco terapéutico, pero el desarrollo de CPI-613 lo ha convertido en una opción de interés. Específicamente, en lo que respecta al cáncer de mama triple negativo, esto podría convertirse en una alternativa con mejores resultados que los tratamientos existentes.

Es por ello que este proyecto de tesis plantea como problema investigativo estudiar si los cambios en metabolismo y viabilidad que produciría CPI-613 en células de cáncer de mama triple negativo podrían ser mayores en aquellas células con respiración defectuosa y por lo tanto con CR, comparadas con aquellas con respiración mitocondrial funcional.

2. HIPÓTESIS

El compuesto CPI-613 produce mayor muerte celular en células de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 con carboxilación reductiva comparada con aquellas con respiración funcional, exhibiendo una mayor capacidad migratoria y sensibilidad a un tratamiento combinado con etopósido.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de CPI-613 sobre la función mitocondrial, viabilidad, sensibilidad a etopósido y capacidad migratoria en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, con carboxilación reductiva y con respiración funcional.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1.** Generar una sublínea celular MDA-MB-231 con carboxilación reductiva, mediante estrategias farmacológica y genética, y validarla a través de la determinación de respiración y acidificación.
- 4.2.** Evaluar y comparar el efecto de CPI-613 sobre la función mitocondrial de la línea celular MDA-MB-231 con carboxilación reductiva y respiración funcional.
- 4.3.** Evaluar y comparar el efecto de CPI-613 sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 con carboxilación reductiva y respiración funcional.
- 4.4.** Evaluar y comparar el efecto de CPI-613 sobre la sensibilidad al

quimioterápico convencional etopósido de la línea celular MDA-MB-231 con carboxilación reductiva y respiración funcional.

- 4.5.** Evaluar y comparar el efecto de CPI-613 sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 con carboxilación reductiva y respiración funcional.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivos celulares

Los cultivos celulares se generaron a partir de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, fue obtenida de ATCC (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Se cultivaron en medio DMEM High glucose (Sigma-Aldrich) suplementadas con suero bovino fetal al 10% (SFB, Thermo Fisher Scientific), antibióticos; penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 100 µg/mL (Thermo Fisher Scientific), 6 g/L de HEPES (Calbiochem), y 2 g/L de bicarbonato de sodio (MERCK), en ausencia de piruvato y fueron mantenidos a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera humidificada.

5.2. Reactivos y compuestos en estudio

Todos los reactivos se compraron a Sigma-Aldrich/Merck. El compuesto CPI-613 fue comprado a Tocris, y se resuspendió en DMSO. La solución fue alicuotada y mantenida a -20 °C hasta el momento de su uso. Para estudiar la sensibilidad a quimioterápicos convencionales, se utilizó etopósido (5 µM), el cual fue preparado de igual forma a la indicada anteriormente.

5.3. Modelo de carboxilación reductiva mediante estrategia farmacológica

El cultivo celular de células MDA-MB-231 fue tratado con antimicina A o rotenona durante 24 horas, utilizando concentraciones no citotóxicas, en medio de cultivo DMEM *high glucose* suplementado con uridina (50 µg/mL) y piruvato (1 mM), además de antibióticos y SFB al 10% (de acuerdo con lo reportado en Mullen et al. 2012), la validación de este modelo se realizó mediante la determinación no invasiva de los niveles de consumo de oxígeno y acidificación extracelular usando un Analizador de Flujo Extracelular XFe96 Seahorse (Agilent).

5.4. Modelo de carboxilación reductiva mediante estrategia genética (p0)

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6-pocillos a una densidad de 100.000 células/mL, al día siguiente se transfectaron con el plásmido pMA 3790 (Addgene #70110) que codifica para una uracil-N-glicosilasa mitocondrial (Spadafora et al. 2016), para esto fue usado Lipofectamina 3000 de acuerdo a lo previamente publicado por el laboratorio (Vivas-Ruiz et al. 2020). Luego de 72 h de transfección, fueron seleccionadas por Cell Sorting aquellas células MDA-MB-231 EGFP positivas, siendo colectadas alrededor de 2000 células positivas, las cuales posteriormente fueron sembradas en placas de cultivo en medio DMEM *high glucose* suplementado con uridina (50 µg/mL) y piruvato (1 mM). Luego de dos semanas, las colonias de células MDA-MB-231 p0 fueron crecidas en placas de 24-pocillos y la confirmación de la eliminación del ADN mitocondrial se realizó mediante la medición de los niveles de respiración mitocondrial usando un Analizador de Flujo Extracelular XFe96 Seahorse (Agilent).

5.5. Evaluación de respiración celular y tasa de acidificación extracelular en tiempo real

Se sembraron células MDA-MB-231 BC (20.000 células/pocillo) en placas multipocillo XFe 96 V3-PS y se mantuvieron durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5% con medio de cultivo que contenía glucosa más glutamina. Para el análisis de la respiración celular al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó con medio de ensayo (DMEM no tamponado sin rojo fenol y con 4 mM glutamina y 10 mM glucosa, pH 7,4) 1 hora antes del ensayo. La función mitocondrial se evaluó utilizando 1 µM oligomicina, 50 nM FCCP, 1 µM rotenona y 1 µM antimicina A. Para el análisis de la glucólisis, el medio de cultivo se reemplazó con medio de ensayo (DMEM sin tampón, sin rojo fenol y con 4 mM glutamina, pH 7,4) 1 h antes del ensayo. La glucólisis se evaluó agregando 10 mM glucosa, 1 µM oligomicina y 100 mM 2-desoxi-d-glucosa (2-DG). Las mediciones de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular

(ECAR) se realizaron con las longitudes de onda específicas de excitación y emisión de las sondas fluorescentes para oxígeno (532/650 nm) y protones (470/530 nm).

5.6. Generación de curva dosis-respuesta de antimicina A y rotenona

Para evaluar la viabilidad celular se realizó el ensayo de reducción de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich), se sembraron 1×10^4 células MDA-MB-231 por pocillo con medio DMEM suplementado con uridina, en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada, éstas fueron tratadas con 5 distintas concentraciones de antimicina A o rotenona (0 - 0,10 - 0,25 - 0,50 - 1,00 µM), a modo de obtener una curva dosis-respuesta, y células MDA-MB-231 sin tratar (grupo control). Se organizó la placa a modo de generar duplicados, y pasado ese tiempo, uno de ellos fue estimulado por 48 horas a concentración constante de CPI-613 (250 µM) (de acuerdo a lo reportado en Stuart et al. 2014).

Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 1 hora con 100 µL de MTT por cada pocillo, el que fue preparado en PBS a una concentración de 0,5 mg/mL. A continuación, los cristales de formazán se disolvieron en 50 µL de DMSO, mediante agitación en oscuridad por 10 minutos. La absorbancia se midió a 570 nm con un lector de placas de ELISA (BioRad, Hercules, CA, E.E.U.U). Con los datos obtenidos se realizaron curvas de dosis-respuesta para obtener los valores de $IC_{50} \pm DS$.

5.7. Western blot

5.7.1. Purificación de proteínas

Se purificaron las proteínas de las células MDA-MB-231, utilizando tampón RIPA 1x (Thermo Scientific, Pierce™ Ripa Buffer) enfriado en hielo y suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Cell signaling Technology). Las muestras fueron sonicadas durante 1 minuto y

centrifugadas a 12500 rpm a 4°C por 10 minutos, se reservó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas utilizando el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Pierce™), la solución fue guardada a -80°C hasta el día de la realización del gel.

5.7.2. Separación de proteínas

Se preparó un gel de poliacrilamida al 8% (gel concentrador) y al 10% (gel resolutivo) y se cargaron 70 µg de proteínas disueltas en buffer de carga. Se separaron las proteínas a 70 V por los primeros 15 minutos y, luego a 100V por 90 minutos. A continuación, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo Trans-blot Turbo (BioRad™). Se observó la efectividad de la transferencia con Rojo Ponceau, se lavaron las membranas y se dejó con un bloqueo de leche al 5% por 2 horas, a temperatura ambiente. Una vez retiradas de la solución de bloqueo, se lavaron tres veces por 10 minutos con buffer TBS-Tween 20 (1%) y se colocaron en membranas diferentes los anticuerpos primarios; OXPHOS (Total OXPHOS rodent WB, antibody cocktail, Abcam) y OGDH (OGDH (E1W8H) rabbit, Cell Signaling) y utilizando actina como control de carga (B-Actin (C4), Santa Cruz Biotechnology) incubados toda la noche a 4°C. Pasado el tiempo, se lavaron las membranas como se mencionó anteriormente y se incubaron con anticuerpos secundarios respectivos; (mouse anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, para la identificación de OGDH y m-IgGk BP-HRP, Santa Cruz Biotechnology, para identificación de OXPHOS y Actina). Nuevamente se lavaron las membranas, y se revelaron con Western HRP Substrate (Inmobilon® Forte), utilizando el equipo Li-Cor (C-Digit).

5.8. Determinación de potencial de transmembrana mitocondrial

Se utilizó el indicador fluorescente tetrametil rodamina metil éster (TMRM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) en modo *non-quenching*. Para ello, se sembraron 1x10⁵ células MDA-MB-231 por pocillo, en placas de 12 pocillos, en distintas condiciones; no tratadas, tratamiento con

rotenona o tratamiento con antimicina A (concentración previamente establecida), pasadas 24 horas, fueron estimuladas con CPI-613 (250 μ M) durante 48 horas. 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 μ L de PBS para ser analizadas mediante citometría de flujo FACS (FACSAria®III, BD Biosciences) 540_{Ex}/595_{Em} nm.

5.9. Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los niveles de ROS (superóxido) intracelular fueron determinados usando la sonda dihidroetidio (DHE, Sigma Aldrich). Se sembraron 5×10^4 células MDA-MB-231 por pocillo, en placas de 12 pocillos en distintas condiciones; no tratadas, tratamiento con rotenona o antimicina A (concentración previamente establecida). Al día siguiente, las células fueron estimuladas con CPI-613 (250 μ M) durante 48 horas. Se usó como control del vehículo DMSO y como control positivo, menadiona (25 μ M), la cual fue agregada al mismo tiempo que la sonda como previamente se describió (Schmeda-Hirsmann et al. 2022). DHE fue preparada en PBS a 5 μ M. Se incubaron las muestras por 30 minutos a 37°C. La fluorescencia de la sonda fue medida mediante citometría de flujo FACS (FACSAria®III, BD Biosciences) 510_{Ex}/580_{Em} nm.

5.10. Ensayo de migración celular

La capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 se estudió utilizando una cámara Transwell de 6,5 mm, con un tamaño de poro de 8 μ m (Corning, Corning, NY, E.E.U.U.). Se les permitió migrar durante 48 horas, bajo el estímulo de CPI-613 (250 μ M), en cultivos celulares de modelos de carboxilación reductiva farmacológica (0,5 μ M antimicina A o rotenona) y utilizando células no tratadas como grupo control. Posterior a ello, las células que migraron a través de la membrana, fueron fijadas con metanol y teñidas con cristal violeta 0,2%. Los

valores de migración corresponden a un experimento, contando 5 campos de las cuatro imágenes (x40).

5.11. Evaluación de sensibilidad a quimioterapéuticos convencionales

Las células MDA-MB-231 en el modelo de carboxilación reductiva y no tratadas (fosforilación oxidativa normal) fueron estimuladas en combinación con CPI-613 (250 μ M), con etopósido (5 μ M), durante 48 horas y el efecto sobre la viabilidad celular fue comparado con aquellas células MDA-MB-231 estimuladas solamente con etopósido (5 μ M) y las no estimuladas.

5.12. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estándar (DS) de al menos tres experimentos independientes. La comparación entre los distintos grupos experimentales versus el control se realizó mediante análisis ANOVA de una vía o dos vías, 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

En la presente investigación, se buscó comparar la función mitocondrial, viabilidad, migración y sensibilidad a quimioterápicos convencionales en células de cáncer de mama triple negativo (TNBC) MDA-MB-231 con fosforilación oxidativa normal y con carboxilación reductiva. Para ello, en primer lugar se generaron, a partir de esa línea celular, dos tipos modelos de carboxilación reductiva; uno farmacológico y otro genético.

6.1. Definición de los modelos de carboxilación reductiva.

El modelo farmacológico se generó creciendo células MDA-MB-231 en presencia de antimicina A y rotenona al menos por 48 h. En un primer momento, se midió la viabilidad celular a diferentes concentraciones de antimicina A y rotenona (Figura 1A) y el efecto al ser estimuladas por una concentración constante de CPI-613 (250 μ M) (Figura 1B).

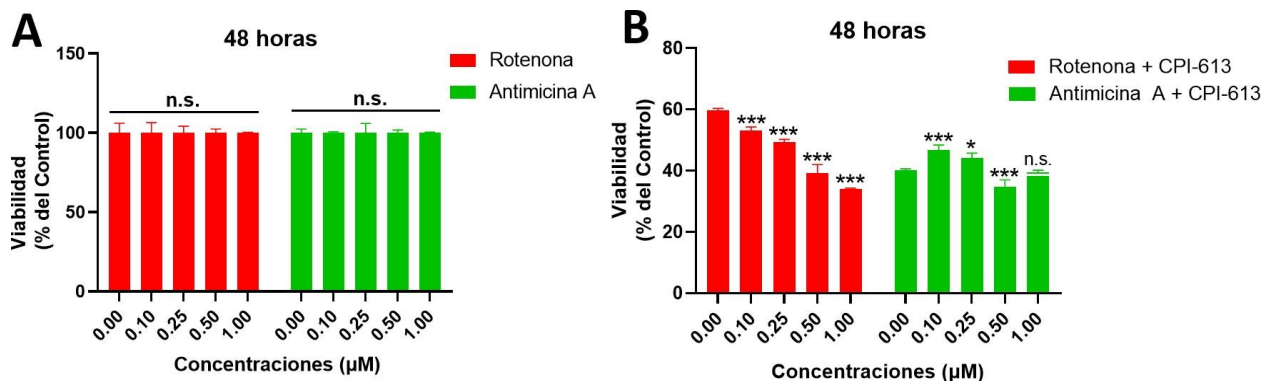


Figura 1. Viabilidad de células MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de rotenona (rojo) y antimicina A (verde) por 48 h. (A) Cultivos celulares no estimulados con CPI-613 (250 μ M), utilizados como control. **(B)** Cultivos celulares estimulados con CPI-613 (250 μ M), comparados con su respectivo control. Los datos son mostrados como promedio \pm DS. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ y n.s. no significativo con respecto al control (post-test de Tukey).

En los cultivos que no fueron estimulados con CPI-613 no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular, presentando una viabilidad cercana al 100% en comparación con el control, mientras que en los tratados con el compuesto, se observó una disminución en la viabilidad a medida que aumentaban las concentraciones de rotenona. En el caso del tratamiento previo con antimicina A, si bien la viabilidad fue menor (alcanzando el valor más bajo a 0,5 μ M), no fue un evento concentración dependiente.

A partir de estos resultados, se decidió trabajar con los modelos farmacológicos a una concentración mínima de 0,25 μ M y máxima de 0,5 μ M para ambos compuestos.

Por otro lado, el modelo genético de carboxilación reductiva se generó utilizando el plásmido pMA3790. Las células MDA-MB-231 se sembraron a una densidad de 100.000 células/mL y luego de 24 h fueron transfectadas, dejando actuar el vector durante 72 h. Posteriormente, se realizó una selección de las células que incorporaron el plásmido, a través de la identificación de la marca fluorescente de la proteína fluorescente verde mediante Cell Sorting; el resultado de ello fue la recolección de 2000 células, las que fueron sembradas en placas de cultivo con medio DMEM *high glucose* suplementado con uridina (50 μ g/mL) y piruvato (1 mM).

Ambos modelos de carboxilación reductiva fueron validados y comparados con células con respiración normal utilizando XFe96 Seahorse, a través de mediciones simultáneas en tiempo real del consumo de oxígeno y de la acidificación extracelular.

6.2. Cambios diferenciales en el consumo de oxígeno de sublíneas MDA-MB-231 con carboxilación reductiva.

Para la medición del consumo de oxígeno celular y, más aún, para entender el papel de la función mitocondrial se realizó un ensayo de mito-estrés, donde se añadieron secuencialmente oligomicina (1 μ M), inhibidor del complejo ATP sintasa. Luego, el segundo compuesto inyectado fue FCCP (0,125 μ M), el cual es un agente desacoplador de la fosforilación oxidativa

y que permitió cuantificar la respiración mitocondrial máxima. Finalmente, las células fueron expuestas a rotenona (1 μM) y antimicina A (1 μM), compuestos inhibidores de los complejos respiratorios I y III, respectivamente.

Estas mediciones permitieron construir el perfil bioenergético del consumo de oxígeno a lo largo del tiempo (Figura 2A), además de permitirnos calcular diferentes parámetros de la respiración mitocondrial, como la respiración mitocondrial basal, máxima y respiración no mitocondrial (Figura 2B, 2D, 2F).

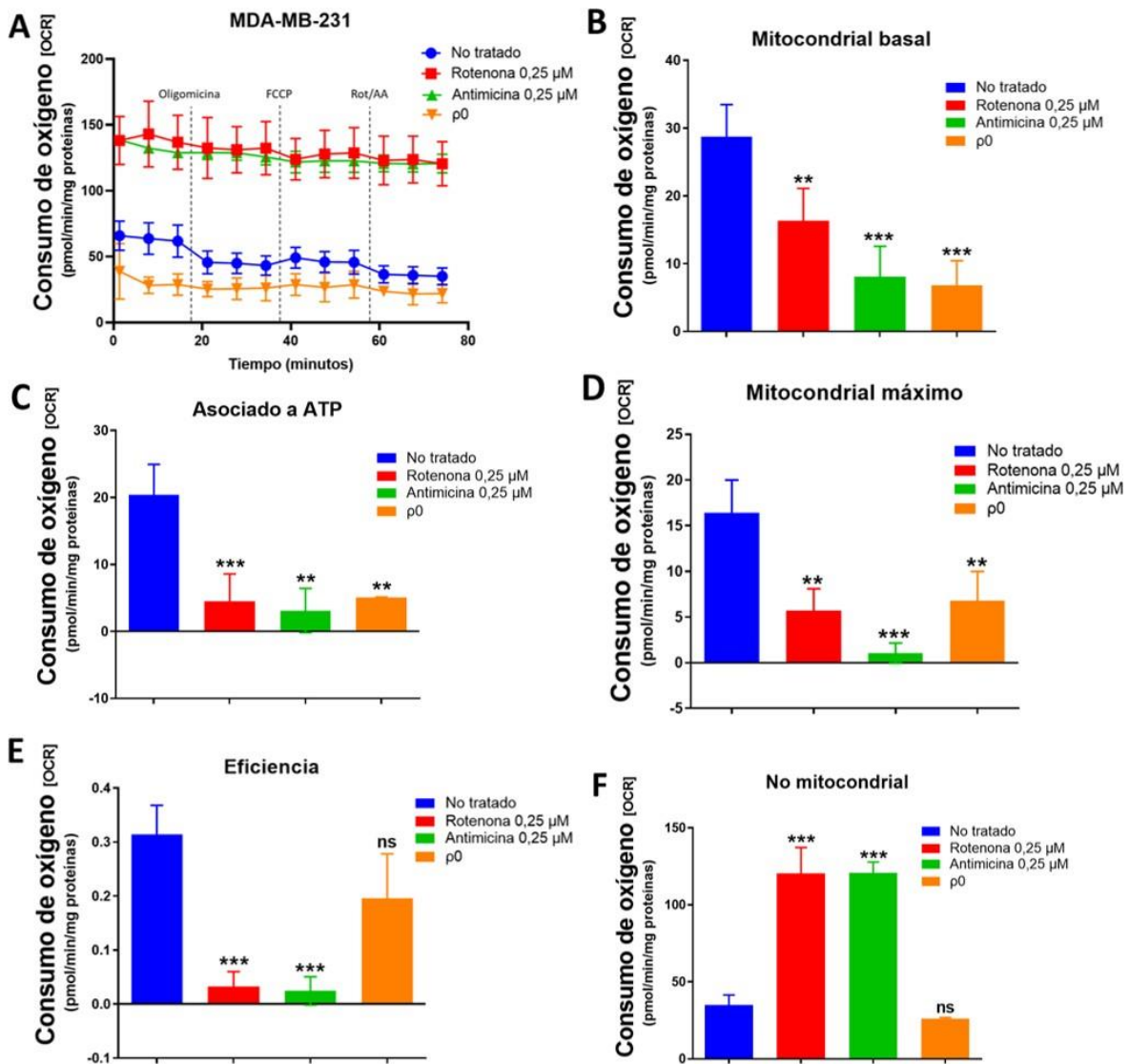


Figura 2. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) (pmol/min/mg proteínas) en tiempo real en líneas celulares MDA-MB-231. (A) Perfil bioenergético obtenido de 12 mediciones de la tasa del consumo de oxígeno (OCR) (pmol/min/mg proteínas) ante el estímulo secuencial de oligomicina (1 μ M), FCCP (0,125 μ M) y antimicina A (1 μ M)/rotenona (1 μ M). **(B)** Niveles de consumo de oxígeno basales, es decir, respiración basal mitocondrial. **(C)** Niveles de consumo de oxígeno de respiración mitocondrial asociados a ATP. **(D)** Niveles de consumo de oxígeno máximo, es decir, respiración máxima mitocondrial. **(E)** Niveles de consumo de oxígeno eficiente para la respiración mitocondrial. **(F)** Niveles de consumo de oxígeno no mitocondrial. En azul; células MDA-MB-231 no tratadas (grupo control), en rojo y verde; sublíneas MDA-MB-231 de los modelos farmacológicos de carboxilación reductiva inducida por antimicina A (0,25 μ M) o rotenona (0,25 μ M), respectivamente y en naranja; sublínea MDA-MB-231 del modelo genético de carboxilación reductiva (Rho-0). Los valores son expresados como promedio \pm SD, N=3, *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001 y n.s. no significativo con respecto al control (post-test de Tukey).

La respiración mitocondrial basal (Figura 2B), fue calculada restando el OCR previo al estímulo con oligomicina y el OCR de la última medición. Con esto se observa que la tasa de consumo de oxígeno basal para las células con respiración normal es significativamente mayor en comparación a los modelos farmacológicos y genético.

Fue posible evaluar la respiración mitocondrial máxima, es decir la actividad máxima del complejo IV, al restar el valor de OCR obtenido post estímulo con FCCP y el valor de OCR obtenido en la última medición del experimento (Figura 2D). Nuevamente, este valor fue significativamente mayor en las células MDA-MB-231 con cadena transportadora funcional.

Por otro lado, se observó que el consumo de oxígeno no mitocondrial, calculado en base a la última medición de OCR posterior al estímulo con antimicina A más rotenona, fue significativamente mayor en los modelos farmacológicos, a diferencia del modelo genético, que no presentó diferencias significativas con el grupo no tratado (Figura 2F).

Finalmente, se calcularon dos parámetros relacionados; el OCR asociado a la generación de ATP y la eficiencia, traducida como el consumo de oxígeno mitocondrial que es efectivamente utilizado por las células para la generación de ATP (Figura 2C, 2E). Con esto se pudo determinar que los niveles de consumo de oxígeno asociados a ATP fueron significativamente menores en los tres modelos estudiados respecto a las células no tratadas. Sin embargo, no se advirtieron diferencias significativas en eficiencia entre el modelo genético (Rho-0) y las células con cadena transportadora funcional, mas sí se vio una menor eficiencia en los modelos farmacológicos de carboxilación reductiva respecto a las no tratadas ($p \leq 0,001$).

6.3. Cambios diferenciales en la acidificación extracelular de sublíneas MDA-MB-231 con carboxilación reductiva.

Para la medición de la acidificación extracelular, que permite determinar la glucólisis, se siguió un protocolo similar al del experimento anterior, añadiendo secuencialmente 3 compuestos oxidantes o estresores y realizándose un total de 12 mediciones periódicas. El primer compuesto al que fueron expuestas las líneas celulares fue glucosa (10 mM), un sustrato de la vía glicolítica. Luego fueron expuestas a oligomicina (1 μ M), un inhibidor del complejo V y, finalmente, a 2-desoxi-glucosa (2-DG) (100 mM), compuesto análogo de glucosa que inhibe competitivamente la hexoquinasa, enzima que inicia la glicólisis. De este modo, se obtuvo el perfil bioenergético de la acidificación extracelular (ECAR) a lo largo del tiempo (Figura 3A), y se calcularon diferentes parámetros de la glicólisis.

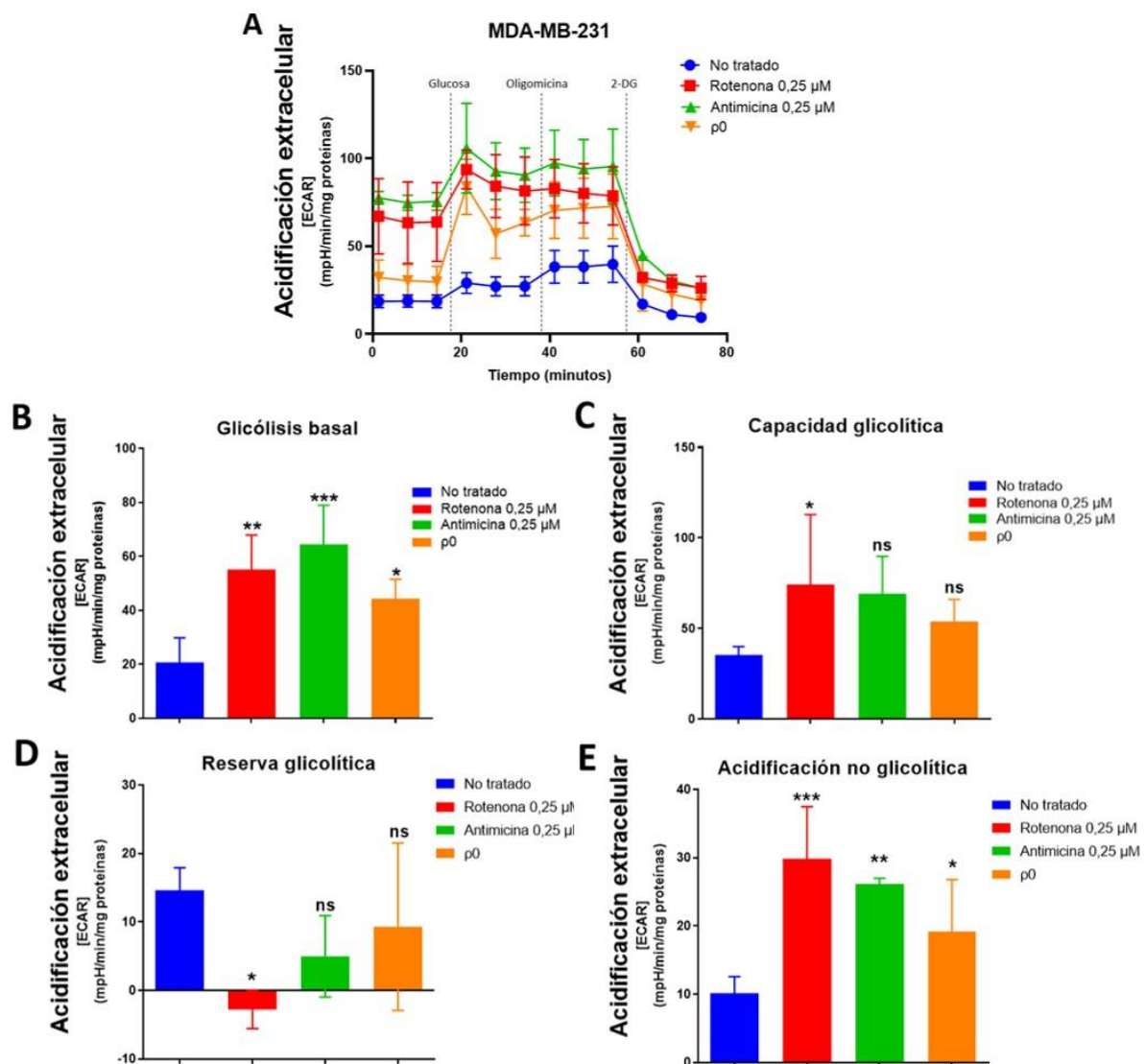


Figura 3. Tasa de acidificación extracelular (ECAR) (mpH/min/mg proteínas) en tiempo real en líneas celulares de MDA-MB-231. (A) Perfil bioenergético obtenido de 12 mediciones de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) (mpH/min/mg proteínas), ante el estímulo secuencial de glucosa (10 mM), oligomicina (1 μ M), y 2-DG (2-desoxi-D-glucosa) (100 mM). **(B)** Niveles de glicólisis basal. **(C)** Niveles de capacidad glicolítica. **(D)** Tasa de reserva glicolítica. **(E)** Niveles de acidificación no glicolítica. En azul; grupo MDA-MB-231 no tratadas (grupo control), en rojo y verde; sublíneas MDA-MB-231 de los modelos farmacológicos de carboxilación reductiva inducidos por antimicina A (0,25 μ M) o rotenona (0,25 μ M), respectivamente y en naranja; sublínea MDA-MB-231 del modelo genético de carboxilación

reductiva. Los valores son expresados como promedio \pm SD, N=3, *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001 y n.s. no significativo con respecto al control (post-test de Tukey).

La tasa de glicólisis basal de las células fue calculada en base a la diferencia entre los valores obtenidos en la medición previa al estímulo con oligomicina y la última medición registrada (Figura 3B). Con esto se advierte que en los modelos de carboxilación reductiva las células acidifican significativamente más su espacio extracelular, lo que se traduce en que desarrollan mayor glicólisis. Cabe destacar que estos valores fueron mayores en los modelos farmacológicos que en el modelo genético.

La capacidad glicolítica, evaluada mediante la adición de 2-DG, fue obtenida mediante la resta del ECAR registrado en la medición posterior al estímulo con dicho compuesto y el obtenido en la última medición (Figura 3C). En este caso, solo presentó un aumento significativo respecto a las células no tratadas el modelo farmacológico con antimicina A, mientras que las otras sublíneas registraron valores similares a las células con respiración funcional.

La reserva glicolítica, la cual se interpreta como la capacidad que tienen las células para aumentar la glicólisis ante una demanda metabólica o estrés, es evaluada mediante la respuesta al estímulo con oligomicina (Figura 3D). Nuevamente, solo el modelo farmacológico con antimicina A presentó una capacidad de reserva glicolítica muy disminuida en comparación con el grupo de células no tratadas

Por último, en base a la última medición de la acidificación extracelular, se obtuvieron los registros de acidificación no glicolítica (Figura 3E). En este caso, los tres modelos de células con carboxilación reductiva estudiados presentan valores significativamente elevados en comparación con las no tratadas.

6.4. Cuantificación de los niveles proteicos de α -cetoglutarato deshidrogenasa y proteínas de la cadena transportadora de electrones.

Dado que tanto el modelo farmacológico como el genético de la carboxilación reductiva (CR) mostraron una ausencia de transferencia de electrones, nosotros evaluamos mediante Western blot si los niveles de la enzima *α -cetoglutarato deshidrogenasa (OGDH)* y de los complejos respiratorios (OXPHOS) podrían verse afectados como un reflejo de la adaptación metabólica comparado con la condición de respiración funcional.

Los niveles de OGDH fueron mayores para la CR inducida por rotenona (1.2 veces) y el modelo genético (1.4 veces) comparado con el control. El tratamiento con antimicina A no produjo cambios destacables en los niveles de OGDH (Figura 4A).

Al analizar las concentraciones de los complejos respiratorios II, III, IV y V (Figura 4B), resalta la identificación del complejo II y III, los cuales se encuentran en un nivel mayor y menor, respectivamente en los modelos farmacológicos (siendo mayor en el modelo con rotenona). De forma interesante, en el modelo genético (Rho-0) se observó lo contrario: un aumento del complejo III y una disminución del complejo II- el modelo genético su concentración es mucho menor. En contraste, el complejo V (ATP sintasa) no presenta diferencias destacables entre ninguno de los modelos y el grupo control (Figura 4D).

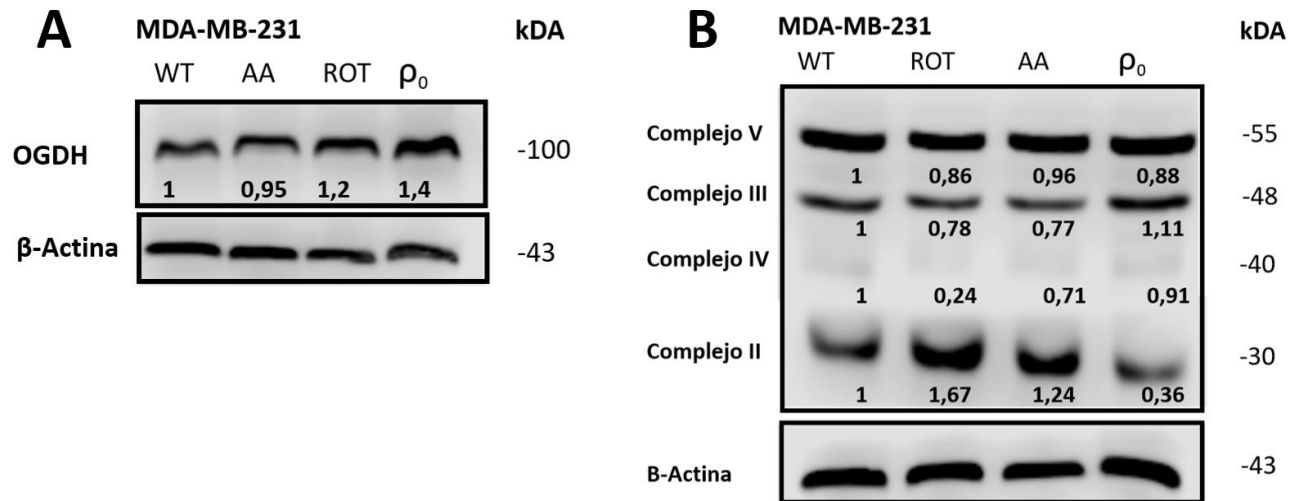


Figura 4. Cuantificación de α -cetoglutarato deshidrogenasa (ODGH) y complejos respiratorios II, III, IV y V. (A) Western blot representativo de OGDH (100 kDa) en sublíneas de células MDA-MB-231, como control interno se utilizó β -actina (43 kDa). **(B)** Western blot representativo de la expresión diferencial de OGDH en los distintos modelos. WT= no tratado (grupo control), AA= modelo farmacológico de carboxilación reductiva utilizando antimicina A (0,25 μ M), ROT=modelo farmacológico de carboxilación reductiva utilizando rotenona (0,25 μ M) y ρ_0 = modelo genético de carboxilación reductiva. La cuantificación del área de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ. n=1.

6.5. Medición de potencial de membrana mitocondrial y especies reactivas de oxígeno (ROS)

Según los datos anteriores, la ausencia de transferencia de electrones debido al bloqueo con rotenona y antimicina A, podría producir una fuga de electrones contribuyendo a la formación de superóxido. Adicionalmente, estos cambios en la respiración mitocondrial, acompañados de cambios diferenciales en los niveles de OGDH en los modelos farmacológicos de CR, podrían sugerir una mayor sensibilidad al bloqueo de su actividad utilizando el compuesto CPI-613 comparado a células MDA-MB-231 con respiración funcional. Por lo tanto, se evaluó el efecto de CPI-613 (250 μ M) en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y en la generación de ROS en los modelos farmacológicos con antimicina

A (0,5 μM) o rotenona (0,5 μM) de sub línea celular MDA-MB-231. En el caso de la medición del $\Delta\psi\text{m}$, se utilizó como control positivo FCCP y para las mediciones de ROS, se utilizó menadiona.

Al analizar los resultados de $\Delta\psi\text{m}$ de los modelos farmacológicos en comparación con el grupo control (Figura 5A), no se encontraron diferencias significativas, ya sea tanto tratados con DMSO como ante CPI-613. Por otro lado, al comparar cada sublínea celular no tratada con CPI-613 con el control positivo, encontramos resultados significativos; el $\Delta\psi\text{m}$ es mucho menor ante la acción del desacoplante (FCCP), lo que nos permite validar la técnica.

Por otro lado, en las mediciones de niveles de ROS (Figura 5B), se obtuvieron valores significativamente altos en los modelos farmacológicos de CR en comparación con el grupo control. Inclusive, se encontraron diferencias significativas en niveles de ROS dentro de un mismo modelo ante el estímulo con DMSO o CPI-613 (250 μM) , siendo mayores las ROS ante la presencia del compuesto en estudio. En contraste, en el modelo de respiración funcional no se advierte una diferencia significativa ante el estímulo con CPI-613. La medición de ROS en células MDA-MB-231 con respiración funcional ante el estímulo con menadiona nos permite validar los resultados obtenidos (Figura 5C). En conjunto estos datos sugieren que las células MDA-MB-231 bajo CR inducida farmacológicamente, mantienen los mismos niveles de $\Delta\psi\text{m}$ que aquellas células con respiración funcional, pero tienen una alta sensibilidad a la producción de ROS por el inhibidor de OGDH, CPI-613.

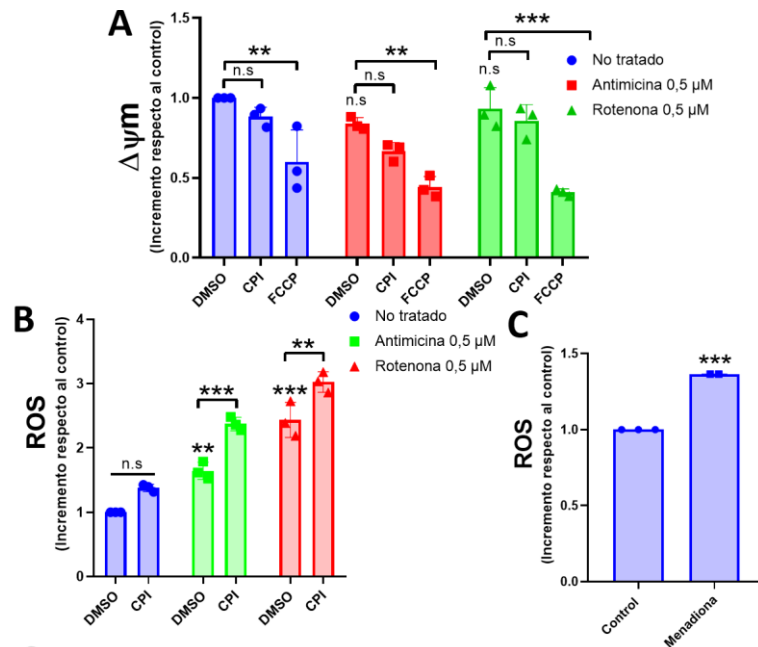


Figura 5. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial y generación de especies reactivas de oxígeno en respuesta a CPI-613 en sublíneas celulares de MDA-MB-231. (A) Variaciones en el potencial de membrana mitocondrial utilizando el indicador fluorescente TMRM en *non-quenching mode*, se miden en los modelos farmacológicos de carboxilación reductiva y el control (no tratado), ante respuestas al desacoplante FCCP (0,1 μM , control positivo) y al compuesto CPI-613 (250 μM). **(B)** Mediciones de especies reactivas de oxígeno, utilizando el indicador fluorescente DHE, se miden en los modelos farmacológicos de carboxilación reductiva y el no tratado (control) ante el estímulo con CPI-613. **(C)** Mediciones de especies reactivas de oxígeno, utilizando el indicador fluorescente DHE, la adición de menadiona (0,1 μM) corresponden al control positivo. En azul; grupo control (MDA-MB-231 no tratadas) y en rojo y verde; sublíneas MDA-MB-231 de los modelos farmacológicos de carboxilación reductiva, mediante los tratamientos con antimicina A (0,25 μM) o rotenona (0,25 μM) respectivamente. Los valores son expresados como promedio \pm SD, N=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y n.s. no significativo con respecto al control (post-test de Tukey).

6.6. CPI-613 sensibiliza las células con RC y determina la respuesta a etopósido.

Dado que nuestros resultados previos mostraron que CPI-613 produce un aumento en ROS de los modelos de CR farmacológicos, evaluamos si CPI-613 podría reducir la viabilidad preferentemente de estas células comparadas con aquellas células MDA-MB-231 con respiración funcional. Adicionalmente, para evaluar el efecto de CPI-613 en la sensibilidad al quimioterapéutico convencional, etopósido, se realizó un análisis de viabilidad celular en los modelos farmacológicos con antimicina A (0,5 μ M) o rotenona (0,5 μ M) de sub línea celular MDA-MB-231 (Figura 6). De los resultados obtenidos se desprende que el CPI-613 disminuye la viabilidad celular de todas las sublíneas celulares estudiadas y esta es más acentuada en los modelos farmacológicos de CR. El tratamiento por 48 h con etopósido (5 μ M) no tuvo efectos sobre la viabilidad celular, sin embargo, el efecto combinado de etopósido con CPI-613, generó una disminución en la viabilidad celular mucho mayor que la presencia de CPI-613. En todas las condiciones, las células MDA-MB-231 con CR fueron más vulnerables al efecto de CPI-613 comparado con las células no tratadas.

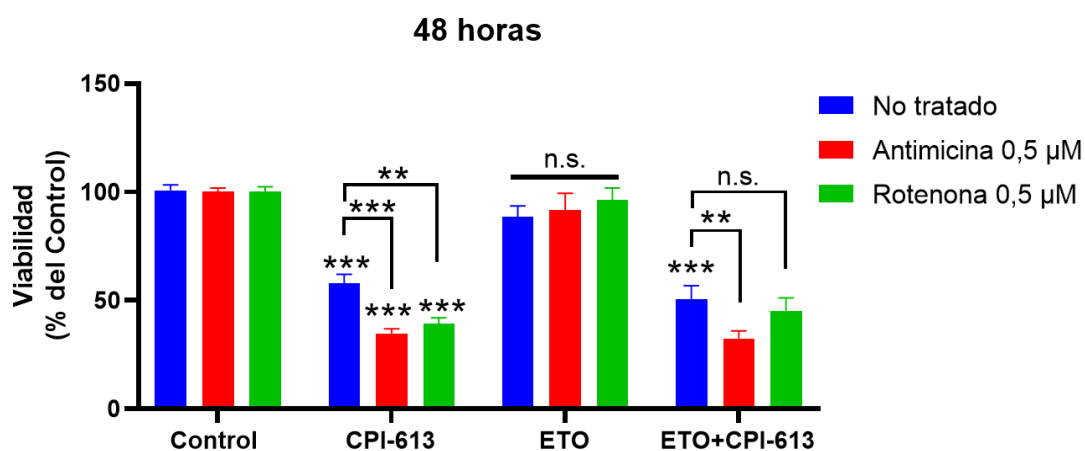


Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular en los modelos farmacológicos de carboxilación reductiva en comparación con grupo control. Se graficaron distintos grupos, de izquierda a derecha; grupo control o grupo no tratado con CPI-613, grupo estimulado con CPI-613, grupo estimulado con

etopósido (5 μM) y grupo con tratamiento combinado de etopósido y CPI- 613. En azul; cultivo celular no tratado (grupo control), en rojo; sublínea celular de MDA-MB-231 del modelo farmacológico de carboxilación reductiva con rotenona (0,25 μM) y en verde; sublínea celular de MDA-MB-231 del modelo farmacológico de carboxilación reductiva con antimicina (0,25 μM). Los valores son expresados como promedio \pm SD, N=3, *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001, n.s. no significativo con respecto al control.

6.7. Efecto de CPI-13 sobre la capacidad migratoria de células MDA-MB-231 con respiración funcional y bajo carboxilación reductiva

A partir de un experimento *transwell*, se obtuvo un valor promedio del conteo de células, a partir de 5 fotografías obtenidas de zonas representativas de ambos modelos farmacológicos de CR y condición control. También se evaluó el efecto de CPI-613 (250 μM) sobre la capacidad migratoria de estos modelos.

Como muestra la Figura 7, las células con CR inducida por rotenona y antimicina A, mostraron menor y mayor migración celular que el control con respiración mitocondrial funcional. Adicionalmente, CPI-613 solo tuvo efectos en células con CR inducida por rotenona, produciendo un importante incremento en la migración celular.

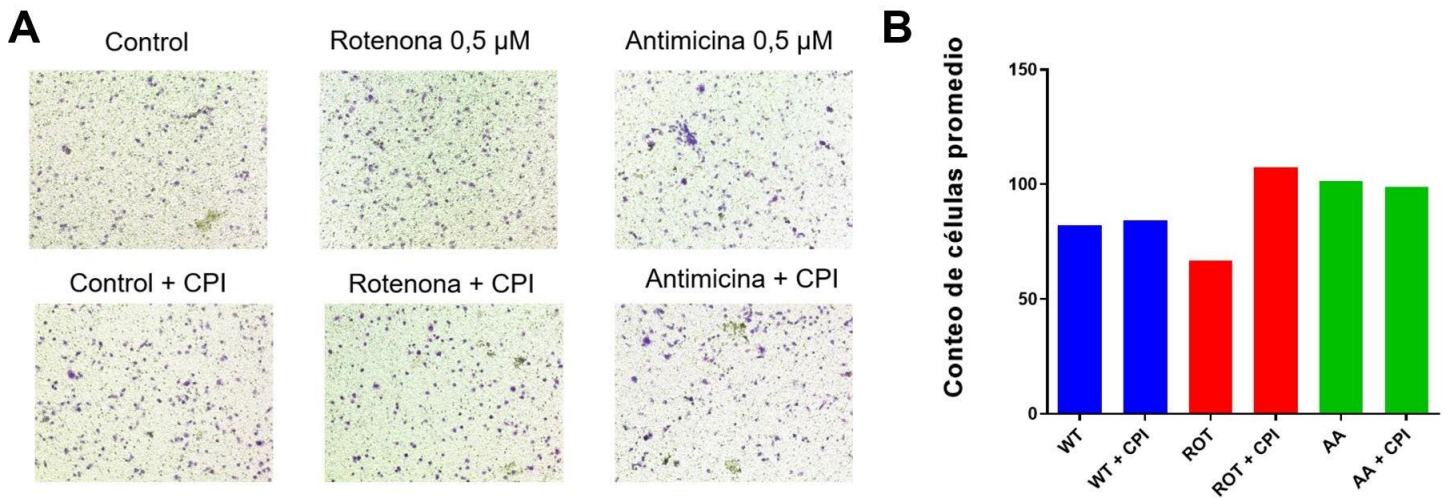


Figura 7. Efecto de CPI-613 sobre la capacidad migratoria de células MDA-MB-231 con respiración funcional y bajo CR. (A) Células MDA-MB-231 migradas bajo modelo farmacológico de carboxilación reductiva y estímulo con CPI-613 (250 μ M). **(B)** Células migradas promedio por condición experimental. En azul; cultivo celular no tratado (control), en rojo; sublínea celular de MDA-MB-231 del modelo farmacológico de carboxilación reductiva con rotenona (0,5 μ M) y en verde; sublínea celular de MDA-MB-231 del modelo farmacológico de carboxilación reductiva con antimicina (0,5 μ M). La cuantificación de las células se realizó utilizando el software ImageJ. n=1.

7. DISCUSIÓN

En la presente investigación se generaron dos modelos de células MDA-MB-231 con carboxilación reductiva: un modelo farmacológico, utilizando rotenona o antimicina A a una concentración mínima de 0,25 μM y una concentración máxima de 0,5 μM y otro genético, con el objetivo de ser comparados con el modelo no tratado, es decir con respiración normal (grupo control) y de esta manera aproximarnos a la plasticidad metabólica de las células cancerosas debido a la carboxilación reductiva, y si este tipo de células podrían ser un blanco terapéutico adecuado para CPI-613, un fármaco inhibidor de PDH y OGDH recientemente aprobado por la FDA para su uso clínico en oncología.

Para desarrollar el modelo farmacológico se realizó una curva dosis respuesta ante rotenona y antimicina A. Bajo las distintas concentraciones de antimicina A y rotenona, la viabilidad celular se mantuvo en valores cercanos a 100% en comparación con el grupo control. Esto nos indica que, independiente de la concentración de los compuestos, las células logran adaptar su metabolismo hacia una carboxilación reductiva, manteniendo su viabilidad aún en condiciones de estrés metabólico, en ausencia de respiración mitocondrial. Simultáneamente, se evaluó la viabilidad celular bajo una concentración constante de CPI-613, con la cual se observó una disminución en la viabilidad relativa a las células no estimuladas con el fármaco. Cabe resaltar que a pesar de esta disminución en la viabilidad celular, no existieron diferencias significativas al variar las concentraciones de rotenona y antimicina A, sugiriendo que es un evento independiente de la concentración.

Con el análisis de la tasa de consumo de oxígeno mediante el XFe-96 Seahorse, se observó que las células MDA-MB-231 no tratadas presentan un consumo de oxígeno más eficiente que las células del modelo de carboxilación reductiva, es decir, una elevada generación de ATP aeróbicamente y mayores valores de consumo de oxígeno basal, como es frecuente en las células cancerosas. En general, el metabolismo oxidativo mitocondrial de las células en carboxilación reductiva se ve gravemente alterado, con una baja en el consumo de

oxígeno basal y máximo, además de verse desacoplado el consumo de oxígeno con la producción de ATP y una elevada tasa de consumo de oxígeno no mitocondrial. Esta fuerte reducción de la transferencia de electrones en RC impide la síntesis de ATP mitocondrial, promoviendo un remodelado metabólico hacia la glicólisis para compensar la síntesis de ATP. Si bien los distintos modelos de CR presentaron diferencias entre estos parámetros, como en el caso del modelo genético y la eficiencia en el consumo de oxígeno, en general los resultados reflejan lo esperable en células que presentan este proceso metabólico. Con este experimento fue posible validar los modelos de carboxilación reductiva, desarrollados a partir de concentraciones de 0,25 μM de rotenona o antimicina y el modelo genético, también conocido como Rho-0.

De forma simultánea a la tasa de consumo de oxígeno, se midió la tasa de acidificación extracelular y se calcularon distintos parámetros relacionados a la glicólisis. Esto nos permitió evaluar las propiedades glicolíticas de las células. En este caso, las células en CR presentaron una alta glicólisis basal y una alta acidificación no glicolítica y, si bien esta vía metabólica es mucho menos eficiente, les concede la capacidad de proliferar bajo condiciones hipóxicas (24). Finalmente, la alta acidificación no glicolítica, puede deberse a un aumento en la producción de protones debido a la acumulación de compuestos como el citrato y otros intermediarios del proceso de la CR (25), y de todas maneras, señala la elevada plasticidad metabólica de las células estudiadas.

Posteriormente, se determinó los niveles de la enzima OGDH, a modo de aproximarnos a la importancia de su rol en los modelos de CR. Se cuantificó un aumento de la concentración de ésta en el modelo genético, al igual que en el modelo farmacológico con rotenona, mas no en el modelo con antimicina A, donde disminuyó. Si bien, estos resultados pueden ser interpretados como que un aumento en la enzima OGDH es necesaria para la carboxilación reductiva, el hecho de que solo se haya realizado un experimento no nos permite extrapolar

estos resultados, ya que existe una cantidad insuficiente de muestras para comparar y analizar. Adicionalmente, bajo la condición de antimicina A, podría verse aumentada la actividad enzimática y no necesariamente aumentar los niveles proteicos de OGDH. Simultáneamente, al identificar los complejos respiratorios, se advirtieron diferencias significativas en la concentración del complejo III y el II; los cuales se encuentran disminuidos y aumentados, respectivamente, en los modelos de carboxilación farmacológica, mientras que lo opuesto sucede en el modelo genético, en comparación con la sublínea no tratada. Si bien estos resultados parecen indicar que en estos modelos de CR los complejos respiratorios ven alterado no sólo su funcionamiento, sino que también su concentración intracelular, al igual que para la caracterización de OGDH no es posible extrapolar los resultados debido a una cantidad insuficiente de muestras.

A modo de evaluar el efecto de CPI-613 en las células, se midieron los cambios en el $\Delta\psi_m$, así como también los niveles de ROS mitocondriales. Se conoce que la inhibición de la enzima OGDH por CPI-613 está mediada por especies reactivas de oxígeno (20), por lo que estos parámetros son de interés para entender la acción de este compuesto en las células con CR. En este primer experimento se observaron disminuciones en el $\Delta\psi_m$ con CPI-613, sugiriendo que CPI-613 podría inducir muerte celular apoptótica, ya que las mitocondrias liberan factores apoptóticos cuando su $\Delta\psi_m$ se ve comprometido. Esto a la vez afecta directamente la producción de mROS, los cuales se ven aumentados con CPI-613. Esto se condice con la literatura (26), ya que se ha descrito que el CPI-613 promueve la apoptosis en células de cáncer pancreático mediante la acumulación de ROS. Cabe destacar que los modelos farmacológicos presentan de por sí niveles más elevados de mROS que el control y que el estímulo con CPI-613 provoca un aumento incluso mayor de estas especies en esta línea celular.

Nuestros datos indican que CPI-613 produce mayor muerte en células MDA-MB-231 con carboxilación reductiva que en MDA-MB-231 con respiración funcional. Por otro lado, el quimioterápico convencional etopósido no genera un cambio considerable en la viabilidad celular en un tratamiento por sí solo, más sí en un tratamiento combinado con CPI-613. Este tratamiento combinado disminuye significativamente la viabilidad celular, sin embargo, no es representativa la diferencia entre los modelos farmacológicos y el control.

Por último, se realizó un único ensayo para evaluar la capacidad migratoria de las células bajo 6 distintas condiciones experimentales. De ello cabe mencionar que la migración del grupo control (respiración funcional) no varió bajo el tratamiento con CPI-613, al igual que el grupo tratado con antimicina A, el cual presentó una leve disminución en la migración celular. Por otro lado, el grupo tratado con rotenona presentó un notorio aumento en la capacidad migratoria de las células, al ser expuesto a CPI-613, lo cual no se condice con los resultados esperados. Si bien este experimento nos indica que el CPI-613 no presenta un efecto notorio en la migración celular, la incongruencia entre resultados de dos modelos similares (farmacológicos de carboxilación reductiva) no permiten extrapolar mayor información de este ensayo.

8. CONCLUSIÓN

En este trabajo de investigación, se eligió como problemática la falta de blancos terapéuticos en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo, y se buscó evaluar el efecto de la molécula CPI-613 en la línea celular MDA-MB-231 (TNBC) con carboxilación reductiva estudiando parámetros de viabilidad celular, efectos en el metabolismo mitocondrial, sensibilización a etopósido y capacidad migratoria, y compararlos con células MDA-MB-231 con respiración normal. Se lograron generar adecuadamente modelos de carboxilación reductiva, mediante una estrategia farmacológica utilizando rotenona o antimicina A, en concentraciones mínimas de 0,25 μM y máximas de 0,5 μM y mediante la estrategia genética con la utilización del plásmido pMA3790. Se determinó que CPI-613 produce cambios selectivos en células con CR en cuanto a viabilidad (donde dichas células eran más vulnerables al compuesto), potencial de la transmembrana mitocondrial (el cual presentó un leve aumento) y generación de especies reactivas de oxígeno (las cuales presentaron un notorio aumento). Futuras investigaciones son necesarias para entender el mecanismo de acción de CPI-613 y su eficacia al conjugarse con otros quimioterápicos, como etopósido en este estudio, y en la capacidad migratoria de células de TNBC con carboxilación reductiva.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- OMS. Cáncer de mama www.who.int. 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- 2.- Caglevic C, Anabalón J, Soza C, Milla E, Gaete F, Carrasco AM, et al. Triple-negative breast cancer: the reality in Chile and in Latin America. 2019 Jan 22;13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6372297/>
- 3.- Budny A; Starosławska E; Budny B; Wójcik R; H2. Budny A; Starosławska E; Budny B; Wójcik R; Hys M; Kozłowski P; Budny W; Brodzik A; Burdan F. [Epidemiology and Diagnosis of Breast Cancer]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 2019 May 27;46(275). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31152530/>
- 4.- Yin L, Duan J-J, Bian X-W, Yu S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*. 2020 Jun 9;22(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32517735/>
- 5.- Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *The oncologist*. 2016;16 Suppl 1:1–11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278435>
- 6.- Sharma P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*. 2016 Jul 11;1(9):1050–62. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5016071/>

- 7.- Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMB-S, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Research* 2017 Dec 828(3):265–80. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/cr2017155>
- 8.- Urra FA, Fuentes-Retamal S, Palominos C, Rodríguez-Lucart YA, López-Torres C, Araya-Maturana R. Extracellular Matrix Signals as Drivers of Mitochondrial Bioenergetics and Metabolic Plasticity of Cancer Cells During Metastasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021 Oct 18;9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34733852/>
- 9.- Arvelo F, Cotte C. Metaloproteasas en la progresión tumoral: Revisión. *Investigación Clínic*. 2006 Jun 1;47(2):185–205. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332006000200009
- 10.- Wu Y, Zanutelli MR, Zhang J, Reinhart-King CA. Matrix-driven changes in metabolism support cytoskeletal activity to promote cell migration. *Biophysical Journal*. 2021 May 4;120(9):1705–17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8204337/>
- 11.- Cai F-F, Xu C, Pan X, Cai L, Lin X-Y, Chen S, et al. Prognostic value of plasma levels of HIF-1a and PGC-1a in breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Oct 21;7(47).
- 12.- Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014 Apr;1837(4):427–43.
- 13.- Corbet C, Feron O. Metabolic and mind shifts: from glucose to glutamine and acetate addictions in cancer. *Current Opinion*. 2022 May 9.

14.- Urra F, Weiss-López B, Araya-Maturana R. Determinants of Anti-Cancer Effect of Mitochondrial Electron Transport Chain Inhibitors: Bioenergetic Profile and Metabolic Flexibility of Cancer Cells. *Current Pharmaceutical Design*. 2016 Dec 14;22(39):5998–6008.

15.- Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen P-H, Sullivan LB, Cheng T, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*. 2011 Nov 20;481(7381):385–8].

16.- Frezza C, Pollard PJ, Gottlieb E. Inborn and acquired metabolic defects in cancer. *Journal of Molecular Medicine*. 2011 Feb 8;89(3):213–20.

17.- Cárdenas C, Müller M, McNeal A, Lovy A, Jaña F, Bustos G, et al. Selective Vulnerability of Cancer Cells by Inhibition of Ca²⁺ Transfer from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. *Cell Reports*. 2016 Mar;14(10):2313–24.

18.- Cardenas C, Lovy A, Silva-Pavez E, Urra F, Mizzoni C, Ahumada-Castro U, et al. Cancer cells with defective oxidative phosphorylation require endoplasmic reticulum-to-mitochondria Ca²⁺ transfer for survival. *Science Signaling* 2020 Jul 14 . Disponible en: <https://stke.sciencemag.org/content/13/640/eaay1212>]

19.- Vatrinet R, Leone G, De Luise M, Girolimetti G, Vidone M, Gasparre G, et al. The α -ketoglutarate dehydrogenase complex in cancer metabolic plasticity. *Cancer & Metabolism*. 2017 Feb 2;5(1).

- 20.- Stuart SD, Schauble A, Gupta S, Kennedy AD, Keppler BR, Bingham PM, et al. A strategically designed small molecule attacks alpha-ketoglutarate dehydrogenase in tumor cells through a redox process. *Cancer & Metabolism*. 2014 Mar 10;2(1).
- 21.- Zachar Z, Marecek J, Maturo C, Gupta S, Stuart SD, Howell K, et al. Non-redox-active lipoate derivatives disrupt cancer cell mitochondrial metabolism and are potent anticancer agents in vivo. *Journal of Molecular Medicine*. 2011 Jul 19;89(11):1137–48.
- 22.- C. Lee K, Shorr R, Rodriguez R, Maturo C, W. Boteju L, Sheldon A. Formation and Anti-Tumor Activity of Uncommon In Vitro and In Vivo Metabolites of CPI-613, a Novel Anti-Tumor Compound That Selectively Alters Tumor Energy Metabolism. *Drug Metabolism Letters*. 2011 Aug 1;5(3):163–82.
- 23.- Philip PA, Buyse ME, Alistar AT, Lima CM, Luther S, Pardee TS, et al. A Phase III open-label trial to evaluate efficacy and safety of CPI-613 plus modified FOLFIRINOX (mFFX) versus FOLFIRINOX (FFX) in patients with metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Future Oncology*. 2019 Oct;15(28):3189–96.
- 24.- Vasan K, Werner M, Chandel NS. Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metabolism*. 2020 Sep;32(3):341–52. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.019>
- 25.- Halbrook CJ, Nwosu ZC, Lyssiotis CA. Fine-Tuning Mitochondrial Dysfunction and Reductive Carboxylation. 2018 Sep 1; <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.04.002>

26.- Gao, L., Xu, Z., Huang, Z. et al. CPI-613 rewires lipid metabolism to enhance pancreatic cancer apoptosis via the AMPK-ACC signaling. *J Exp Clin Cancer Res* 39, 73 (2020).
<https://doi.org/10.1186/s13046-020-01579-x>