



Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biotecnología

**EFFECTO DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE
LOS SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS EN
PROCESOS TUMORALES**

**Effect of environmental factors on
respiratory supercomplexes in tumour
processes**

Autor:

Diego Boj Carballo

Directores:

Dra. Raquel Moreno Loshuertos

Dr. Patricio Fernández Silva

Grupo GENOXPHOS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

Universidad de Zaragoza, 2021

ABREVIATURAS

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina sérica bovina

CI: Complejo I, NADH deshidrogenasa

CII: Complejo II, succinato deshidrogenasa

CIII: Complejo III, citocromo c reductasa

CIV: Complejo IV, citocromo c oxidasa

CV: Complejo V, ATP sintasa

cDNA: DNA complementario

CoQ: Coenzima Q

DAB: 3,3-diaminobencidina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNP: Dinitrofenol

DT: Tiempo de duplicación

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETC: *Electron transport chain*

Eu: Europio

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido en su forma reducida

IF1: Factor inhibidor 1 de la ATP sintasa

IGA: *In Gel Activity*

KCN: Cianuro de potasio

MFI: *Mean Fluorescence Intensity*

mtDNA: DNA mitocondrial

MTT: Bromuro de dimetil-tiazoliltetrazolio

NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina en su forma reducida

NBT: *Nitro Blue Tetrazolium*

OXPHOS: Oxidative Phosphorylation System

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDK: Piruvato deshidrogenasa quinasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCs: Supercomplejos

SCAF1: *Supercomplex Assembly Factor 1*

SFB: Suero fetal bovino

Sm: Samario

SOD2: Superóxido dismutasa 2

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Características celulares y moleculares del cáncer.....	2
2.2. <i>Efecto Warburg</i> y metabolismo del cáncer	3
2.3. Mitocondrias y sistema OXPHOS.....	4
2.4. Mitocondrias y su relación en procesos tumorales	6
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Cultivos celulares	8
4.1.1. Líneas celulares	8
4.1.2. Medios de cultivo.....	8
4.1.3. Cultivo y siembra celular.....	8
4.1.4. Recuento celular.....	9
4.1.5. Curvas de crecimiento	9
4.1.6. Congelación y descongelación de líneas celulares	9
4.2. Extracción de ácidos nucleicos	9
4.2.1. Extracción de DNA en células de cultivo y cuantificación.....	9
4.2.2. Extracción de RNA en células de cultivo y cuantificación.....	10
4.3. Análisis de complejos mitocondriales por Blue Native	10
4.3.1. Purificación de mitocondrias	10
4.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida Blue Native	10
4.3.3. Ensayo de Actividad en Gel (IGA)	11
4.4. Medida de la respiración celular.....	11
4.5. Determinación de masa y superóxido mitocondrial mediante citometría	11
4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
4.6.1. Obtención de cDNA monocatenario.....	12
4.6.2. PCR en tiempo real	12
4.7. Medida de temperatura intracelular	13
4.8. Medida de la citotoxicidad de DCA.....	13
4.9. Análisis estadístico	13
5. RESULTADOS.....	14
5.1. Funcionalidad del sistema OXPHOS.....	14
5.2. Funcionalidad de los complejos y supercomplejos respiratorios.....	15
5.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y superóxido dismutasa 2 (SOD2)	16
5.4. Estimación de masa y DNA mitocondrial.....	17
5.5. Proliferación y supervivencia celular	19

5.6. Inhibición de la ATP sintasa	20
5.7. Temperatura intracelular	21
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	21
7. CONCLUSIONES	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24
9. ANEXOS	26

1. RESUMEN

El sistema OXPHOS, que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria, es el encargado de la síntesis de ATP en la célula eucariota mediante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, las células tumorales sufren una serie de modificaciones en su metabolismo energético aumentando su tasa glucolítica y la producción de lactato. Esta bioenergética desregulada es la responsable principal de una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la cadena de transporte electrónico (ETC) que influyen en la organización molecular de los complejos respiratorios en la formación de supercomplejos (SCs). Las ROS son capaces de inducir la vía intrínseca de la apoptosis mitocondrial pero también pueden actuar como mitógenos ya que contribuyen a la formación y proliferación de tumores neoplásicos. Las células tumorales también sufren mutaciones en su mtDNA, modificaciones en su temperatura intracelular, sobreexpresión de factores inhibidores de la ATP sintasa y sobreexpresión de enzimas antioxidantes que afectan a la proliferación tumoral en los estadios iniciales del tumor y condicionan su posterior evolución.

En este trabajo hemos analizado la influencia de la mitocondria en el proceso tumoral empleando líneas transmitocondriales procedentes de células epiteliales de cáncer de mama generadas en el laboratorio. Hemos estudiado la función y organización del sistema OXPHOS y la producción y detoxificación de ROS. Los resultados demuestran que estas líneas tumorales presentan deficiencias estructurales y funcionales en el sistema OXPHOS que se pueden relacionar con un aumento en la producción de ROS que parece inducir un incremento en la biogénesis mitocondrial como mecanismo compensatorio.

1. ABSTRACT

The OXPHOS system, which is placed in the mitochondrial inner membrane, is responsible for the synthesis of ATP in the eukaryotic cell through oxidative phosphorylation. However, tumour cells undergo a series of modifications in their energy metabolism, increasing their glycolytic rate and lactate production. This deregulated bioenergetics is the main responsible for a greater generation of reactive oxygen species (ROS) in the electronic transport chain (ETC) that influence the molecular organization of respiratory complexes in the formation of supercomplexes (SCs). ROS can induce the intrinsic pathway of mitochondrial apoptosis, but they can also act as mitogens since they contribute to the formation and proliferation of neoplastic tumours. Tumour cells also undergo mutations in their mtDNA, changes in their intracellular temperature, overexpression of ATP synthase inhibitor factors, and overexpression of antioxidant enzymes that affect tumour proliferation in the initial stages of the tumour and condition its subsequent evolution.

In this work, we have analyzed the influence of mitochondria on the tumor process using transmitochondrial lines from breast cancer epithelial cells generated in the laboratory. We have studied the function and organization of the OXPHOS system and the production and detoxification of ROS. In this way, it is intended to demonstrate that there is a clear relationship between the functioning of respiratory SCs and ROS production. The results show that these tumor lines present structural and functional deficiencies in the OXPHOS system that can be related to an increase in ROS production which appears to induce a rise in mitochondrial biogenesis as compensatory mechanism.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Características celulares y moleculares del cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento celular excesivo, descontrolado e invasivo que se encuentra asociado con una pérdida progresiva del tejido normal. Existen más de 100 enfermedades diferentes que se agrupan en este término y llegan a afectar a más de 200 tipos celulares distintos. Las células epiteliales sufren el 90% de los cánceres y se denominan carcinomas. El cáncer es el resultado de dos procesos, por un lado el aumento incontrolado del crecimiento celular que se conoce como neoplasia y por otro, de la adquisición de la capacidad invasiva de otros tejidos que se conoce como metástasis. Los carcinomas se producen en células epiteliales que en su estado basal no disponen de motilidad por lo que tienen que sufrir la transición epitelio-mesénquima (EMT) para poder atravesar la membrana basal, acceder al torrente sanguíneo y establecer un nuevo foco de localización en un tejido diferente al del tumor original (1).

Se agrupan muchas enfermedades bajo la denominación de cáncer, pero se pueden establecer una serie de características celulares y moleculares de los diversos tumores conocidos como “hallmarks” o marcadores del cáncer y definidos por Hanahan y Weinberg en el año 2000. Estas características son: (i) las células tumorales son autosuficientes ya que producen sus propios factores de crecimiento; (ii) contienen mutaciones que las hacen insensibles a las señales inhibidoras del ciclo celular; (iii) son capaces de evitar la apoptosis; (iv) poseen un potencial replicativo ilimitado ya que activan continuamente la telomerasa; (v) tienen la capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes en un proceso denominado angiogénesis; y (vi) son capaces de interaccionar y desarrollar nuevas características para metastatizar e invadir nuevos tejidos (2). En una revisión posterior de este estudio se añadieron cuatro nuevas características ya que se ha podido comprobar que las células tumorales tienen además: (vii) una bioenergética desregulada; (viii) evitan el sistema inmunitario mediante diferentes mecanismos; (ix) aumentan las variaciones genéticas; y (x) generan un microambiente proinflamatorio mediante la liberación de citoquinas (3).



Figura 1. Características celulares y moleculares de los diversos tumores. Imagen adaptada de (3).

2.2. Efecto Warburg y metabolismo del cáncer

La proliferación celular es un proceso necesario para que se pueda producir la tumorigénesis. Existen numerosos estudios sobre los mecanismos que inducen esta proliferación celular en los que se identifican diferentes factores de crecimiento de diversas vías de transducción de señales y redes transcripcionales para iniciar y mantener el ciclo celular. Durante el proceso de proliferación celular surgen cambios metabólicos ya que las células desvían metabolitos a rutas anabólicas para la biosíntesis de lípidos y de otras macromoléculas, mientras que también poseen tasas glucolíticas altas y se produce un aumento de la producción de lactato. El papel relevante del HIF-1 α en la mediación de la angiogénesis, la proliferación, la invasión y la regulación de la expresión de enzimas glucolíticas en las células tumorales ha llevado a proponer el bloqueo de la señal de HIF-1 α como una nueva diana terapéutica prometedora en pacientes con tumores hipóticos. Sin embargo, se ha podido demostrar que la concentración de O₂ en las regiones hipóticas de los tumores parece no ser limitante para el funcionamiento de la fosforilación oxidativa (4).

Hay que señalar que en el metabolismo tumoral no influye únicamente el metabolismo proliferativo celular ya que existen factores dentro del microambiente tumoral que lo pueden modificar dando lugar a una actividad metabólica heterogénea. Las células normales en proliferación utilizan la glucólisis aeróbica mientras que las células tumorales que proliferan rápidamente consumen glucosa en una glucólisis anaerobia a una tasa mucho más alta que las células normales. Este mecanismo metabólico se denomina *efecto Warburg* y continúa con un proceso de fermentación láctica en vez de producir energía siguiendo la respiración celular. Este metabolismo anaerobio también conduce a una mayor generación de ROS. Muchas líneas tumorales, sin embargo, no presentan ninguna mutación que afecte al metabolismo oxidativo por lo que puede parecer una paradoja que células que necesitan de ATP para su proliferación empleen una ruta catabólica con menor rendimiento energético. Se puede explicar esta posible contradicción ya que si el flujo glucolítico es suficiente y constante, se puede llegar a compensar la energía producida por la fosforilación oxidativa (5) (6).

Las células tumorales muestran un flujo glucolítico aumentado pero no todas tienen una capacidad metabólica mitocondrial disminuida, por lo que no todos los tipos de células tumorales dependen exclusivamente de la glucólisis para el suministro de ATP y algunos pueden depender igual o predominantemente de la fosforilación oxidativa. La proliferación celular acelerada también puede imponer una deficiencia energética, así como una mayor demanda de intermediarios glucolíticos y biosintéticos del ciclo de Krebs, que solo puede cubrirse con un aumento de la glucólisis junto con una fosforilación oxidativa no perturbada (7) (8).

Una alta tasa glucolítica proporciona varias ventajas para la proliferación celular ya que, aunque el rendimiento de ATP por cada molécula de glucosa es bajo, si el flujo es suficientemente alto, se produce una gran cantidad de ATP. Además, esta degradación de la glucosa proporciona a la célula los intermediarios necesarios para otras rutas metabólicas como la síntesis de nucleótidos o la producción de glicerol y citrato para la síntesis de lípidos. De esta manera, el *efecto Warburg* beneficia a la célula tanto en procesos bioenergéticos como en la biosíntesis celular. La tasa alta de producción de lactato se puede explicar fácilmente ya que la glucólisis supera la máxima velocidad de oxidación del piruvato que las células tienen que eliminar mediante otras rutas

metabólicas. Hay que tener en cuenta que la oxidación del piruvato requiere de la importación a la matriz mitocondrial y de la catálisis de diferentes enzimas como el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) que se encuentra regulada por la relación entre NAD^+ y NADH , que pueden verse sobrepasadas por la velocidad glucolítica durante la proliferación celular. Este problema se resuelve mediante la sobreexpresión de la lactato deshidrogenasa A (LDH-A) que cataliza la reducción del piruvato generando NAD^+ y lactato. Esta enzima es inducida por oncogenes como *c-myc* y *HER2/neu* por lo que tiene un papel destacado en la proliferación celular (5) (6) (7) (8).

2.3. Mitocondrias y sistema OXPHOS

La mitocondria es el orgánulo citoplasmático dinámico responsable de la síntesis de la mayoría de ATP de las células eucariotas mediante la fosforilación oxidativa. Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana mitocondrial interna y otra externa separadas por un espacio intermembrana. La membrana interna forma numerosos pliegues denominados crestas mitocondriales que se extienden hacia la matriz del orgánulo. La viabilidad celular depende del funcionamiento eficaz de las mitocondrias ya que constituyen las principales fuentes de energía celular.

El sistema OXPHOS está compuesto por alrededor de 85 proteínas implicadas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa, de las cuales solo 13 están codificadas por el mtDNA (9). De todos los complejos del sistema OXPHOS, el CII es el único con todas las subunidades codificadas en el genoma nuclear. El sistema OXPHOS se encuentra formado por cuatro complejos de oxidoreductasas, la NADH deshidrogenasa (complejo I), la succinato deshidrogenasa (complejo II), la citocromo c reductasa (complejo III) y la citocromo c oxidasa (complejo IV), además de la ATP sintasa (complejo V), que se encuentran en la membrana interna mitocondrial en los organismos eucariotas. La mayor parte de la energía liberada del metabolismo oxidativo es producida por el proceso de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la membrana mitocondrial interna. Previamente, el acetil CoA se oxida en la matriz mitocondrial a CO_2 por medio del ácido cítrico unido a la reducción de NAD^+ y FAD a NADH y FADH_2 respectivamente (10).

Los electrones de alta energía del NADH y FADH_2 se transfieren al oxígeno molecular a través de una serie de transportadores de membrana. La energía derivada de estas reacciones de transferencia de electrones se convierte en energía potencial acumulada en forma de un gradiente de protones a través de la membrana, que es utilizada para dirigir la síntesis de ATP. Los electrones del NADH entran en la cadena de transportes de electrones en el complejo I para después ser transferidos por la coenzima Q al complejo III y a continuación por el citocromo c al complejo IV donde se transfieren a oxígeno molecular para generar H_2O . Estas transferencias se encuentran asociadas a una disminución de la energía libre que es empleada para el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana para inducir la síntesis de ATP cuando los protones regresan a la matriz mitocondrial a través del complejo V. Además de su función en el transporte electrónico, el citocromo c es un regulador clave en la vía intrínseca mitocondrial de la apoptosis en las células de mamíferos. Los electrones procedentes del succinato entran en la cadena transportadora de electrones a través del FADH_2 en el complejo II.

Después se transfieren al complejo III por medio de la coenzima Q para seguir a continuación el mismo procedimiento comentado anteriormente. (10)

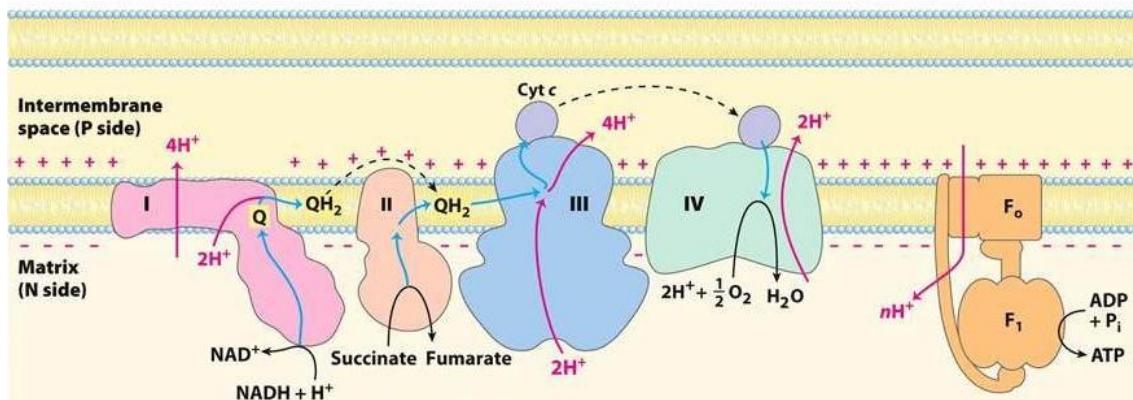


Figura 2. Representación esquemática de los componentes del sistema OXPHOS.

Imagen de *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth Edition (2013).

Se puede explicar la organización supramolecular de los complejos respiratorios siguiendo dos modelos extremos conocidos como *modelo fluido* y *modelo sólido*. Según el *modelo fluido*, los complejos I a IV difunden de forma libre en la membrana interna mitocondrial y la transferencia de electrones está basada en colisiones aleatorias de los componentes involucrados. Este modelo encuentra su respaldo en que los complejos se pueden aislar por separado bajo ciertas condiciones empleando membranas mitocondriales aisladas, aunque no termina de explicar muchas evidencias. Sin embargo, existen más evidencias que demuestran que muchos procedimientos de aislamiento dan como resultado la copurificación de complejos respiratorios que se encuentran con una estequiometría definida y, además, mutaciones dentro de genes que codifican para subunidades de complejos respiratorios afectan a la estabilidad del resto del sistema OXPHOS. Todo esto apoyaría la teoría del *modelo sólido*, que define la cadena de transporte electrónico mitocondrial como una entidad rígida en la que los complejos respiratorios se mantienen juntos para asegurar una alta actividad catalítica.

De esta manera, las interacciones entre los complejos respiratorios indican que no son sólidos completamente, por lo que hay que considerar una naturaleza dinámica de los complejos respiratorios. Todos los complejos respiratorios, excepto el complejo II, se pueden asociar en los denominados supercomplejos respiratorios. Se proponen como supercomplejos (SCs) el respirasoma que se encuentra formado por los complejos I, III y IV, un SC formado por los complejos I y III y otro SC formado por los complejos III y IV. Sin embargo, el papel de estos SCs no está claro del todo y se puede debatir su existencia, aunque se han podido demostrar mediante modulación genética las interacciones entre los complejos I y III, y los complejos III y IV, y que el complejo I en ausencia de los complejos III o IV es inestable en su función. De esta manera, se pueden considerar tanto al *modelo fluido* como al *modelo sólido* como dos situaciones extremas de unas condiciones dinámicas en las que pueden coexistir tanto el respirasoma, como el resto de los SCs, como complejos respiratorios libres, como recoge el nuevo *modelo de plasticidad*. Este modelo permite la explicación de observaciones previas como la dependencia entre la estabilidad del complejo I y la presencia física del complejo III o IV, la existencia de diferentes proporciones de supercomplejos en diferentes tipos de

células y los estudios cinéticos que apoyan la existencia de diferentes conjuntos de CoQ. Sin embargo, la demostración de la funcionalidad del respirasoma no excluye la posibilidad de que la respiración también tenga lugar por transferencia de electrones entre complejos libres, una idea apoyada por varios estudios. El *modelo de plasticidad* predice que el mETC debería poder funcionar cuando no se produce el ensamblaje de supercomplejos y se puede comprobar mediante la ausencia de SCAF1 que es un factor proteico necesario para la integración del complejo IV en supercomplejos (11) (12) (13) (14).

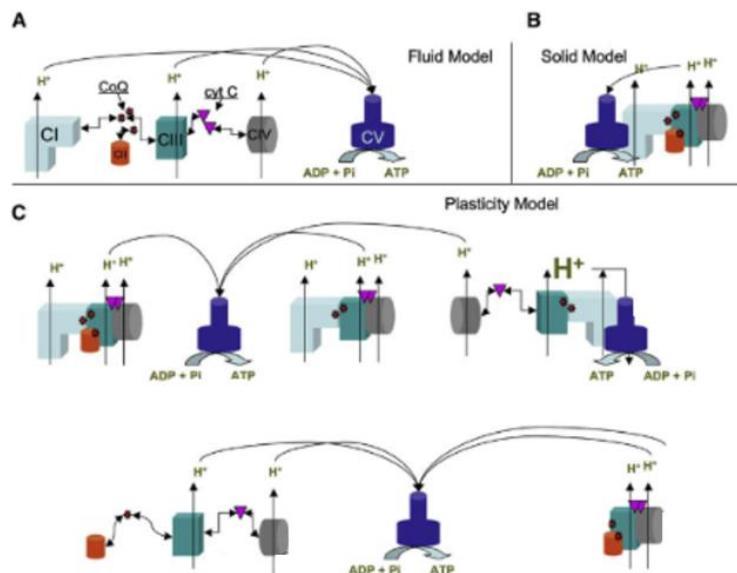


Figura 3. Representación esquemática del sistema OXPHOS según el *modelo fluido* (A), el *modelo sólido* (B) y el *modelo de plasticidad* (C). Imagen adaptada de (14).

2.4. Mitochondrias y su relación en procesos tumorales

Las mitocondrias son orgánulos complejos que influyen en el desarrollo tumoral en diferentes etapas del cáncer como pueden ser el crecimiento, la supervivencia y la metástasis. Se ha conseguido demostrar que la biología mitocondrial contribuye de forma activa a la tumorigénesis regulando diferentes procesos, además de la regulación metabólica de la producción de energía, entre los que se pueden incluir los cambios dinámicos de la masa mitocondrial, la regulación de apoptosis por la vía intrínseca y la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la acción catalítica de diferentes enzimas antioxidantes como superóxido dismutasas (6) (15).

Se conocen eventos transformadores que conducen a mutaciones oncocéntricas relacionados con vías de señalización celular y mutaciones en el metabolismo mitocondrial, debido a la flexibilidad de este orgánulo para adaptarse a situaciones de estrés oxidativo y a condiciones energéticas adversas que permiten que se pueda llevar a cabo la tumorigénesis. Con el objetivo de poder llegar a un tratamiento completo del cáncer será necesario incluir terapias específicas que consigan que las mitocondrias no sean capaces de escaparse del tratamiento antitumoral (6) (16) (17).

Cuando la generación de ROS mitocondriales es demasiado alta se pueden inducir la vía intrínseca mitocondrial de la apoptosis o los mecanismos de necroptosis, aunque las ROS mitocondriales también son moléculas de señalización importantes y mitógenos potentes. De esta manera, si se inhibe la apoptosis, el aumento de la producción de ROS puede contribuir a la formación y proliferación de tumores neoplásicos. La producción de ROS mitocondrial y el equilibrio redox están modulados por el gradiente electroquímico de membrana. El superóxido de la matriz mitocondrial se puede dismutar en H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa 2 codificada por el gen nuclear SOD2. Se ha observado que se produce la inhibición de la ATP sintasa en varios carcinomas a causa de niveles elevados del factor inhibidor 1 de la ATP sintasa (IF1). El aumento de los niveles de expresión de IF1 en los carcinomas da como resultado una disminución de la glucólisis y un aumento de la OXPHOS aumentando el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS (13) (14).

Se ha demostrado la existencia de diferentes mutaciones en el mtDNA con un impacto en la tumorigénesis. La consecuencia funcional de muchas de estas mutaciones no se comprende correctamente, aunque se conoce que algunas ocurren en los genes de la cadena de transporte de electrones. Estas mutaciones pueden aumentar el estrés oxidativo que promueve el desarrollo tumoral en las etapas iniciales, ya que las ROS pueden activar diferentes vías de señalización celular como la vía de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) o la activación de factores de transcripción como HIF-1 α y NF- κ B, que promueven la proliferación celular y la supervivencia metabólica de las células tumorales. Sin embargo, en estadios más avanzados de la tumorigénesis la acumulación excesiva de ROS podría inducir los mecanismos de muerte celular programada (16).

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Existe una compleja relación entre la tumorigénesis, la función mitocondrial y la producción de ROS, puesto que participan diferentes mecanismos que pueden llegar a tener efectos contrapuestos. De esta manera, es necesario seguir realizando estudios para poder llegar a comprender de manera correcta las características celulares y moleculares de la regulación conjunta de estos procesos.

Se conoce que la relación entre los SCs y las ROS es recíproca. Por una parte, el ensamblaje molecular de los SCs afecta a la producción de ROS que se ve aumentada en ausencia de ensamblaje de SCs. Por otra parte, el daño oxidativo causado por las ROS afecta a la funcionalidad de los complejos y de los SCs respiratorios. Se ha podido demostrar que la capacidad mitocondrial disminuye notablemente cuando se acumulan daños oxidativos (18).

Estudios *in vitro* han demostrado que la formación de ROS a nivel de CI se ve aumentada cuando se impide o se altera la formación del SC I+III (19). En ocasiones, defectos en la ETC pueden proporcionar a las células tumorales una serie de ventajas proliferativas bajo determinadas condiciones específicas. Como continuación a estos estudios, se ha demostrado que existen determinadas modificaciones en la organización molecular de los SCs para líneas celulares con diferente capacidad invasiva (12).

El trabajo se encuentra integrado en una investigación en curso para tratar de entender el papel de la cadena de transporte electrónica en procesos tumorales y encontrar una

relación con la diferente capacidad de invasión todavía sin determinar de estas líneas tumorales. Los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

- Analizar la funcionalidad y la organización del sistema OXPHOS en diferentes líneas celulares tumorales con distinta capacidad de migración.
- Evaluar el papel que juegan distintos factores ambientales como las ROS sobre el ensamblaje y la estabilidad de los SCs.
- Analizar los niveles de producción de ROS en las líneas celulares tumorales y su capacidad detoxificadora.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivos celulares

4.1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este TFG son TmMCF7, Tm468 y Tm231, que son líneas celulares transmitocondriales generadas en el laboratorio mediante transferencia de mitocondrias de las líneas epiteliales humanas de cáncer de mama, MCF7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 al entorno nuclear de la línea de osteosarcoma humano 143B (20). Como control para todos los experimentos se emplea la línea transmitocondrial 613 generada por la fusión de células 143p0 (osteosarcoma carente de mtDNA) con plaquetas de un donante sano de haplogrupo H (20).

4.1.2. Medios de cultivo

Para la siembra celular se emplea el medio de cultivo DMEM (Gibco) que contiene D-glucosa (4.5 g/L), L-glutamina y piruvato y que es necesario suplementar con SFB al 10% y 1% de una mezcla de antibióticos compuesta por 10000 U/mL de penicilina G sódica y 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina (Invitrogen). Además, para realizar las curvas de crecimiento se utiliza también un medio de galactosa obtenido a partir de un medio DMEM que no contiene ni glucosa ni piruvato al que se le añade 0.9 g/L de galactosa, 0.11 g/L de piruvato sódico, 10% de SFB y 1% de la mezcla de antibióticos.

4.1.3. Cultivo y siembra celular

Las células se siembran en placas de Petri de 100 o 150 mm de diámetro con una densidad de 10^4 - 10^5 células/mL de medio de cultivo a las que se añaden 0.2 mL de medio/cm² de superficie. Las placas de cultivo se mantienen en una estufa a 37°C con una atmósfera húmeda y 5% de CO₂ y es necesario cambiar el medio de cultivo aproximadamente cada 2-3 días. Una vez las células alcanzan la confluencia, es necesario replicar las células para lo que se elimina el medio por succión y se lavan las células empleando PBS pH 7.4 (Gibco) con la finalidad de eliminar las proteínas del suero que inhiben la acción de la tripsina. Después de eliminar el PBS de las placas, se añade 0.033 mL/cm² de una mezcla al 0.05% de tripsina (SIGMA) y 0.02% EDTA preparada en PBS y esterilizada por filtración (0.22 µm) y se incuba a 37°C durante el menor tiempo posible. Después de comprobar que las células se han despegado, se recogen en medio de cultivo suplementado con SFB en un tubo Falcon de fondo cónico de 15 mL para centrifugarlas durante 5 minutos a 1500 g.

Toda la manipulación de las líneas celulares se realiza en campana de flujo laminar con todo el material esterilizado con etanol al 70% y bajo luz UV antes y después de cada sesión de trabajo. Todos los medios usados para el mantenimiento de los cultivos celulares son precalentados antes de su utilización en un baño de agua a 37°C.

4.1.4. Recuento celular

Se toma una alícuota de 50 μ L en un tubo Eppendorf de la suspensión celular y se mezcla con 50 μ L de colorante Azul Trypan 0.4 % en NaCl 0.15 M. El recuento se realiza empleando una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad en la se coloca correctamente un cubreobjetos y sobre la que se depositan alrededor de 15 μ L de la muestra celular. Se calcula la concentración celular siguiendo la siguiente fórmula.

$$\frac{n^o \text{ células}}{mL} = \frac{n^o \text{ células viables contadas} * \text{dilución} * 10^4}{n^o \text{ cuadrantes contados}}$$

4.1.5. Curvas de crecimiento

Para determinar la velocidad del crecimiento celular en glucosa y galactosa se realizan curvas de crecimiento y se calcula el tiempo de duplicación celular en ambos medios. Para ello se utilizan placas de microcultivo de 6 o 12 pocillos y se siembran inicialmente 30000 células / pocillo. El recuento celular se lleva a cabo cada 24 horas hasta las 120 horas. Se representa el número de células frente al tiempo que se ajusta a una curva exponencial de tipo $y = ae^{bx}$ y se calcula el tiempo de duplicación mediante la siguiente fórmula, $DT = \ln(2) / b$.

4.1.6 Congelación y descongelación de líneas celulares

Para la congelación de las líneas celulares, el pellet obtenido tras la tripsinización y centrifugación se resuspende en 500 μ L de medio que contenga un 10% de DMSO y se traspasa a un criotubo que se introduce inicialmente en un congelador a -80 °C y, tras pasar 24 horas, se pasa al congelador de nitrógeno líquido a -195.8 °C.

Para la descongelación de las líneas celulares se recupera el criotubo del contenedor de nitrógeno líquido y se descongela manteniéndolo en un baño de agua a 37 °C durante unos pocos segundos. Seguidamente, se pasa la suspensión celular a un tubo Falcon de fondo cónico de 15 mL con 8 mL de PBS suplementado con 10% de SFB y se centrifuga 5 minutos a 1000 g durante 10 minutos para eliminar el DMSO. El precipitado se resuspende en medio de cultivo y se siembra en una placa del tamaño adecuado.

4.2. Extracción de ácidos nucleicos

4.2.1. Extracción de DNA de células en cultivo y cuantificación

Para realizar la extracción de DNA de células de cultivo se emplea el kit QIAamp de Qiagen y se siguen las instrucciones del fabricante. Las muestras de DNA se guardan en el congelador a -80 °C hasta que van a ser empleadas. Cuando van a utilizarse las muestras de DNA hay que determinar su concentración y su pureza empleando un Nanodrop después de descongelar las muestras. La relación entre las absorbancias $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ se relaciona con el grado de pureza de la muestra y se considera que la muestra para RNA es pura cuando se obtiene un valor aproximado de 2.0.

4.2.2. Extracción de RNA de células en cultivo y cuantificación

Para realizar la extracción de RNA de células de cultivo se sigue el protocolo *TRIZOL RNA Isolation* desarrollado por Invitrogen. Hay que trabajar en campana de flujo laminar y limpiar bien la superficie y las pipetas con etanol para evitar la contaminación de RNAsas. Las muestras de RNA se guardan en el congelador a -80 °C hasta que van a ser empleadas. Cuando van a utilizarse las muestras de RNA hay que determinar su concentración y su pureza empleando un Nanodrop después de descongelar las muestras. La relación entre las absorbancias $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ se relaciona con el grado de pureza de la muestra y se considera que la muestra para RNA es pura cuando se obtiene un valor aproximado de 1.8.

4.3. Análisis de complejos mitocondriales por Blue Native

4.3.1. Purificación de mitocondrias

En primer lugar hay que trypsinizar las células en el menor tiempo posible y recoger en medio con 10 % SFB. Después, hay que lavar el pellet por centrifugación dos veces con PBS frío, manteniendo las células en hielo antes de congelar los pellets a -70 °C durante al menos 10 minutos para facilitar la ruptura de las células. A continuación, se resuspende el pellet celular en 7 volúmenes de buffer hipotónico que contiene sacarosa 83 mM y MOPS 10 mM a un pH de 7.2. Después de incubar 2 minutos en hielo, hay que homogeneizar las células mediante 8-10 “pops” empleando un homogeneizador Potter-Dounce. Luego se añade 1 volumen de buffer hipertónico que contiene sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM a un pH de 7.2. Seguidamente, se centrifugan las muestras a 1000 g durante 5 minutos a 4°C. Se reparte el sobrenadante en nuevos tubos Eppendorfs y se realiza una centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos a 4 °C. Se lavan los pellets con medio MAITE (Sacarosa 25 mM; sorbitol 75 mM; KCl 100 mM; EDTA-Na 0.05 mM; MgCl₂ 1mM; Tris-HCl 10mM pH 7.4 y fosfato potásico 10 mM, pH 7.4) pasando el contenido varias veces hasta tener todas las mitocondrias en un único tubo. La concentración de proteína mitocondrial se evalúa por el método de Bradford empleando el reactivo de Bradford de BioRad (21) . Después, se resuspenden las mitocondrias a una concentración de 10 mg de proteína / mL empleando ácido aminocapróico 1 M, 50 mM Bis-Tris a un pH de 7.0 y se añade el detergente digitonina a una concentración de 4 g / g de proteína para observar posteriormente la formación de supercomplejos. Por último, hay que mezclar bien e incubar 5 minutos en hielo para después centrifugar a 13000 rpm durante 30 minutos y recoger el sobrenadante para añadir 1/3 del volumen final de tampón de carga Blue G al 5%.

4.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida Blue Native

Se emplean geles comerciales NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris de Invitrogen con un gradiente del 3 al 12% de poliacrilamida para separar los complejos respiratorios de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Después de montar el gel en un soporte adecuado, se añaden los tampones comerciales del cátodo A (50 mM tricina, 15 mM Bis-Tris pH 7.0 (4.0°C) y 0.02% Coomasie brilliant blue G-250) y del ánodo (50 mM Bis-Tris pH 7.0) en cámara fría. A continuación, se cargan las muestras y se inicia la electroforesis a un voltaje constante de 80 V durante 30 minutos y después se aumenta el voltaje a 150 V hasta que el colorante llega al extremo inferior del gel. Cuando las muestras avanzan 5-7 centímetros en el gel, se cambia el tampón del cátodo A por el

del cátodo B (50 mM tricina, 15 mM Bis-Tris pH 7.0 (4.0°C) y 0.002% Coomasie brilliant blue G-250) que presenta una menor concentración de colorante (22) (23).

4.3.3. Ensayo de Actividad en Gel (IGA)

Para la evaluación de la actividad de los complejos respiratorios se sumerge el gel con los sustratos a ensayar y se incuba a temperatura ambiente hasta que se pueden observar las bandas de precipitado. En el caso del complejo I, se emplea una solución compuesta por NADH 0.14 mM y NBT en Tris-HCl 0.1 M a un pH de 7.4, y para el complejo IV se emplea una solución que contiene DAB 0.05% y citocromo c 50 mM en buffer que contiene K_2HPO_4 y KH_2PO_4 denominado Kpi 50 μ M a un pH de 7.4 (24).

4.4. Medida de la respiración celular

Para evaluar el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial de las cuatro líneas celulares se mide el consumo de oxígeno en células intactas empleando un electrodo de oxígeno de Clark termostatizado (Oxytherm, Hansatech Instrument). Los datos obtenidos se registran en un programa informático llamado Oxygraph Plus V1.00.

Para las medidas de respiración endógena, cuando la respiración está acoplada a la síntesis de ATP, se recogen las células por tripsinización de una placa de cultivo de 150 mm y se separan 5×10^6 células para cada medida después de contarlas. Se resuspenden las células en 1 mL de medio de cultivo completo y se introducen en la cámara del electrodo para registrar la tasa de respiración endógena. Despues de 2-3 minutos, se añaden 10 μ L de una solución de DNP 6.5 mM para desacoplar la cadena respiratoria y detectar la máxima capacidad OXPHOS de las células. Despues de otros 2-3 minutos, se añaden 10 μ L de KCN 400 mM para inhibir el consumo de oxígeno asociado a la cadena de transporte electrónico.

4.5. Determinación de masa y superóxido mitocondrial mediante citometría

Para estos ensayos se emplean placas de microcultivo de 12 pocillos y se siembran 100000 células por pocillo. Un día después, se realiza el marcaje empleando diferentes sondas fluorescentes. Para medir la masa mitocondrial, las células se incuban con Mitotracker Green (Molecular Probes) a una concentración de 200 nM durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavan las células un par de veces con PBS y se incuban con medio DMEM fresco durante 30 minutos en oscuridad a 37°C. Por último, las células se lavan con PBS y se recogen por tripsinización. Para las medidas de superóxido mitocondrial, las células se incuban con MitoSOX (Molecular Probes) a una concentración de 5 μ M durante 30 minutos a 37°C. Despues, se lavan las células con PBS y se recogen por tripsinización.

En los dos ensayos, el precipitado se resuspende en un volumen de 200 μ L de PBS y se mide por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia empleando un citómetro FACSCalibur. Los datos de citometría se recogen mediante el software CellQuestPro y se analizan mediante el programa informático FlowJo.

4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.6.1. Obtención de cDNA monocatenario

Se obtiene cDNA a partir del RNA de las células en cultivo empleando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Sintesis Kit* de Roche y se utiliza un termociclador T300 de Biometra. Primero, se realiza la mezcla de RNA total, oligo(dT)₁₈ y agua. A continuación, se desnaturaliza la mezcla en un Thermoblock durante 10 minutos a 65°C. Despues, se añaden a la muestra el de buffer de reacción, el inhibidor de RNAsas, los dNTPs y la enzima transcriptasa reversa. Por ultimo, las muestras se colocan en el termociclador para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción durante 30 minutos a 55 °C y despues durante 5 minutos a 85 °C para inactivar la enzima transcriptasa reversa. Para parar la reacción hay que colocar los tubos con las muestras en hielo. El cDNA se puede almacenar entre 2 y 8 °C durante 1-2 horas o a -20°C durante periodos de tiempo más largos.

	Volumen (μL)	Concentración final
RNA total	Variable	1 μg (0.05 μg/μL)
Oligo(dT) ₁₈	1	2.5 μM
Agua	Hasta 20	-
Buffer de reacción	4	1X (8mM MgCl ₂)
Inhibidor de RNAsas	0.5	20 U
dNTPs	2	1 mM
Transcriptasa reversa	0.5	10 U

Figura 4. Tabla de reactivos para la síntesis de cDNA.

4.6.2. PCR en tiempo real

Se realiza PCR en tiempo real empleando el sistema capilar *LightCycler 2.0* y el kit *LightCycler FastStart DNA MASTER^{PLUS} SYBR GREEN I* de Roche para el DNA genómico y para el cDNA monocatenario obtenido. En cada capilar se añaden 2 μL de Master Mix, 0.25 μL de Primer Mix que contiene los cebadores directo y reverso a una concentración final de 5 μM, 6.25 μL de agua destilada y 1.5 μL de DNA o cDNA en una dilución 1/10. Las secuencias de los cebadores se encuentran en las tablas A y B del anexo I y el programa de PCR se incluye en la tabla C del anexo I.

La PCR en tiempo real a partir de DNA genómico se realiza para cuantificar el número de copias de mtDNA respecto al número de copias del DNA nuclear amplificando el gen de la succinato deshidrogenasa (SDH) característico del genoma nuclear y la subunidad II de la citocromo c oxidasa (COX2) y el bucle D característicos del genoma mitocondrial. Se obtiene el valor del cycle threshold (Ct) que representa el punto en el que se detecta por primera vez la señal fluorescente del producto de PCR. Se calculan los valores mediante la siguiente fórmula, donde ΔCt es igual a la diferencia entre el Ct nuclear y el Ct mitocondrial.

$$\text{Número de copias} \frac{mtDNA}{nDNA} = 2^{\Delta Ct}$$

En la PCR en tiempo real a partir de cDNA se cuantifica la expresión del transcripto de la enzima antioxidante superóxido dismutasa 2 (SOD2) y del factor inhibidor 1 de la

ATPasa (IF1) respecto a la expresión del transcripto de la actina mediante la siguiente fórmula, donde ΔCt es igual a la diferencia entre el Ct del transcripto de la actina y el Ct del transcripto de interés.

$$\text{Número de copias} \frac{\text{Transcripto de interés}}{\text{Transcripto de actina}} = 2^{\Delta Ct}$$

4.7. Medidas de temperatura intracelular

Para medir la temperatura intracelular, se siembran 48 horas antes del ensayo unas 160000 células en placas “Ibidi” para microscopía de 35 mm de diámetro. Se añaden las nanopartículas (RPZ-795), que contienen una mezcla de lantánidos (Sm y Eu) que actúan como nanotermómetro, a una dilución del 10%, en medio libre de fosfatos y se dejan durante 24 horas más. Se elimina el medio, se lava con NaCl 0.9% y se añaden NaCl y glucosa a una concentración de 0.9 g/L para la medida. La medida de temperatura se realiza mediante microscopía, gracias a las diferencias en emisión de luminiscencia de los iones de lantánidos utilizados. La captura de imágenes se controla mediante una secuencia de procesamiento de Labview y los mapas 2D de temperatura se obtienen a partir de la imagen siguiendo una rutina Matlab.

4.8. Medidas de la citotoxicidad de DCA

Para la determinación del efecto de fármacos sobre las células se emplea el método de Mosmann modificado que relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul de formazán insolubles en medio acuoso, producidos por oxidación del MTT (bromuro de dimetil-tiazoliltetrazolio, Sigma) (25). Los resultados de este método, a través de la comparativa de cristales formados, proporcionan información de la alteración en la proliferación celular inducida por un fármaco o agente que produce inhibición del crecimiento y/o la muerte celular. Las células se cultivan a distintas concentraciones de células/pocillo (2000 o 5000) en placas de 96 pocillos de fondo plano y se dejan crecer en presencia de DCA a diferentes concentraciones durante 72h, renovando el medio con el fármaco tras 48h de cultivo. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se añade a cada pocillo 50 μ L de una disolución de MTT (5 mg/ml) con una pipeta de repetición. Las placas se incuban 2-3 horas a 37 °C y se elimina el sobrenadante de los pocillos. Los cristales de formazán formados se disuelven añadiendo a cada pocillo 200 μ L de DMSO dejando remover en una placa agitadora. Se mide la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas ELISA (MR5000, Dynatech). Como blanco se emplea medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones del fármaco respecto al control de células no tratadas.

4.9. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en los distintos ensayos se ha empleado el programa StatView 5.0. Después de aplicar el test de análisis de la varianza (ANOVA) se ha utilizado el test de t de Student (post hoc Fisher) para encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.

5. RESULTADOS

5.1. Funcionalidad del sistema OXPHOS

Las células tumorales realizan una serie de modificaciones metabólicas para asegurar su supervivencia y proliferación. En los estadios iniciales de la tumorigénesis destaca el efecto *Warburg*. Este efecto consiste en que las células tumorales emplean una glucolisis seguida de una fermentación láctica aumentando el flujo glucolítico, en lugar de obtener energía a través de la fosforilación oxidativa. Para comprobar si este fenómeno se produce, se realizan ensayos de crecimiento celular en dos medios diferentes, un medio con glucosa que permite la supervivencia de todas las células y un medio con galactosa en el que las células con un sistema OXPHOS reducido o dañado tardarán más tiempo en poder crecer y sobrevivir, y se analizan las diferencias en la relación entre los tiempos de duplicación (DT) obtenidos en el medio de galactosa y en el medio de glucosa.

Se puede apreciar en la figura 5 que el valor de DT Gal / DT Glu de las líneas celulares TmMCF7 y Tm468 es algo superior al de la línea transmitocondrial 613 que se utiliza como control del crecimiento celular, por lo que crecen y sobreviven de manera correcta en los dos medios de cultivo. Sin embargo, se puede observar una ligera ralentización en el crecimiento de las líneas celulares en el medio de galactosa. La línea celular Tm231 presenta un incremento estadísticamente significativo en la relación de DT Gal / DT Glu respecto a la línea control, debido a la dificultad de supervivencia en el medio de galactosa que podría ser el resultado de deficiencias en el sistema OXPHOS.

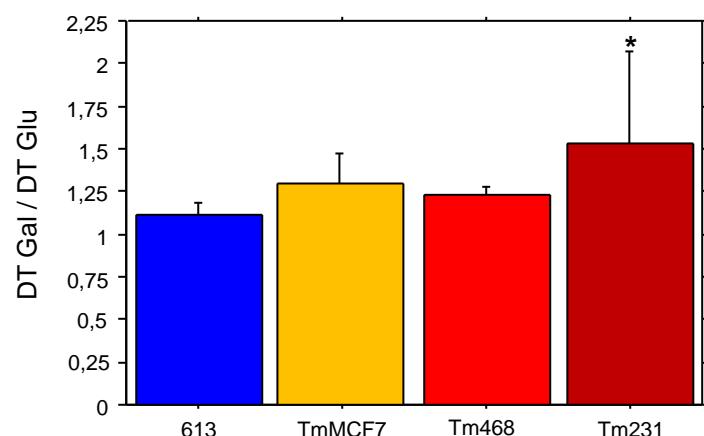


Figura 5. Relación de los tiempos de duplicación de las líneas tumorales en medio de galactosa y de glucosa (DT Gal/DT Glu). Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). $n\geq 3$. El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.A.

Para continuar con el análisis de la funcionalidad del sistema OXPHOS, se realiza un ensayo de medida de la respiración celular endógena, acoplada, y de la respiración celular desacoplada que representa la capacidad de respiración máxima, para evaluar posibles diferencias en el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico. Como se muestra en la figura 6A, la respiración endógena de las líneas tumorales TmMCF7 y Tm468 es muy similar entre ellas y respecto al control, mientras que para la respiración endógena de Tm231 se aprecia un descenso estadísticamente significativo. Al desacoplar la respiración de la síntesis de ATP con DNP, se observa un patrón similar

(Figura 6B), siendo la línea TmMCF7 la que muestra un mayor incremento en el consumo de oxígeno, lo que indica un mayor grado de acoplamiento entre ambos procesos. Así mismo, la línea Tm231 es la que representa un menor valor de respiración desacoplada que refleja una menor capacidad máxima de respiración por célula.

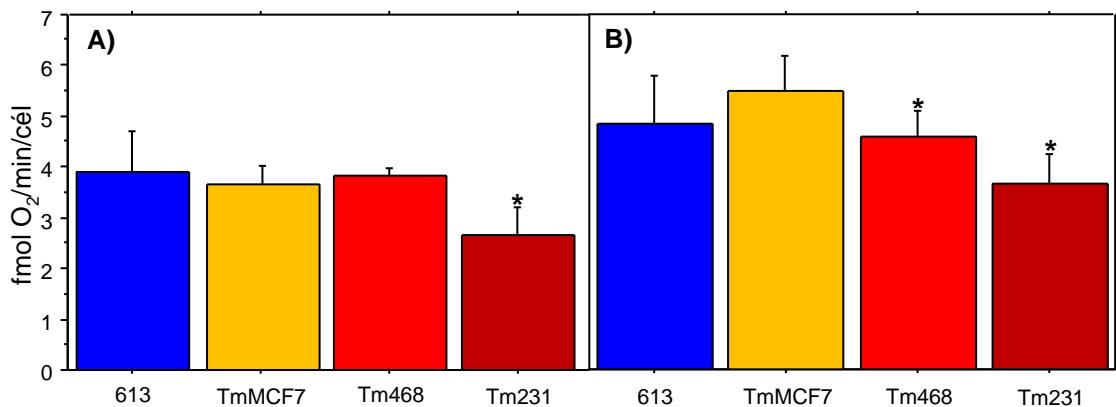


Figura 6. A) Respiración endógena. B) Respiración desacoplada. Consumo de oxígeno como fmol de O₂ por minuto y por célula. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$), $n\geq 3$. El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.B.

5.2. Funcionalidad de los complejos y supercomplejos respiratorios

Para analizar las asociaciones entre complejos respiratorios se estudia la actividad NADH deshidrogenasa del complejo I y la actividad citocromo c oxidasa del complejo IV mediante ensayos de *In Gel Activity* (IGA). Se emplean extractos mitocondriales aislados de las diferentes líneas celulares para realizar una electroforesis en gel nativo de poliacrilamida (Blue Native) que permite separar los complejos individuales y los supercomplejos respiratorios manteniendo su funcionalidad.

El complejo I aparece mayoritariamente en forma de supercomplejos respiratorios, mientras que el complejo I libre casi no se puede apreciar en estas líneas celulares. El patrón de bandas que se observa en la figura 7A es muy similar entre las diferentes líneas tumorales. En la figura 7B se aprecia cómo el complejo IV aparece tanto en su forma libre, en su forma dimérica, como formando supercomplejos respiratorios. Se distingue un patrón de bandas parecido con una actividad similar para las líneas tumorales TmMCF7 y Tm468, mientras que para Tm231 aparecen bandas con mayor intensidad que corresponden al complejo IV formando parte de diferentes supercomplejos. La forma monomérica del complejo IV se presenta como la forma mayoritaria en todas las líneas tumorales.

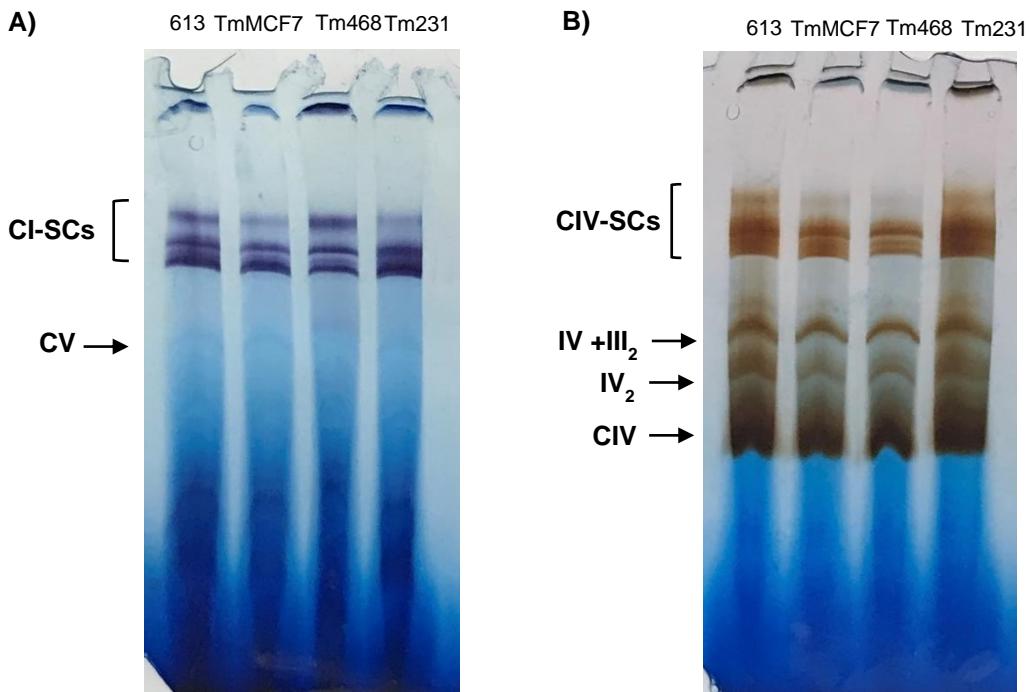


Figura 7. Resultados de los ensayos de actividad en gel (IGA) tras la electroforesis Blue-Native. A) Actividad NADH deshidrogenasa del complejo I. B) Actividad citocromo c oxidasa del complejo IV. Se carga la misma cantidad de proteína procedente de extractos mitocondriales.

5.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y superóxido dismutasa 2 (SOD2)

Las células tumorales se caracterizan también por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a defectos o alteraciones en la función OXPHOS. Las ROS pueden actuar como mutágenos produciendo daños en el mtDNA y como mitógenos activando diferentes vías de señalización celular con el objetivo final de favorecer la tumorigénesis. Para evitar un desencadenamiento de la muerte por necrosis debido a este aumento de ROS, las células tumorales aumentan la expresión de enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa 2 (SOD2), que dismuta el superóxido mitocondrial en peróxido de hidrogeno y oxígeno molecular. Los siguientes ensayos tienen una especial importancia en la funcionalidad de la cadena de transporte electrónica, ya que se ha relacionado el aumento de ROS con diferencias en el ensamblaje de los supercomplejos respiratorios.

Para medir el superóxido mitocondrial por citometría de flujo se emplea la sonda fluorescente MitoSOX (Molecular Probes) que no es oxidada ni por otras ROS ni por especies reactivas de nitrógeno. En la figura 8 se muestra el espectro de emisión de fluorescencia acompañado de una tabla con las intensidades de fluorescencia para cada línea celular. La línea tumoral Tm231 presenta la mayor cantidad de superóxido mitocondrial, como se observa por el desplazamiento del pico de fluorescencia hacia la derecha, mientras que no hay apenas diferencias en la producción de ROS entre las líneas 613, TmMCF7 y Tm468.

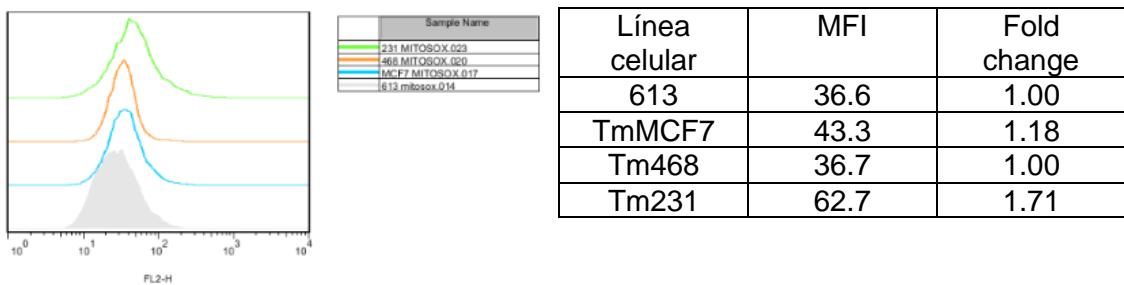


Figura 8. Histogramas de emisión de fluorescencia de MitoSOX. La línea tumoral TmMCF7 aparece en azul, Tm468 en naranja y Tm231 en verde. En la tabla se indica la relación de intensidades de fluorescencia entre las distintas líneas y el control.

Para evaluar si se ha producido un aumento en expresión de enzimas detoxificantes de ROS, se determina el nivel de expresión del transcripto de SOD2 respecto a la expresión del transcripto de la actina mediante una PCR en tiempo real a partir de cDNA. En la figura 9 se puede apreciar que los niveles de SOD2 en las líneas tumorales TmMCF7 y Tm468 son muy superiores al de la línea celular control, 613. La expresión de SOD2 en la línea tumoral Tm231 es similar a la de la línea control y significativamente inferior a la de las otras líneas, lo que podría explicar el incremento en los niveles de superóxido mitocondrial en esta línea, mientras que en las otras dos líneas se mantienen similares a los del control.

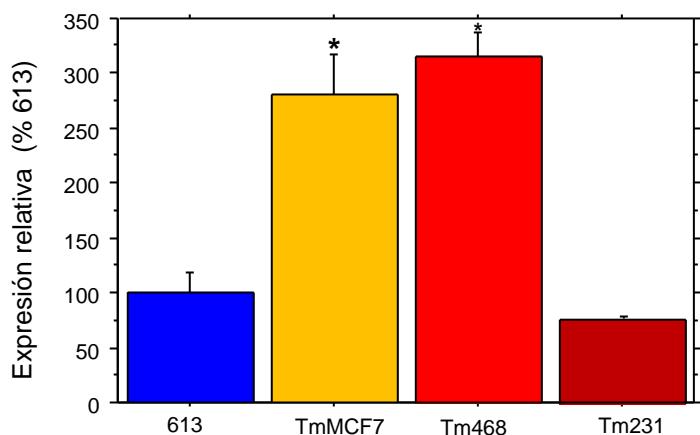


Figura 9. Expresión del transcripto de la enzima antioxidante SOD2. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar y se representan como porcentajes de la expresión de SOD2 frente a la de la actina respecto a la línea control. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). $n\geq 3$. El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.C.

5.4. Estimación de la masa y DNA mitocondrial

En las células tumorales se pueden producir también mutaciones puntuales y variaciones en el número de copias de mtDNA, debido a la proximidad física con la producción de ROS mitocondriales. Para evaluar si estos fenómenos se producen en las líneas celulares de este estudio, se calculan la masa mitocondrial y el número de copias de mtDNA mediante diferentes técnicas.

La masa mitocondrial se determina por citometría de flujo usando la sonda fluorescente Mitotracker Green (Molecular Probes) cuya acumulación en la mitocondria es independiente del potencial de membrana mitocondrial. Se mide este parámetro porque una disfunción OXHPOS puede ser causa de incremento de ROS, y estas ROS pueden ser una señal para aumentar la masa mitocondrial. De esta manera, se genera una respuesta adaptativa para que la producción de ATP no se vea mermada. En la figura 10 se puede observar el espectro de emisión de fluorescencia acompañado de una tabla con las intensidades de fluorescencia para cada línea celular. Se puede apreciar cómo las líneas tumorales Tm468 y Tm231 tienen el doble de masa mitocondrial que la línea transmitocondrial 613, mientras que la línea tumoral TmMCF7 aumenta en menor medida su biogénesis mitocondrial.

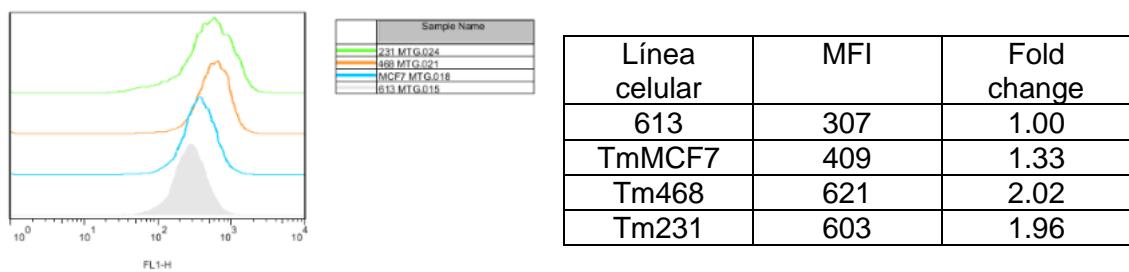


Figura 10. Histogramas de emisión de fluorescencia de Mitotracker Green. La línea tumoral TmMCF7 aparece en azul, Tm468 en naranja y Tm231 en verde. En la tabla se indica la relación de intensidades de fluorescencia entre las distintas líneas y el control.

Este aumento de masa mitocondrial en las líneas tumorales hace replantear los resultados de la respiración celular anteriormente comentados. A pesar del aumento de la biogénesis mitocondrial, las líneas tumorales consumen menor cantidad de oxígeno que la línea transmitocondrial 613 por lo que se reevalúa la respiración teniendo en cuenta este parámetro. En la figura 11 se puede observar cómo si normalizamos la tasa de respiración por la masa mitocondrial, se ponen de manifiesto diferencias estadísticamente significativas que se habían enmascarado por el aumento del número de mitocondrias inducido por ROS.

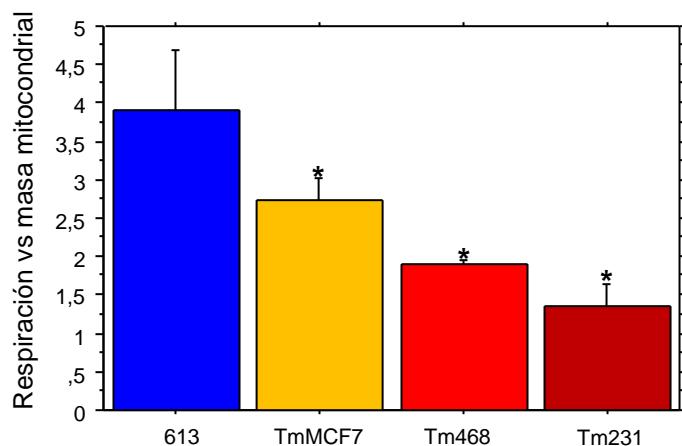


Figura 11. Respiración endógena normalizada por masa mitocondrial. Consumo de oxígeno como fmol de O₂ por minuto y por célula. Los datos se representan como la media ± desviación estándar. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas (p<0.05). n≥3. El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.D.

Para determinar si el número de copias de mtDNA en las líneas tumorales se encuentra alterado, como es característico de algunos tumores, medimos los niveles de mtDNA respecto a los niveles de DNA nuclear por qPCR. En la figura 12 se observa que la línea tumoral TmMCF7 presenta mayor cantidad de mtDNA que la línea transmitocondrial 613, mientras que las otras dos líneas celulares presentan depleción del número de copias de mtDNA respecto al control.

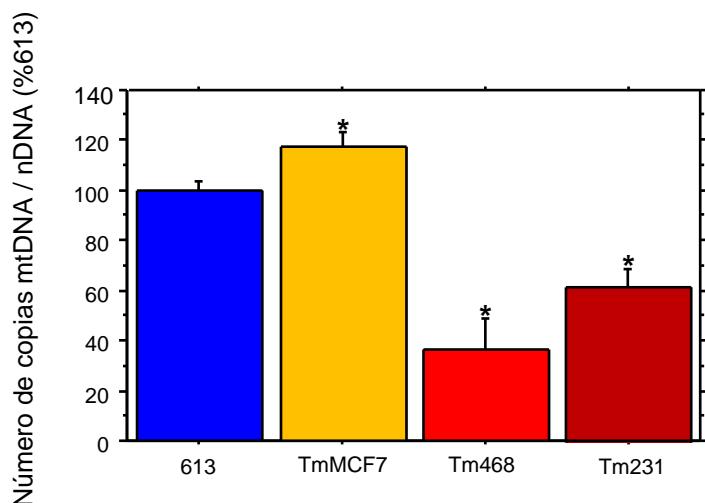


Figura 12. Cuantificación de número de copias de mtDNA. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar como porcentajes del número de copias de mtDNA respecto al número de copias del DNA nuclear. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). $n\geq 3$. El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.E.

5.5. Proliferación y supervivencia celular

Los resultados del método de Mosmann modificado proporcionan información de la alteración en la proliferación celular inducida por un fármaco o agente que produce inhibición del crecimiento y/o la muerte celular a través de la comparativa de cristales de formazán formados. En este ensayo se emplea ácido dicloroacético (DCA) que es un inhibidor de la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK). Un estudio reciente pudo demostrar que el DCA podría desencadenar un cambio metabólico que reduce el efecto Warburg haciendo que las células vuelvan a depender del sistema OXPHOS para la obtención de energía y aumentan la producción de las especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial. De esta manera, el DCA induce procesos de apoptosis y reduce la proliferación tumoral sin toxicidad aparente (26).

En la figura 14 se puede observar que la viabilidad se mantiene constante para las líneas tumorales Tm468 y Tm231 hasta una concentración de 15 mM de DCA. Sin embargo, la línea Tm231 sufre un descenso muy acusado en la supervivencia celular para concentraciones de 25 y 40 mM de DCA. Este descenso en la viabilidad celular a altas concentraciones de DCA se puede apreciar en menor medida para línea Tm468. También se observa cómo la línea tumoral TmMCF7 comienza a perder viabilidad a una concentración de 5 mM de DCA.

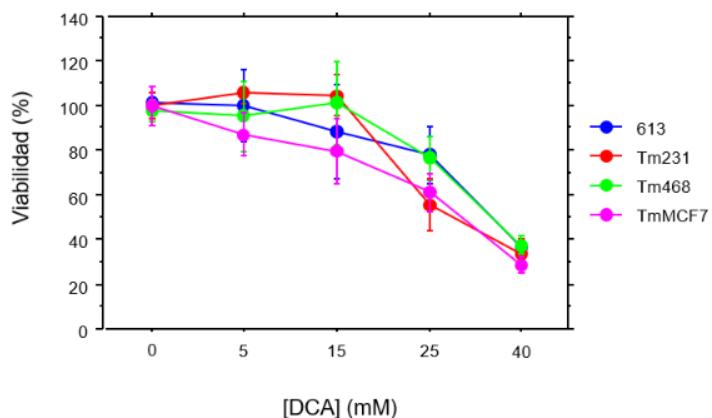


Figura 13. Viabilidad celular de las líneas tumorales frente a diferentes concentraciones de DCA. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar y se representan como porcentajes de viabilidad celular. El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.F.

5.6. Inhibición de la ATP sintasa

En diferentes carcinomas como, por ejemplo, en el cáncer de mama, la expresión de la ATP sintasa está disminuida en comparación con los tejidos sanos. Además, el factor inhibidor 1 de la ATP sintasa (IF1) se encuentra sobreexpresado en estos tumores (27). De esta manera, se promueve el efecto *Warburg* mediante una reprogramación metabólica hacia una glucolisis anaerobia acompañada de una fermentación láctica que viene acompañada de un aumento de la producción de las especies reactivas de oxígeno.

Para analizar esta situación en nuestras líneas, se determina el nivel de expresión del transcripto de IF1 respecto a la expresión del transcripto de la actina mediante una qPCR. Se puede ver en la figura 14 cómo IF1 se encuentra sobreexpresado en las líneas tumorales TmMCF7 y Tm468, mientras que en la línea Tm231 la expresión es bastante similar a la de la línea transmitocondrial 613.

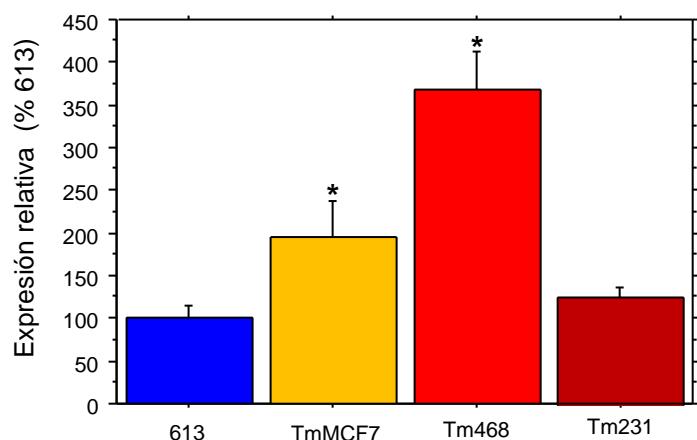


Figura 14. Expresión del transcripto de IF1. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar y se representan como porcentajes de la expresión de IF1 frente a la expresión del gen de la actina en cada línea celular respecto a la línea control. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). $n\geq 3$. El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.G.

5.7. Temperatura intracelular

Se ha considerado durante mucho tiempo que la temperatura afecta a la aparición de inflamación crónica y al desarrollo del tumor. Sin embargo, en la investigación de inmunología tumoral, la temperatura rara vez se considera como una variable significativa de estudio. La temperatura de las células tumorales puede tener una especial importancia en la tumorigénesis, por lo que estudios recientes se centran en la creación de un mejor microambiente antitumoral que pueda combinarse con la inmunoterapia para el tratamiento de estos tumores dependientes de la temperatura (28). Por este motivo, se mide la temperatura intracelular en las líneas celulares del estudio para determinar si existen diferencias entre ellas mediante el uso de nanotermómetros basados en lantánidos y microscopía.

En la figura 15 se puede apreciar cómo las líneas tumorales TmMCF7 y Tm231 presentan un incremento en la temperatura intracelular respecto a la temperatura extracelular si se comparan con la línea control 613. En la línea Tm231, que es la línea procedente de células con mayor capacidad de invasión, es donde se observa un aumento mayor de temperatura intracelular. Sin embargo, la temperatura intracelular disminuye en la línea tumoral Tm468 en comparación con la temperatura extracelular.

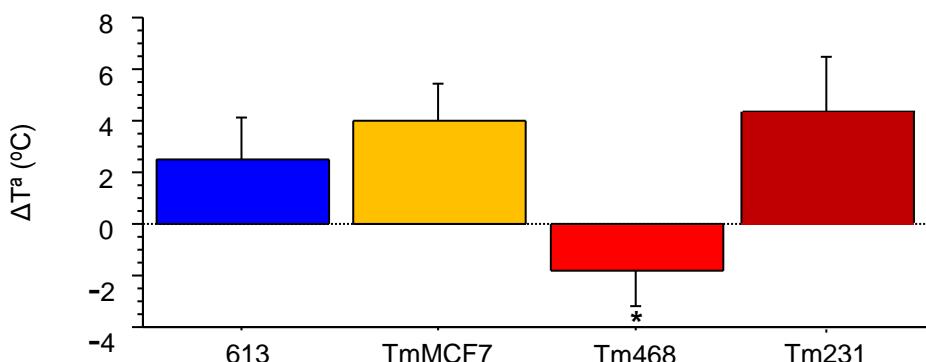


Figura 15. Variación de la temperatura intracelular de cada línea celular. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). $n\geq 3$. El análisis estadístico completo aparece en el anexo II.H.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se emplean células transmitocondriales generadas a partir de mitoplastos de células epiteliales humanas de cáncer de mama de diferente capacidad invasiva con el mismo fondo genético nuclear (20). Se ha evaluado la función y organización del sistema OXPHOS y la producción y detoxificación de ROS en dichas líneas para tratar de correlacionar cambios en estos parámetros con la capacidad invasiva de los tumores (18).

En primer lugar, se ha observado que la línea Tm231, que procede de la línea con mayor capacidad invasiva de las tres analizadas en el estudio, es la que presenta un fenotipo más glucolítico, con el mayor tiempo de duplicación en medio de galactosa (Figura 5). Además, la línea Tm231 sufre un descenso estadísticamente significativo tanto para la respiración endógena como para la respiración desacoplada (Figura 6). Estos resultados reflejan que la línea Tm231 presenta la capacidad máxima de respiración por célula más baja de las líneas en estudio, debido a posibles deficiencias en el sistema OXPHOS. Todo esto conlleva un incremento en la producción de superóxido

mitocondrial (Figura 8) que, a su vez, parece conducir a un aumento de la masa mitocondrial (Figura 10). Sin embargo, este mecanismo adaptativo no se traduce en una mejora de la función del sistema OXPHOS ni en un menor ensamblaje o estabilidad en la formación de los SCs respiratorios (Figura 11) (12).

En las tres líneas tumorales en estudio el patrón de bandas para la actividad NADH deshidrogenasa del CI es muy similar entre ellas y respecto al control, mientras que para la actividad citocromo c oxidasa del CIV se aprecian pequeñas diferencias en la línea tumoral Tm231 en comparación con las otras dos líneas tumorales (Figura 7). Tanto la línea Tm468 como la línea Tm231 presentan una depleción relativa del número de copias de mtDNA mientras que aumenta el número de copias de mtDNA en la línea TmMCF7, lo que permitiría explicar por qué en esta línea el fenotipo OXPHOS es más similar al de las células control (Figura 12).

El mayor grado de acoplamiento de las líneas en estudio entre la respiración celular y la síntesis de ATP se da en la línea tumoral TmMCF7 ya que se puede observar el mayor incremento en el consumo de oxígeno tras desacoplar la respiración de la síntesis de ATP (Figura 6). La expresión del transcripto de la enzima SOD2 es menor en las células de la línea Tm231 que en la línea transmiitocondrial control y esto podría explicar el incremento en los niveles de superóxido mitocondrial en esta línea (Figura 9) (15). Sin embargo, sería necesario analizar también los niveles de proteína funcional presentes y la actividad de la enzima.

La línea Tm231 presenta los descensos más pronunciados en su viabilidad celular en presencia de altas concentraciones de DCA debido a posibles deficiencias en el sistema OXPHOS (Figura 13) (26). El DCA es un inhibidor de la actividad de la enzima PDK que consigue revertir el efecto *Warburg* por lo que las células vuelven a depender del sistema OXPHOS para la obtención de energía (5). En las líneas tumorales TmMCF7 y Tm468 se encuentra sobreexpresado el factor inhibidor 1 de la ATP sintasa (IF1) que promueve la reprogramación metabólica característica del efecto *Warburg*, sin embargo la expresión de IF1 en la línea tumoral Tm231 se mantiene similar a la de la línea control (Figura 14) (27).

La masa mitocondrial se encuentra aumentada en todas las líneas tumorales, ya que la producción de ROS debida a deficiencias en el sistema OXPHOS puede actuar como importante señalizador para el aumento de la biogénesis mitocondrial (Figura 10) (17). Este mecanismo se puede explicar como una respuesta adaptativa para que la producción de ATP y otras funciones mitocondriales no se vean disminuidas más allá de un punto crítico. La temperatura tiene un papel importante en la tumorigénesis y en la inflamación crónica y se puede apreciar un incremento en la temperatura intracelular respecto a la temperatura extracelular tanto en TmMCF7 como en Tm231 (Figura 15) (28). Sin embargo, la temperatura intracelular no se puede emplear en este estudio como único marcador de la tumorigénesis ya que la línea tumoral Tm468 disminuye su temperatura intracelular en comparación con la temperatura extracelular.

Para poder relacionar la función OXPHOS con la capacidad invasiva en este modelo de una forma más sólida, sería conveniente realizar también ensayos de migración tumoral en estas nuevas líneas transmiitocondriales. Así mismo, para establecer relaciones más claras entre la alteración de la función mitocondrial, la producción de ROS, desarrollo tumoral y capacidad metastásica sería necesario analizar diferentes líneas tumorales procedentes de distintos tipos de cáncer.

7. CONCLUSIONES

- Los niveles de superóxido mitocondrial en la línea celular que proviene del cáncer de mama con mayor capacidad invasiva del estudio son muy elevados debido a que no hay sobreexpresión de enzimas detoxificadoras.
- La masa mitocondrial se ve aumentada en las líneas tumorales para compensar las deficiencias en el sistema OXPHOS, aunque se observa depleción del número de copias de mtDNA en algún caso.
- La línea Tm231 presenta la menor tasa de respiración, el nivel de ROS más alto y un mayor aumento en la temperatura con respecto al medio, lo que sugiere una mayor alteración o ineficiencia del sistema OXPHOS. Sin embargo, otros parámetros (respuesta a DCA, número de copias de mtDNA o ensamblaje de supercomplejos) no correlacionan con el nivel de invasividad, por lo que son necesarios más estudios y aumentar el número de líneas para poder sacar conclusiones más generales.
- Estos resultados, aunque parciales, apoyan la hipótesis de que las células tumorales presentan defectos mitocondriales que afectan a la funcionalidad del sistema OXPHOS y promueven la tumorigénesis acompañada de una reprogramación metabólica.

7. CONCLUSIONS

- Mitochondrial superoxide levels in the tumour cell line which comes from the most invasive breast cancer cell line in the study are remarkably high because there is no overexpression of detoxifying enzymes.
- Mitochondrial mass is increased in tumour cell lines to compensate for deficiencies in the OXPHOS system, although we can observe depletion of the number of copies of mtDNA in some cases.
- The Tm231 tumour cell line presents the lowest respiration rate, the highest ROS level, and a greater increase in temperature with respect to the medium, which suggests a greater alteration or inefficiency of the OXPHOS system. However, other parameters (response to DCA, number of copies of mtDNA or assembly of supercomplexes) do not correlate with the level of invasiveness, so further studies and increasing the number of lines are necessary to draw more general conclusions.
- These results, although partial, support the hypothesis that tumour cells present mitochondrial defects which affect the function of the OXPHOS system and promote tumorigenesis accompanied by metabolic reprogramming.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol*. 2017;11(7):805–23.
2. Hanahan D WR. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100 (1):57–70.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74.
4. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab*. 2008;7(1):11–20.
5. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* [Internet]. 2012;21(3):297–308.
6. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell* [Internet]. 2016;166(3):555–66.
7. Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMBS, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res* [Internet]. 2018;28(3):265–80.
8. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007;274(6):1393–418.
9. Nicholls TJ, Gustafsson CM. Separating and Segregating the Human Mitochondrial Genome. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2018;43(11):869–81.
10. M. Cooper G, E. Hausman R. *The Cell: a mollecular approach*, 7th edition. 2017. 89–91, 447–450 p.
11. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* (80-). 2013;340(6140):1567–70.
12. Marco-Brualla J, Al-Wasaby S, Soler R, Romanos E, Conde B, Justo-Méndez R, et al. Mutations in the ND2 subunit of mitochondrial complex I are sufficient to confer increased tumorigenic and metastatic potential to cancer cells. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):1–20.
13. Moreno-Loshuertos R, Enríquez JA. Respiratory supercomplexes and the functional segmentation of the CoQ pool. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016;100:5–13.
14. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol Cell*. 2008;32(4):529–39.
15. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2018;80:50–64.
16. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol* [Internet]. 2019;25:101084.
17. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol*. 2016;231(12):2570–81.
18. Gómez LA, Hagen TM. Age-related decline in mitochondrial bioenergetics: Does supercomplex destabilization determine lower oxidative capacity and higher superoxide production? *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2012;23(7):758–67.

19. Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., & Genova ML. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxidants Redox Signal.* 2013;19(13):1469–80.
20. King, M.P. and Attardi, G. "Human cells lacking mtDNA: repopulation with endogenous mitochondria by complementation", *Science*, 246 (4929):500-503; 1989.
21. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248-254.
22. Schägger, H and von Jagow G. (1991) *Anal. Biochem.* 199,223.
23. Schägger, H, Cramer A. and von Jagow G. (1994) *Anal. Biochem.* 217,220.
24. Schägger, H. (1996) *Methods in Enzymology*, 264, 555-566.
25. Mosmann, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods* 65, 55-63, 1983.
26. Zhou L, Liu L, Chai W, Zhao T, Jin X, Guo X, et al. Dichloroacetic acid upregulates apoptosis of ovarian cancer cells by regulating mitochondrial function. *Onco Targets Ther.* 2019;12:1729–39.
27. Barbato S, Sgarbi G, Gorini G, Baracca A, Solaini G. The inhibitor protein (IF1) of the F1F0-ATPase modulates human osteosarcoma cell bioenergetics. *J Biol Chem* [Internet]. 2015;290(10):6338–48
28. Bakker A, van der Zee J, van Tienhoven G, Kok HP, Rasch CRN, Crezee H. Temperature and thermal dose during radiotherapy and hyperthermia for recurrent breast cancer are related to clinical outcome and thermal toxicity: a systematic review. *Int J Hyperth* [Internet]. 2019;36(1):1024–39.

9. ANEXOS

Anexo I: Tablas de Materiales y Métodos

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

Gen	Oligo	Posición	Secuencia
ATP5IF1 (NM_016311.5)	hATP- IF1-Fw	228-249	ACGATATTCCGAGCACAGAGT
	hATP- IF1-Rev	355-335	TCTTCTGCTTATGGCGCTCAA
SOD2 (NM_000636.4)	hSOD2- Fw	572-591	TCAGGATCCACTGCAAGGAA
	hSOD2- Rev	598-617	CGTGCTCCCACACATCAATC
ACTB (NM_001101)	HActin- Fw	419-438	CGCGAGAAGATGACCCAGAT
	HActin- Rev	468-489	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA

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

Gen	Oligo	Posición	Secuencia
D-LOOP (NM_012920)	hDloop -Fw	401-430	TATCTTTGGCGGTATGCACTTTAAC AGT
	hDloop -Rev	487-462	TGATGAGATTAGTAGTATGGGAGTGG
MT-CO2 (NC_001807)	hCo2- Fw	7858- 7877	CGATCCCTCCCTTACCATCA
	hCo2- Rev	7904- 7926	CCGTAGTCGGTGTACTCGTAGGT
SDHA (AF171018)	hSdhA -Fw	224-244	TCTCCAGTGGCCAACAGTGTT
	HSdhA -Rev	276-295	GCCCTTTGTTCCCATCAAC

C. Programa de PCR en tiempo real

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

Anexo II: Análisis estadístico de los resultados

A. Relación de los tiempos de duplicación de las líneas tumorales en medio de galactosa y de glucosa

Fisher's PLSD for DTGal/Glu
 Effect: Línea celular
 Significance Level: 5 %
 Row exclusion: Tm tumorales mama.ssd

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	-,425	,422	,0484	S
613, Tm468	-,116	,533	,6426	
613, TmMCF7	-,189	,462	,3864	
Tm231, Tm468	,309	,566	,2537	
Tm231, TmMCF7	,236	,499	,3203	
Tm468, TmMCF7	-,074	,596	,7908	

B. Respiración endógena y desacoplada

Fisher's PLSD for Resp. endógena
 Effect: Línea celular
 Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	1,240	,922	,0126	S
613, Tm468	,072	,922	,8675	
613, TmMCF7	,274	,922	,5288	
Tm231, Tm468	-1,168	1,091	,0378	S
Tm231, TmMCF7	-,966	1,091	,0776	
Tm468, TmMCF7	,202	1,091	,6932	

Fisher's PLSD for Resp. desacopl.
 Effect: Línea celular
 Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	1,191	1,204	,0521	
613, Tm468	,230	1,204	,6848	
613, TmMCF7	-,651	1,204	,2618	
Tm231, Tm468	-,961	1,424	,1673	
Tm231, TmMCF7	-1,841	1,424	,0156	
Tm468, TmMCF7	-,880	1,424	,2030	S

C. Expresión del transcripto de la enzima antioxidante SOD2

Fisher's PLSD for SOD2 vs actina
 Effect: Línea celular
 Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	22,833	44,219	,2679	
613, Tm468	-214,600	44,219	<,0001	S
613, TmMCF7	-180,067	44,219	<,0001	S
Tm231, Tm468	-237,433	44,219	<,0001	S
Tm231, TmMCF7	-202,900	44,219	<,0001	S
Tm468, TmMCF7	34,533	44,219	,1094	

D. Respiración endógena vs biogénesis mitocondrial

Fisher's PLSD for Resp. vs masa mt
 Effect: Línea celular
 Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	2,552	,863	<,0001	S
613, Tm468	2,014	,863	,0003	S
613, TmMCF7	1,177	,863	,0116	S
Tm231, Tm468	-,538	1,021	,2735	
Tm231, TmMCF7	-1,375	1,021	,0125	S
Tm468, TmMCF7	-,837	1,021	,0993	

E. Número de copias de mtDNA

Fisher's PLSD for N Copias mtDNA

Effect: Línea celular

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	37,750	10,486	<,0001	S
613, Tm468	63,240	9,837	<,0001	S
613, TmMCF7	-17,217	9,379	,0012	S
Tm231, Tm468	25,490	10,898	,0001	S
Tm231, TmMCF7	-54,967	10,486	<,0001	S
Tm468, TmMCF7	-80,457	9,837	<,0001	S

F. Efecto de la línea celular a las distintas concentraciones de DCA

Fisher's PLSD for Cell survival (%)

Effect: Cell line

Significance Level: 5 %

Split By: [DCA]

Cell: 5,000

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	-6,225	14,780	,3901	
613, Tm468	4,392	14,780	,5424	
613, TmMCF7	12,877	16,759	,1247	
Tm231, Tm468	10,616	15,801	,1764	
Tm231, TmMCF7	19,101	17,666	,0355	
Tm468, TmMCF7	8,485	17,666	,3284	

Fisher's PLSD for Cell survival (%)

Effect: Cell line

Significance Level: 5 %

Split By: [DCA]

Cell: 15,000

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	-16,488	19,131	,0877	
613, Tm468	-12,876	19,131	,1767	
613, TmMCF7	8,468	19,131	,3686	
Tm231, Tm468	3,613	20,451	,7176	
Tm231, TmMCF7	24,957	20,451	,0190	S
Tm468, TmMCF7	21,344	20,451	,0416	S

Fisher's PLSD for Cell survival (%)

Effect: Cell line

Significance Level: 5 %

Split By: [DCA]

Cell: 25,000

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	22,059	13,946	,0036	S
613, Tm468	1,373	12,299	,8182	
613, TmMCF7	16,756	12,299	,0101	S
Tm231, Tm468	-20,686	14,700	,0082	S
Tm231, TmMCF7	-5,303	14,700	,4605	
Tm468, TmMCF7	15,383	13,148	,0241	S

Fisher's PLSD for Cell survival (%)

Effect: Cell line

Significance Level: 5 %

Split By: [DCA]

Cell: 40,000

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	2,443	6,627	,4375	
613, Tm468	-1,248	6,627	,6887	
613, TmMCF7	7,969	6,627	,0224	S
Tm231, Tm468	-3,691	6,627	,2482	
Tm231, TmMCF7	5,526	6,627	,0943	
Tm468, TmMCF7	9,217	6,627	,0105	S

G. Inhibición de la ATP sintasa

Fisher's PLSD for IF1 vs actina

Effect: Línea celular

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
613, Tm231	-26,000	58,824	,3307	
613, Tm468	-268,250	65,768	<,0001	S
613, TmMCF7	-94,233	58,824	,0068	
Tm231, Tm468	-242,250	65,768	<,0001	S
Tm231, TmMCF7	-68,233	58,824	,0288	S
Tm468, TmMCF7	174,017	65,768	,0004	S

H. Temperatura intracelular

Fisher's PLSD for DT^a

Efect: Línea celular

Significance Level: 5 %

Row exclusion: Tm tumorales mama_T^a.ssd

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
613, Tm231	-1,807	3,299	,2423	S
613, Tm468	4,353	2,951	,0093	
613, TmMCF7	-1,494	2,760	,2473	S
Tm231, Tm468	6,160	3,299	,0026	
Tm231, TmMCF7	,313	3,130	,8237	S
Tm468, TmMCF7	-5,848	2,760	,0012	