



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**“Regulación de la expresión de ACSL4 por  
mecanismos post-traduccionales y su rol en el  
metabolismo mitocondrial”**

*Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.*

**Lic. Yanina Benzo**

Directora: Dra. Paula M. Maloberti

Directora Asistente: Dra. Cecilia Poderoso

Consejera de Estudios: Dra. Silvia Rossi

Instituto de Investigaciones Biomédicas (CONICET).

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.

Buenos Aires, 2021

---

## **“Regulación de la expresión de ACSL4 por mecanismos postraduccionales y su rol en el metabolismo mitocondrial”**

En la actualidad es sabido que los lípidos son biomoléculas que están involucradas en vías de transducción de señales, y que los desequilibrios en su metabolismo causan múltiples trastornos de alta prevalencia. Dentro de los lípidos más estudiados en la actualidad, se encuentra el ácido araquidónico (AA), debido a las funciones que cumple tanto esta molécula como sus metabolitos, los eicosanoides, en el control de la homeostasis celular. Previamente, en nuestro laboratorio se ha descrito el rol de la enzima Acil- CoA sintetasa 4 (ACSL4) en la regulación de los niveles del AA intracelular en la esteroidogénesis y en células tumorales.

ACSL4 participa en la fisiopatología del cáncer de mama, y, la desregulación de los niveles de expresión de esta enzima se vincula con la agresividad tumoral. Recientemente, se demostró la existencia de una regulación diferencial en los mecanismos de transcripción de ACSL4, en líneas celulares de cáncer de mama humano de diferente agresividad. Sin embargo, se sabe que existen otros mecanismos regulatorios post-traduccionales, tales como la fosforilación y la ubiquitinación, que podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de la ACSL4 y por ende, en la tumorigénesis. Por lo tanto, en esta tesis doctoral, se propone profundizar en el estudio de los mecanismos post-traduccionales que podrían afectar la expresión de ACSL4 en células de cáncer de mama de distinta agresividad.

Utilizando líneas celulares de cáncer de mama de distinta agresividad, MCF7 (menos agresiva), y MDA-MB-231 (más agresiva) se observó que la estabilidad de la proteína es menor en la línea menos agresiva. A través de ensayos con MG-132, reconocido inhibidor proteasomal, determinamos también que el proteasoma está involucrado en la degradación de ACSL4 y por lo tanto, en los niveles de expresión y estabilidad de la enzima. Mediante la búsqueda en bases de datos y ensayos de mutagénesis sitio dirigida, pudimos identificar a las lisinas 621 y 702 de ACSL4 como posibles blancos de ubiquitinación. Además, identificamos a la enzima E3- ligasa Parkina como una de las candidatas a realizar esta modificación post-traduccional y, demostramos que efectivamente, existe una interacción entre ACSL4 y Parkina.

Por otro lado, a través de estudios *in silico*, observamos que ACSL4 regula la expresión de genes relacionados con el metabolismo y la función mitocondrial, en células de cáncer de mama. Actualmente, se sabe que las mitocondrias juegan un papel clave en

la oncogénesis, es por eso que, en este trabajo, decidimos profundizar sobre el rol de ACSL4 en el metabolismo mitocondrial en células tumorales mamarias de distinto nivel de agresividad. Utilizamos células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 de manera estable (MCF-7 tet-off/ACSL4) y células MDA-MB-231 silenciadas para la expresión de ACSL4 (shACSL4). Evaluamos si ACSL4 regula la expresión de distintos marcadores mitocondriales. Realizamos ensayos con el objetivo de medir la masa, la actividad y la bioenergética mitocondrial que nos permitieron determinar cómo la expresión y/o ausencia de ACSL4 afecta estos parámetros. Logramos determinar que ACSL4 regula positivamente la expresión de marcadores mitocondriales tales como NRF1, VDAC1 y el Complejo III de la cadena respiratoria. Además, en los estudios de bioenergética medimos la tasa de consumo de oxígeno, y en base a los resultados obtenidos, analizamos distintos parámetros respiratorios. Demostramos que la expresión de ACSL4 en células de cáncer de mama produce cambios significativos en la tasa de respiración máxima, la capacidad de reserva respiratoria y la fuga de protones. Estos resultados indican que las células que sobreexpresan ACSL4 poseen una mejor capacidad de respuesta frente a situaciones de demanda energética. Además, en células MCF-7 tet-off/ACSL4 observamos mayor actividad mitocondrial y una disminución en la masa mitocondrial con respecto al control, lo cual sugiere una compensación del genoma mitocondrial ante la disminución en su cantidad. Por otro lado, los resultados obtenidos con la línea MDA-MB- 231 shACSL4 son opuestos a lo observado en células MCF-7 tet-off/ACSL4, lo cual valida el rol de ACSL4 en células de cáncer de mama sobre diversos parámetros mitocondriales.

Los resultados del siguiente trabajo contribuyen a ampliar los conocimientos sobre la regulación de ACSL4 y el rol que ejerce en el metabolismo mitocondrial, permitiendo profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la célula tumoral y los mecanismos moleculares involucrados.

**Palabras claves: ACSL4, ácido araquidónico, cáncer de mama, mecanismos post-traduccionales- ubiquitinación, metabolismo mitocondrial, bioenergética**

---

## **"Regulation of ACSL4 expression by post-translational mechanisms and its role in mitochondrial metabolism"**

Currently, it is known that lipids are biomolecules that are involved in signal transduction pathways, and that imbalances in their metabolism cause multiple highly prevalent disorders. Arachidonic acid (AA) is among the most studied lipids today, due to the functions that this molecule and its metabolites, the eicosanoids, fulfill in the control of cellular homeostasis. Previously, our laboratory has described the role of the Acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4) enzyme in the regulation of intracellular AA levels both in steroidogenesis and tumor cells.

ACSL4 participates in breast cancer pathophysiology, and the dysregulation in the levels of expression of this enzyme are linked to tumor aggressiveness. Recently, the existence of a differential regulation in ACSL4 transcription mechanisms was demonstrated in human breast cancer cell lines of different aggressiveness. However, it is known that there are other post-translational regulatory mechanisms, such as phosphorylation and ubiquitination, that could be involved in the regulation of ACSL4 expression and, therefore, in tumorigenesis. Therefore, in this doctoral thesis, it is proposed to delve into the study of post-translational mechanisms that could affect the expression of ACSL4 in breast cancer cells of different aggressiveness.

Using breast cancer cell lines of different aggressiveness, MCF7 (less aggressive), and MDA-MB-231 (more aggressive) it was observed that protein stability is lower in the less aggressive line. Using MG-132, a recognized proteasomal inhibitor, we also determined that the proteasome is involved in the degradation of ACSL4 and therefore, in the levels of expression and stability of the enzyme. By searching databases and site-directed mutagenesis assays, we were able to identify ACSL4 lysines 621 and 702 as potential ubiquitination targets. Furthermore, we identified the enzyme E3-ligase Parkin as one of the candidates to carry out this post-translational modification and, we demonstrated that, indeed, there is an interaction between ACSL4 and Parkin.

On the other hand, through *in silico* studies, we observed that ACSL4 regulates the expression of genes related to metabolism and mitochondrial function in breast cancer cells. Currently, it is known that mitochondria play a key role in oncogenesis, that is why, in this work, we decided to delve into the role of ACSL4 in mitochondrial metabolism in breast tumor cells of different levels of aggressiveness. We used MCF-7 cells that stably overexpress ACSL4 (MCF-7 tet-off / ACSL4) and MDA-MB-231 cells silenced for the expression of ACSL4 (shACSL4). We evaluate whether ACSL4 regulates the expression

of different mitochondrial markers. We carried out tests with the objective of measuring mitochondrial mass, activity and bioenergetics that allowed us to determine how the expression and / or absence of ACSL4 affects these parameters. We were able to determine that ACSL4 positively regulates the expression of mitochondrial markers such as NRF1, VDAC1 and Complex III of the respiratory chain. Furthermore, in the bioenergetics studies we measure the rate of oxygen consumption, and based on the results obtained, we analyze different respiratory parameters. We show that ACSL4 expression in breast cancer cells produces significant changes in the maximum respiration rate, respiratory reserve capacity, and proton leak. These results indicate that cells that overexpress ACSL4 have a better response capacity in situations of energy demand. In addition, we observed in MCF-7 tet-off / ACSL4 cells a greater mitochondrial activity and a decrease in mitochondrial mass respect to the control, which suggests a compensation of the mitochondrial genome in the face of the decrease in its quantity. On the other hand, the results obtained with the MDA-MB-231 shACSL4 cell line are opposite to what was observed in MCF-7 tet-off / ACSL4 cells, validating the role of ACSL4 in breast cancer cells on various mitochondrial parameters.

The results of the following work expand the knowledge about the regulation of ACSL4 and the role that this enzyme plays in mitochondrial metabolism, allowing to deepen the knowledge of the pathophysiology of the tumor cell and the molecular mechanisms involved.

**Keywords: ACSL4, arachidonic acid, breast cancer, post-translational mechanisms- ubiquitination, mitochondrial metabolism, bioenergetics**

# Agradecimientos

Ser agradecido es poder comprender que todos necesitamos ayuda y apoyo para poder salir adelante en todas las circunstancias de la vida, por eso, es que creo de gran importancia el poder agradecer a todas aquellas personas e instituciones que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral que contribuyó en gran medida a mi formación profesional.

En primer lugar, quiero agradecer a las instituciones que me permitieron desarrollarme como profesional y con las cuales no hubiese llegado a donde llegué, agradezco al CONICET, a la Facultad de Medicina y a la Facultad de Cs. Exactas y Naturales de la UBA, así como también a la Universidad de Buenos Aires, está casa de estudios tan prestigiosa de la cual me siento orgullosa de formar parte.

No puedo dejar de agradecer a todo el INBIOMED y, dentro de éste, dar mis gracias a la Dra. Cristina Paz y al Dr. Ernesto Podestá por escuchar hace 5 años mi situación, entenderme y darme la posibilidad de comenzar a trabajar en este gran lugar que me rodeó de gente maravillosa. En especial a vos Cris, mil gracias por tu total apoyo a lo largo de todos estos años.

Gracias a Meli...si, a vos Meli. Yo recién llegaba, y vos recién volvías de tener a Nico, y sin embargo, desde el primer día me ayudaste en todo, fuiste mi guía en lo profesional, y en lo personal así como cuando me enteré que Chiara iba llegar al mundo e iba a ser mamá. Compartimos tantos momentos a lo largo de estos años, que necesitaría una sección entera para contarlos. Gracias por todos los consejos, no solo de la carrera, si no de la vida, gracias por ser mi apoyo siempre, mi psicóloga sobre todo en este último tiempo y gracias por ser una gran amiga, te quiero muchísimo!!.

A May, a Katia, a Mechi, a Lu, el cuarteto loco del lab! a todas las fui conociendo a lo largo de los años, y siempre estuvieron dispuestas a soportarme, a ayudarme y no puedo dejar de agradecerles. Todas son excelentes personas y compañeras. No solo compartimos trabajo si no buenos momentos, y, sobre todo, muchas charlas y muchas risas. Es un honor y un placer compartir mesada y horas al lado suyo.

Gracias a todos los que siempre me ayudaron de una u otra forma, a Paulita, a Juan, a Ulises, Silvana, Isa, Fabiana, Nico, Mati, Anita y Nadin. A las secretarias, Alber y Luciana, con esos almuerzos llenos de risas!! A Luciana, en especial, gracias totales por siempre escucharme y darme sesiones de psicología gratis!!  
¡Te voy a extrañar montones!

Sin dudas debo agradecer a Ale Goros y a Mercedes Biti, por ayudarme a que esta tesis quede mucho mejor. Ale gracias por tus correcciones y Mercedes por tu ayuda en bioinformática.!!!

Fer! No me olvide de vos, gracias por todo el apoyo y aguante que me diste en estos años, tengo que confesar que fuiste como una 3er directora para mi. Sos

una gran persona y una gran profesional y, sin dudas, una gran colega docente, te quiero!!.

Y sin dudas gracias a Jesi, la más nuevita, la que me sacó el lugar de nueva a mi ... gracias porque siempre me diste una mano y te preocupaste por mi, y de tanto compartir te convertiste en una gran amiga, ¡no solo mía, sino también de mi hija que te adora tanto! Te quiero mucho y lo sabés.

Y cerrando con la gente del lab, no puedo dejar de agradecer a las 2 personas que fueron mi inicio en esto y la mejor oportunidad que me encontré en estos años, gracias infinitas a Pau y a Ceci, gracias porque a pesar de todo, se la jugaron conmigo y aceptaron dirigirme. Gracias porque al mes de aceptarme me bancaron sabiendo que Chiara venía al mundo, gracias por que fueron un aguante total, porque siempre con el mayor de los respetos y con largas charlas motivacionales, fueron sacándome adelante y dándome fuerzas para seguir. Son excelentes personas, colegas y profesionales. Saben muchísimo y sé que aman lo que hacen y eso siempre fue mi inspiración. Es un orgullo haberlas tenido como directora y co-directora de esta tesis. Fue un desafío total para las 3, pero lo logramos después de todos los obstáculos, y, claramente, no hubiese sido posible sin ustedes. No me va a alcanzar la vida para agradecerles, fue un honor conocerlas y un gusto trabajar con uds, y se que juntas seguiremos logrando grandes cosas. Gracias por todo lo que hicieron por mi, siempre, y por poner lo mejor de uds. sobre todo en este último tiempo cuando todo se volvió tan complicado. Gracias, gracias y más gracias!!! Las quiero mucho a ambas dos.

Y ahora si, todo este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo incondicional de mis amigos, amigas (todos saben quienes son) y sobre todo de mi familia, que siempre me brindaron todas las fuerzas para que siga adelante!!

Gracias a mi viejo, que aun desde lo lejos, junto con Sandra, Belén y Bethany fueron incondicionales, siempre me ayudaron y estuvieron para darme una mano si lo necesité. Los amo y no veo la hora de poder darles un gran abrazo!

A mi familia, a mi tía Ali y a mi prima y hermana Lu, que desde mi licenciatura siempre me animaron a que siga adelante, aun sin entender por que se me ocurre estudiar tanto!! Lo mismo, gracias a Nico, que aun así colgado como es siempre estuvo presente. Los amo locamente!

No puedo dejar de agradecer a la tía Rosa, que en este último tiempo, fue un apoyo esencial para ayudarme a cuidar a Chiaris. Sin ella sin dudas todo hubiese sido un poco más difícil. Gracias tía, y gracias por amar tanto a mi hija, es recíproco, no hay dudas. Te queremos tía!

Gracias a los 4 ángeles que me cuidan y me guían desde el cielo. A los que se fueron antes, abu Félix y Beatriz, espero que estén al menos, en parte, un poco orgullosos de mi, siempre están en mi mente y mi corazón! Y a mis abuelos Delia y Alberto que me dejaron hace poco y aun parece hoy cuando los

abrazaba, y parte de este trabajo se hizo aun transitando ese dolor... gracias, porque siempre estuvieron a mi lado, y sé q desde el cielo ayudaron a que pudiese terminar con todo esto. Siempre me alentaron y aplaudieron mis logros, les pido que hoy aplaudan fuerte así los llevo a escuchar. Los extraño muchísimo, todo el tiempo, todos los días, pero sé que caminan a mi lado y sé que algún día nos volveremos a encontrar. Gracias, los amo para siempre!!!!

Y sin dudas, no puedo dejar de agradecer, y no me alcanza la tesis para agradecerle a una de las personas más importantes de mi vida, a mi pilar, a mi bastón, a la persona más incondicional, la que me soportó aun cuando ni yo lograba soportarme, gracias infinitas MAMÁ, gracias porque todo absolutamente todo lo que soy, todos mis logros en esta vida nunca hubiesen sido posible sin vos. Por eso, esta tesis también es tu tesis. Gracias por nunca soltarme, gracias por alentarme cuando sentí que no lo iba a lograr, por siempre darme otra forma de ver las cosas o simplemente un abrazo que me recargue. Gracias por ayudarme con Chiaris, porque tampoco lo hubiese logrado sin tu ayuda. Te Amo infinitamente, es un orgullo ser tu hija, porque te admiro como persona y como mujer. Si algún día volviera a nacer te elegiría mil veces más, porque dudo que exista una mamá mejor que vos. Gracias infinitas.

Por último, para terminar con estos largos, pero sin dudas necesarios agradecimientos, tengo que agradecer al GRAN AMOR DE MI VIDA... a mi hija, a Chiara. Hija de mi alma, el día que me enteré que llegabas pensé que no lo iba a lograr con vos, y sin embargo, después de estos 5 años solo me queda decir que no lo hubiese logrado sin vos. Fuiste a lo largo de estos años mi motor, mis fuerzas y mis ganas de seguir, fuiste mi inspiración, por eso este trabajo de mami, que aun no comprendés , también te pertenece. Llegaste a mi vida y la cambiaste, y tuviste que lidiar con una mamá que como decís vos a veces trabaja, trabaja y trabaja ...pero aun así siempre me aguantaste, siempre fuiste curiosa por lo que hago y siempre me aplaudiste cuando dejaba de trabajar! Gracias y perdón porque sé que muchas veces me querías tener un ratito más y mami era una bola de laburo, pero es por y para vos, y hoy mamá te dedica este logro, nuestro logro. Gracias hija, te amo como nunca pensé que iba a amar a nadie en este mundo, gracias por llegar a mi vida.



*“En la lucha entre el arroyo y la roca,  
siempre triunfa el arroyo...  
no porque sea más fuerte, sino porque  
persevera...”*

*(H. Jackson Brown)*

*A mi mamá,*

*Y en especial,  
al gran amor de mi vida, a mi hija, a Chiara ...* 

# *Abreviaturas*

12-HETE	Ácido 12- hidroxieicosatetraenoicos
15-HETE	Ácido 15- hidroxieicosatetraenoicos
15-LOX	15-lipoxigenasa
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5-HETE	Ácido 5- hidroxieicosatetraenoicos
5-HPETE	5- Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
5-LOX	5-lipoxigenasa
8Br-AMPC	8-bromo- Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
AA	Ácido araquidónico
AA-CoA	Araquidonoil-CoA
AC	Adenilato ciclasa
AcK	Acetato de potasio
ACOT2	Acil-CoA tioesterasa mitocondrial
ACS	Acil Coenzima-A sintetasa
ACSL	Acil-CoA sintetisas de cadena larga
ACSL4	Acil coenzima-A sintetasa 4
Acs14a	Acil coenzima-A sintetasa 4 homóloga en zebrafish
ACSM	Acil-CoA sintetisas de cadena media
ACSS	Acil-CoA sintetisas de cadena corta
ACSVL	Acil-CoA sintetisas de cadena muy larga
ACTH	Hormona Adenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa I	Desoxirribonucleasa I
ADNc	ADN copia
ADP	Adenosina difosfato
AINEs	Antiinflamatorios no esteroides
AKT	Proteína quinasa B (también llamada PKB)
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico

AMPK	Proteína quinasa activada por AMP subunidad catalítica alfa1
ANT1	Miembro de la familia transportadores de solutos 1
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
shRNA	ARN pequeño de interferencia
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
BCC	Líneas celulares de cáncer de mama
BMP	Proteína morfogénica del hueso
BO	Bulbo olfatorio
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Seroalbúmina bovina
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
Cit p450	Citocromo p450
CoA	Coenzima A
COX 1/2	Ciclooxigenasa 1 y Ciclooxigenasa 2
CpG	Islas GC
CREB	cAMP response-element binding protein
CYP	citp450 monooxigenasa
dAcsl	Enzima homóloga a ACSL3 y ACSL4 en <i>Drosophila melanogaster</i>
DBI	Inhibidor de unión al diazepam
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHETE	Ácido dihidroxieicosatetraenoico
DMEM	Medio de cultivo para líneas celulares Dulbecco's modified Eagle
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxi-nucleótido trifosfato
Dpp	Proteína homóloga a Bmp en <i>Drosophila melanogaster</i>
E <sub>2</sub>	Estradiol

EDTA	Ácido etilen diamino-tetracético
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFP	Forma mejorada de la proteína fluorescente verde
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N, N,N',N' tetra-acético
EMT	Transición epitelio mesenquimal
ER	Receptor de Estrógenos
ER-	Negativo para la expresión del ER
ER+	Positivo para la expresión del ER
ER $\alpha$	Receptor de estrógeno alfa
ERK 1/2	Quinasa activada por señales extracelulares
ERR $\alpha$	Receptor relacionado a estrógenos alfa
ER $\beta$	Receptor de estrógeno beta
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FSH	Hormona folículo estimulante
g	Fuerza g o fuerza centrífuga relativa (FCR)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPX4	Glutation peroxidasa 4
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Agua destilada
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HER-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HETE	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
HPA	hipotálamo-pituitario-suprarrenal alterado
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
kb	kilo Base
KDa	Kilo Dalton
LB	Medio para bacterias Luria Bertani
LH	Hormona luteinizante

LOX	Lipooxigenasa
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
MAMs	Membranas del retículo endoplásmico asociadas a mitocondrias
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MBC	Cáncer de mama metastásico
MCF-7 tet/off ACSL4	MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 bajo el control de tetraciclina o doxiciclina
miRs	micro ARNs
mir34a	microARN 34a
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
ON	Durante toda la noche
OXPHOS	Fosforilación Oxidativa
P4	Progesterona
P450scc	Complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol citocromo P450
P5	Pregnenolona
p70S6K	Proteína ribosómica S6 quinasa 70 kDa polipéptido 1
PARK2	Gen que codifica para la proteína Parkina
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGs	Prostaglandinas
PGC-1 $\alpha$	PPAR $\gamma$ coactivador 1-alfa
PGE <sub>2</sub>	Prostraglandina E2
PINK1	Proteína quinasa 1 inducida por PTEN
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína quinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> y fosfolípidos

PLA2	Fosfolipasa A2
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR $\gamma$	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma
PR	Receptor de progesterona
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTPs	proteínas con actividad de tirosinas fosfatasas
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
PVDF	Fluoruro de vinilideno
Rb	Proteína del Retinoblastoma
RNA-seq	Secuenciación de RNA
ROR $\alpha$	Retinoid-related orphan receptor alpha
rpm	Revoluciones por minuto
RPPA	Reverse phase protein array
R-Smad	Factores de transcripción dependientes de Smad
RE	Retículo endoplásmico
RT	Transcripción reversa
SD	Desvío estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
SEM	Error estándar de la media
SERD	Reguladores negativos del ER
SERM	Moduladores selectivos del ER
shACSL4	Células MDA-MB-231 silenciadas para la expresión de ACSL4
SHP2	Tyrosine Protein Phosphatase Non-Receptor Type 11
Sp1	Specifity Protein 1
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TAE	Solución amortiguadora Tris acetato EDTA
TBS	Solución amortiguadora salino de Tris
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TOM20	Subunidad del receptor de importación mitocondrial homólogo de TOM20



Tris	Hidroximetil amino metano
TSE	Solución amortiguadora salino Tris Sacarosa EDTA
TSP0	Receptor periférico de benzodiazepinas/translocator protein
TSS	Sitios de inicio de la transcripción
TTBS	Solución salina Tris Tween
Tx	Tromboxano
TZD	Droga de la familia de las tiazolidenidionas
UCP2	Proteína desacoplante mitocondrial 2
UTR	Región no traducible
VDAC1	Canal aniónico dependiente de voltaje 1

# *Índice*

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>24</b>
<b>1. Acil- CoA Sintetasas</b>	<b>25</b>
1.1 Acil- CoA Sintetasa 4 (ACSL4)	26
<b>2. ACSL4: Rol en el metabolismo de eicosanoides y del Ácido Araquidónico</b>	<b>29</b>
<b>3. ACSL4 y esteroidogénesis</b>	<b>30</b>
3.1 Breve introducción a esteroides y hormonas esteroideas	30
3.2 Expresión y función de ACSL4 en tejidos esteroideos	33
<b>4. Rol de ACSL4 en diversas funciones y patologías</b>	<b>35</b>
4.1 ACSL4 y ferroptosis	36
4.2 ACSL4 y Cáncer	38
4.2.1 Generalidades sobre el cáncer	38
4.2.2 Breves nociones sobre el cáncer de mama	40
- Líneas celulares para el estudio del cáncer de mama in vitro	42
4.2.3. Metabolismo del Ácido Araquidónico y tumorigénesis	43
4.2.4 Expresión y Función de ACSL4 en cáncer	45
4.2.5 ACSL4 y su relación con la vía mTOR en células de cáncer de mama	47
4.2.6 Inhibición de ACSL4 y proliferación en células de cáncer de mama	49
<b>5. Regulación de la expresión de ACSL4</b>	<b>51</b>
5.1 Regulación transcripcional de ACSL4	51
5.2 Regulación post- transcripcional de ACSL4	52
5.2.1 Regulación de ACSL4 por micro- ARNs	52
5.3 Regulación post- traduccional de ACSL4	53
5.3.1 Regulación de ACSL4 por fosforilación	53
5.3.2 Regulación de ACSL4 por ubiquitinación	54
- Parkina: E3- RBR- Ubiquitina ligasa	56
5.4 Otros mecanismos de regulación de ACSL4	57
<b>6. ACSL4 y Metabolismo Mitocondrial</b>	<b>58</b>
6.1 Introducción a la estructura y función mitocondrial	58
6.2 Cadena de transporte de electrones	60
6.3 Dinámica mitocondrial: fusión y fisión	62
6.4 Interacción entre glucólisis y respiración mitocondrial	64
6.5 Mitocondrias y Cáncer	65
6.6 Mitofagia: mecanismo de autofagia mitocondrial	68
6.6.1 Vías canónicas de mitofagia	68

6.7 Mitofagia y Cáncer	70
6.7.1 Mitofagia en el cáncer de mama	71
6.8 ACSL4 y metabolismo mitocondrial en células de cáncer de mama	72
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	
<b>Hipótesis</b>	74
<b>Objetivo General</b>	75
<b>Objetivos específicos</b>	76
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>1. Materiales y Reactivos utilizados</b>	78
<b>2. Medios de cultivo y soluciones de uso frecuente</b>	79
<b>3. Líneas celulares</b>	80
3.1 Líneas humanas de cáncer de mama	80
3.2 Líneas celulares de cáncer de mama modificadas	81
- MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off ACSL4	81
- MDA-MB-231 shRNA	81
3.3 Línea humana de riñón embrionario	82
<b>4. Plásmidos utilizados</b>	83
-Vector pCMV6-Entry- ACSL4-FLAG (FACL4)	83
-Vector de expresión de ARN pequeño de interferencia de horquilla pSUPER.retro.puro.	84
<b>5. Ensayo de estabilidad de ACSL4</b>	85
<b>6. Ensayo de inhibición proteasomal</b>	85
<b>7. Cebadores utilizados</b>	86
<b>8. Mutación sitio-dirigida</b>	87
<b>9. Purificación de fragmentos de ADN</b>	91
<b>10. Digestión con endonucleasas de restricción</b>	91
<b>11. Electroforesis en geles de agarosa</b>	92
<b>12. Desfosforilación de vectores y reacción de ligación</b>	92
<b>13. Cepa bacteriana</b>	93
<b>14. Preparación de bacterias <i>Escherichia coli</i> competentes</b>	93
<b>15. Transformación de <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue competentes</b>	93
<b>16. Aislamiento y Purificación de ADN plasmídico</b>	94
-Pequeña escala	94
-Mediana escala	94
<b>17. Verificación de mutaciones por secuenciación del ADN plasmídico</b>	95
<b>18. Transfección de líneas celulares</b>	95
-Transfección transitoria	95

-Co-transfección transitoria	96
-Transfección estable	96
<b>19. Obtención de lisados totales</b>	<b>97</b>
<b>20. Obtención de fracción mitocondrial (fraccionamiento subcelular)</b>	<b>97</b>
<b>21. Análisis de proteínas</b>	<b>98</b>
-Cuantificación de proteínas	98
-Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE)	98
-Western blot	98
-Co- Inmunoprecipitación	99
-Inmunocitoquímica de fluorescencia	100
<b>22. Ensayo de actividad mitocondrial</b>	<b>101</b>
<b>23. Análisis de masa mitocondrial</b>	<b>101</b>
<b>24. Análisis de imágenes de fluorescencia</b>	<b>102</b>
<b>25. Extracción de ADN genómico</b>	<b>102</b>
<b>26. Cuantificación de ADN mitocondrial y ADN nuclear</b>	<b>103</b>
<b>27. PCR cuantitativa en tiempo real</b>	<b>103</b>
<b>28. Estudio de bioenergética mitocondrial</b>	<b>104</b>
<b>29. Análisis <i>in silico</i></b>	<b>105</b>
<b>30. Análisis estadístico</b>	<b>105</b>
<b>RESULTADOS</b>	
<b>A. Evaluación de la estabilidad y regulación post-traducciona</b>	
<b>de ACSL4 en líneas celulares de cáncer de mama</b>	<b>108</b>
A.1. Análisis y comparación de la estabilidad de ACSL4 en líneas celulares de cáncer de mama	108
A.2. Determinación de la estabilidad de ACSL4 a tiempos cortos en la línea MCF-7	111
A.3. Efecto de la inhibición del proteasoma en los niveles de ACSL4 en células tumorales mamarias	112
A.4. Estudio de modificaciones post-traduccionales de ACSL4	113
A.5. Obtención de mutaciones sitio dirigidas en las lisinas de ACSL4 posibles blancos de ubiquitinación	115
A.6. Efectos de las mutaciones sitio dirigidas en las lisinas 702 y 621 de ACSL4 sobre los niveles de expresión de la proteína en células de cáncer de mama	115
A.7. Estudio de la interacción de ACSL4 con la E3-RBR- ubiquitina ligasa Parkina	117
A.8. Construcción de líneas estables de cáncer de mama para FLAG-ACSL4	118
A.9. Análisis de fosforilación en tirosina y de ubiquitinación de ACSL4 en líneas de cáncer de mama	119
<b>B. Análisis del rol de ACSL4 sobre el metabolismo mitocondrial: estudio de mitofagia y bioenergética mitocondrial</b>	<b>121</b>

B.1. Análisis <i>in silico</i> del rol de ACSL4 en el metabolismo mitocondrial	122
B.2. Evaluación de los niveles de marcadores clásicos mitocondriales en la fracción mitocondrial de células tumorales mamarias	125
B.3. Análisis del Factor Respiratorio Nuclear (NRF-1) en extracto nuclear de células MCF-7 tet- off/ACSL4	128
B.4. Análisis del metabolismo mitocondrial en células tumorales mamarias	129
B.5. Estudio de los parámetros respiratorios en células tumorales mamarias basados en la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial	133
B.6. Efecto de la expresión de ACSL4 sobre la actividad mitocondrial en células tumorales mamarias	135
B.7. Estudio cuantitativo del ADN mitocondrial (ADNmt) en función del ADN nuclear (ADNn) en células tumorales mamarias	139
B.8. Análisis de la masa mitocondrial en células de cáncer de mama por citometría de flujo	140
B.9. Efecto de la sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7 en los niveles de expresión de TOM20	142
<b>DISCUSIÓN</b>	146
1. Estudio de los mecanismos involucrados en la regulación post-traducciona l de ACSL4	147
2. Estudio del rol de ACSL4 en el metabolismo y función mitocondrial en células de cáncer de mama	153
<b>CONCLUSIONES</b>	
Del objetivo específico N°1	164
Del objetivo específico N°2	165
<b>REFERENCIAS</b>	168

# *Introducción*

Los lípidos son un grupo complejo de biomoléculas presentes en todos los organismos vivos, que desempeñan un papel clave en numerosos procesos biológicos, como la respuesta inflamatoria, la reproducción, la estructura de membranas biológicas y el suministro y almacenamiento de energía <sup>1</sup>.

Entre todos los lípidos conocidos, los ácidos grasos (AGs) son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de diferente longitud, en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo. Dada su naturaleza química, los AGs requieren ser activados antes de su entrada a una ruta metabólica <sup>2</sup>. Esta activación es un paso crítico y limitante del metabolismo de los AGs. Dado que los AGs son liposolubles, esta reacción permite retenerlos dentro de las células en forma de Acil-CoAs <sup>2</sup>. Los Acil-CoAs constituyen moléculas relevantes en variados procesos de regulación y señalización celular <sup>3,4</sup>.

Dentro de los lípidos más estudiados se encuentra el ácido araquidónico (AA). El control de la homeostasis del AA en el medio intracelular es de gran importancia debido a las funciones que cumple tanto esta molécula como sus metabolitos, los eicosanoides. Se ha observado la existencia de una desregulación en los niveles de AA y eicosanoides en una amplia variedad de procesos patológicos, como por ejemplo, en el cáncer de mama triple negativo. La Acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) es una isoenzima única que cataliza la activación varios ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de cadena larga, con una alta preferencia por el AA. Por otro lado, diferentes estudios revelaron que ACSL4 está involucrada en respuestas biológicas que incluyen inflamación, esteroidogénesis, muerte celular, fertilidad femenina y cáncer.

Previo a este trabajo de tesis doctoral, en nuestro laboratorio se ha estudiado el rol que ejerce ACSL4 en la fisiopatología del cáncer de mama, vinculando la desregulación de los niveles de esta enzima con la agresividad tumoral. Debido a esto, es que decidimos profundizar en el estudio de la regulación en los niveles de expresión de ACSL4 y su rol en el metabolismo mitocondrial, sabiendo que este último, también resulta afectado en distintos tipos de cáncer. Por lo tanto, nuestro trabajo será de importancia para terminar de conocer los mecanismos involucrados en el aumento y/o disminución de la expresión de la enzima ACSL4, así como sus efectos en funciones mitocondriales, en modelos de cáncer de mama de distinta agresividad.



## 1. Acil- CoA Sintetasas

Las Acil-CoA sintetasas (ACS) son una familia de enzimas que cataliza la reacción de activación de los AGs. Esta reacción consiste en dos pasos: en el primer paso, se forma un intermediario Acil- adenosin monofosfato (AMP) a partir de ATP; luego, el AMP se intercambia con CoA para producir el acil-CoA activado a través de su esterificación. La liberación de AMP en esta reacción define la superfamilia de enzimas formadoras de AMP<sup>5</sup>.

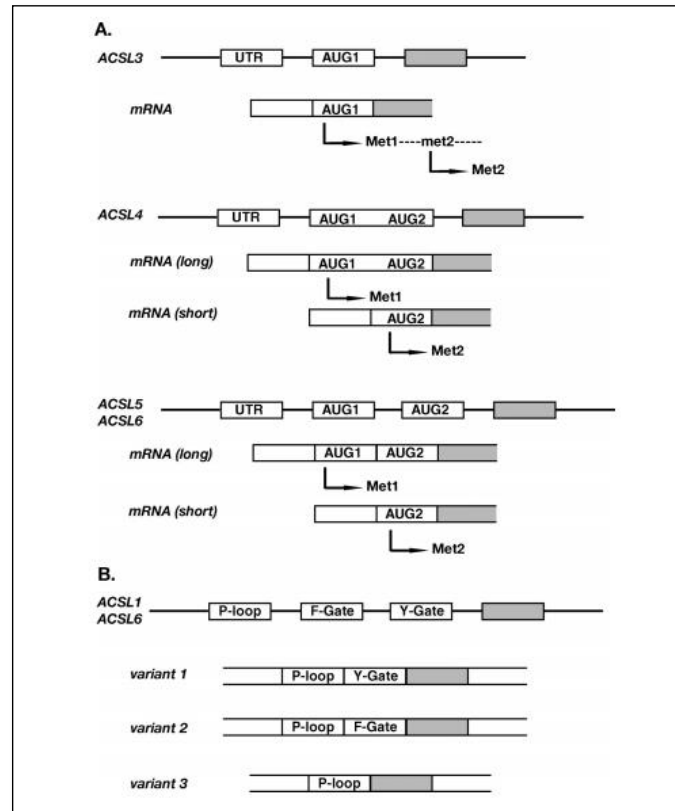
La familia ACS se clasifica en subfamilias de enzimas según el largo de la cadena de AGs que tienen como sustrato: Acil-CoA sintetasas de cadena muy larga (ACSVL), Acil-CoA sintetasas de cadena larga (ACSL), Acil-CoA sintetasas de cadena media (ACSM) y Acil-CoA sintetasas de cadena corta (ACSS).

La subfamilia ACSL está integrada por un conjunto de enzimas que catalizan la activación de ácidos grasos saturados o insaturados de 12 a 20 átomos de carbono de longitud<sup>5</sup>. Las ACSLs juegan un papel esencial en diversos procesos tales como, la biosíntesis de lípidos, la degradación de AGs ( $\beta$ -oxidación) y la remodelación de membranas. Recientemente se ha ampliado el conocimiento sobre sus funciones y se las ha implicado en diversas patologías como por ejemplo el cáncer<sup>6-9</sup>. Se han identificado y caracterizado en roedores y humanos cinco miembros dentro de la subfamilia ACSL que difieren en sus preferencias de sustrato, cinética enzimática, regulación y ubicación subcelular y tisular. Estas proteínas son codificadas por cinco genes diferentes y se denominan ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5 y ACSL6<sup>5,10</sup>.

Los cinco miembros de familia ACSL pueden dividirse en dos grupos basados en la homología de secuencia. En un grupo se encuentran ACSL1, ACSL5 y ACSL6 que muestran un 60% de homología en la secuencia aminoacídica y en el otro encontramos a ACSL3 y ACSL4 que muestran una homología del 68% entre sí<sup>11-13</sup>. Cada miembro de la familia ACSL posee diferentes variantes de ARNm producidas por corte y empalme alternativo del transcrito primario, que luego son traducidas generando varias isoformas. La mayoría de las variantes se definen por diferencias en las regiones 5'-UTR, del primer exón codificante, de exones codificantes alternativos y de dos motivos intercambiables localizados en las proximidades del sitio de unión de ATP denominados como "dominio Gate" del ácido graso. Basándose en la estructura cristalográfica de la proteína homóloga a ACSL4 en bacterias, se observó que este "dominio Gate" estaría involucrado en el control del acceso del AG al sitio catalítico de la enzima. Se ha demostrado que esta región, participa en la formación de un "bolsillo" en el que el AG queda retenido durante la formación de la unión éster entre el AG y la molécula de CoA.

La profundidad y el ancho del bolsillo, definirían entonces la especificidad de sustrato de cada una de las isoformas <sup>10,13</sup>.

ACSL3, ACSL4, ACSL5 y ACSL6 tienen dos sitios AUG de inicio de transcripción en un mismo marco de lectura que producen isoformas de distinta longitud (Figura 1) <sup>5</sup>.



**Figura 1. Esquema representativo de los eventos de corte y empalme alternativo de las Acil-CoA Sintetasas.** (A) Eventos de corte y empalme que afectan el inicio de la traducción. Se muestra en el esquema la organización exón-intrón del extremo 5' de los genes ACSL, variantes empalmadas correspondientes (ARNm) y sus productos. Las isoformas largas comienzan en el primer codón AUG (AUG1, Met1) y la isoforma corta en el segundo codón AUG (AUG2, Met2). (B) Representación del par de exón exclusivo que codifica las dos variantes de los dominios Gate de ácidos grasos (F- e Y-Gate) aguas abajo del exón que codifica el sitio de unión de ATP (P-loop). Los genes ACSL3, ACSL4 y ACSL5 carecen del exón F y codifican solo la versión del dominio Y-Gate. (Imagen perteneciente a Soupene and Kuypers 2008)

### 1.1 Acil-CoA Sintetasa 4 (ACSL4)

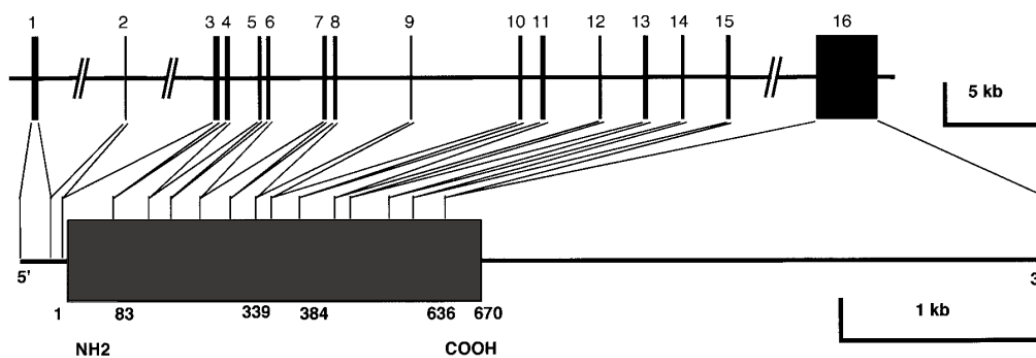
El AA es un ácido graso esencial y un componente principal de las membranas biológicas, formando parte de lípidos complejos como los fosfolípidos. El AA está formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces *cis* en las posiciones

5, 8, 11 y 14. Puede ser liberado de las membranas por la fosfolipasa A2 (PLA2), siendo el sustrato común de la síntesis de los eicosanoides, una familia de lípidos con un papel clave en la fisiología y fisiopatología celular <sup>14,15</sup>. Las células controlan rigurosamente los niveles de AA libre debido a su actividad biológica y a la de sus metabolitos, los eicosanoides. De esta manera la disponibilidad de este ácido graso es con frecuencia un paso limitante de la velocidad en la generación de eicosanoides<sup>16</sup>. En contraste a lo observado para otros ácidos grasos, los niveles de AA libre en el citoplasma son bajos comparados con la cantidad de ésteres del mismo <sup>16</sup>.

La producción de Acil-CoA a partir de AA es catalizada por ACSL4 y requiere la utilización de una molécula de ATP. ACSL4 posee una fuerte preferencia por el AA como sustrato. La reacción catalizada por esta enzima involucra la formación de un intermediario AA-AMP y luego se produce el intercambio de AMP por CoA para producir Araquidonil- CoA (AA-CoA) activado. De esta forma se activa el AA para que pueda participar en reacciones metabólicas. En síntesis, los dos pasos de reacción que se llevan a cabo son los siguientes:



El gen que codifica a ACSL4 humana se encuentra en la región Xq22.3-q23 del cromosoma X. Comprende una longitud de 90 kb y contiene 16 exones separados por 15 intrones (Figura 2)<sup>17</sup>.



**Figura. 2. Estructura del gen de ACSL4.** Se muestra un esquema del gen de ACSL4 humano. En rectángulos negros numerados se esquematizan a los 16 exones del gen separado por

intrones representados por líneas negras horizontales. En la parte inferior se esquematiza el transcrito de la variante corta, en donde el rectángulo gris indica la secuencia codificante con sus respectivos extremos amino y carboxilos terminales. En sus extremos las líneas negras horizontales corresponden a las zonas 5' UTR y 3' UTR. A la derecha se indica una referencia de longitud en kb. (Imagen adaptada de Minekura y col. 2001 <sup>17</sup>).

La estructura tridimensional de ACSL4 de mamíferos aún no se ha podido caracterizar por cristalografía. A través de la comparación de la secuencia con una ACSL de origen bacteriano cuya estructura ha sido determinada, se infiere que ACSL4 humana contiene un dominio conservado que determina la especificidad de sustrato, el cual se conoce como "dominio Gate" del AG y que ya fue previamente mencionado <sup>13,18</sup>.

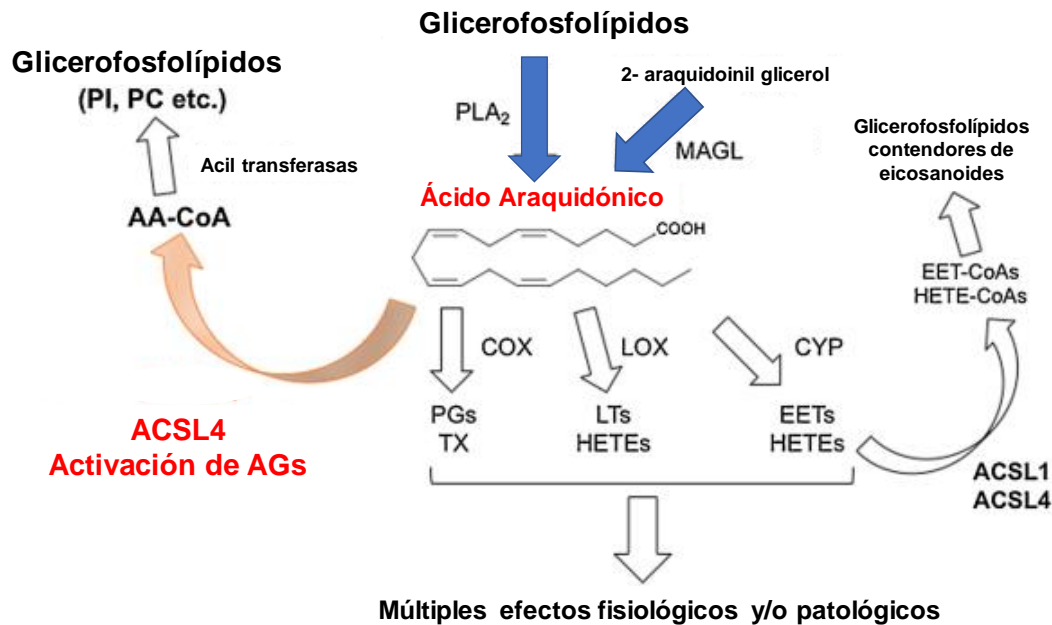
ACSL4 es una proteína que se expresa preferencialmente en varios tejidos tales como glándula adrenal, epidídimo, cerebro, pulmón, ovario, placenta, y testículos. Su abundancia es notable en células esteroideogénicas <sup>19-21</sup>. Por otro lado, es pobremente expresada en otros tejidos adultos tales como mama, hígado y tracto gastrointestinal en general. Se ha relacionado una expresión anormal de ACSL4 en tejidos no esteroideogénicos con la tumorigénesis y el cáncer <sup>22</sup>. De las dos variantes conocidas de ACSL4 humana se ha demostrado que la variante 1 de ACSL4 es de distribución ubicua mientras que la variante 2 de ACSL4 parece estar en mayor abundancia en cerebro <sup>8</sup>. La expresión de la enzima ACSL4 en sistema nervioso, se describió en estadios tempranos del desarrollo en el cerebro de ratón, detectándose una cantidad significativa de su ARNm en embriones en estadio E7 <sup>20</sup>. ACSL4 también se expresa en el cerebro de ratones neonatos y adultos, especialmente en células granulares del giro dentular, astrocitos, neuronas piramidales de la capa hipocámpal CA1 y capa de células granulares y células de Purkinje del cerebelo entre otros tipos celulares <sup>20,23</sup>.

En relación a la ubicación subcelular de la enzima, existen varios estudios que revelan que ACSL4 se encuentra enriquecida en subdominios especializados del retículo endoplásmico que mantienen un estrecho contacto físico con las mitocondrias <sup>24</sup>. Estos subdominios se conocen como las membranas del retículo endoplásmico asociadas a mitocondrias (MAMs) las cuales son importantes para el anabolismo de lípidos intracelulares y la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>25</sup>. Las MAMs están altamente enriquecidas en ACSL4 <sup>26</sup> y esta enzima ha sido descrita como un marcador específico de estas estructuras <sup>27</sup>. Sin embargo, existe también una fuerte evidencia de que ACSL4 puede localizarse en otros sitios y organelas, dentro de estas ubicaciones se encuentran los endosomas, los microsomas, los peroxisomas y la membrana plasmática <sup>25,28</sup>.

## 2. ACSL4: rol en el metabolismo de eicosanoides y del ácido araquidónico

Se considera que el AA cumple las condiciones de un segundo mensajero dado que puede mimetizar la acción del agonista u hormona que desencadenó su liberación<sup>29</sup>. Esta acción puede ser directa<sup>30,31</sup> o a través de sus metabolitos, los eicosanoides. Los eicosanoides se producen en una amplia variedad de tejidos de diferentes especies animales<sup>32</sup>. Estos metabolitos son moléculas de señalización que incluye a las prostaglandinas (PGs), los leucotrienos (LTs) y los ácidos epoxieicosatrenoicos e hidroxieicosatetraenoicos (EETs y HETEs). Los eicosanoides provenientes de la oxidación del AA ejercen un control complejo en una amplia gama de procesos fisiológicos. Muchos aspectos importantes de la inmunidad, como la síntesis de citoquinas, la formación de anticuerpos, la diferenciación, la proliferación y migración celular, así también como la presentación de antígenos del sistema inmune son regulados por los eicosanoides. Por lo tanto, los eicosanoides están relacionados a procesos inflamatorios, reacciones alérgicas, autoinmunidad y cáncer ejerciendo sus efectos principalmente a nivel local a través de la interacción con receptores acoplados a proteína G en la superficie celular o con receptores nucleares<sup>14,33</sup>. Las vías involucradas en la biosíntesis de eicosanoides son complejas. Varias enzimas encargadas de metabolizar el AA tales como la fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y citocromo P450 están involucradas en la síntesis de estos compuestos (Figura 3)<sup>8</sup>. En general, el AA liberado después de la activación celular es metabolizado por COX o LOX, y luego el AA oxidado es convertido en eicosanoides bioactivos por cada enzima eicosanoide sintasa terminal (Figura 3)<sup>8</sup>. La enzima citocromo P450 monooxigenasa (CYP) cataliza la producción de ácidos epoxieicosatrienoicos y ácidos hidroxieicosatetraenoicos, y tanto EET como HETEs son activados por las enzimas ACSL<sup>34,35</sup>, lo que resulta en la producción de EET y HETE-CoAs.

Como se ha mencionado anteriormente, dado que el AA posee actividades biológicas relevantes resulta fundamental el control de sus niveles intracelulares, de manera tal que la disponibilidad de este ácido graso es con frecuencia un paso limitante de la velocidad en la generación de eicosanoides<sup>36</sup>.



**Figura 3. Rol de ACSL4 en la biosíntesis de eicosanoides.** En la figura se muestran un resumen de las vías de síntesis del ácido araquidónico y sus principales metabolitos. Se señalan las enzimas que participan. ACSL4: acil-CoA sintetasa 4, COX: ciclooxigenasa, CYP: citocromo P450, EET: ácidos epoxieicosatrienoicos, HETEs: ácidos hidroxieicosatetraenoicos, LOX: lipoxigenasa, LT: leucotrienos, MAGL: monoacilglicerol lipasa, PG: prostaglandinas, PLA2: fosfolipasa A2, TX: tromboxano. (Imagen adaptada de Hiroshi Kuwata et al. 2019).

Dado que ACSL4 juega un rol importante como regulador de los niveles de AA intracelulares y la síntesis de eicosanoides<sup>37</sup> su actividad impacta sobre las diferentes y amplia gama de funciones en las que los mismos están involucrados.

### 3. ACSL4 y esteroidogénesis

#### 3.1 Breve introducción a la esteroidogénesis y hormonas esteroideas

La esteroidogénesis es el conjunto de reacciones metabólicas que generan como producto hormonas esteroideas derivadas del colesterol<sup>38</sup>. La esteroidogénesis se produce en tejidos especializados, los cuales expresan las enzimas necesarias para producir las distintas hormonas esteroideas. Los principales tejidos esteroidogénicos son la corteza adrenal, gónadas y placenta. Más allá de los tejidos clásicos mencionados, se ha demostrado que el sistema nervioso (SN) también tiene la capacidad de sintetizar hormonas esteroideas que se denominan neuroesteroides<sup>39-41</sup>.

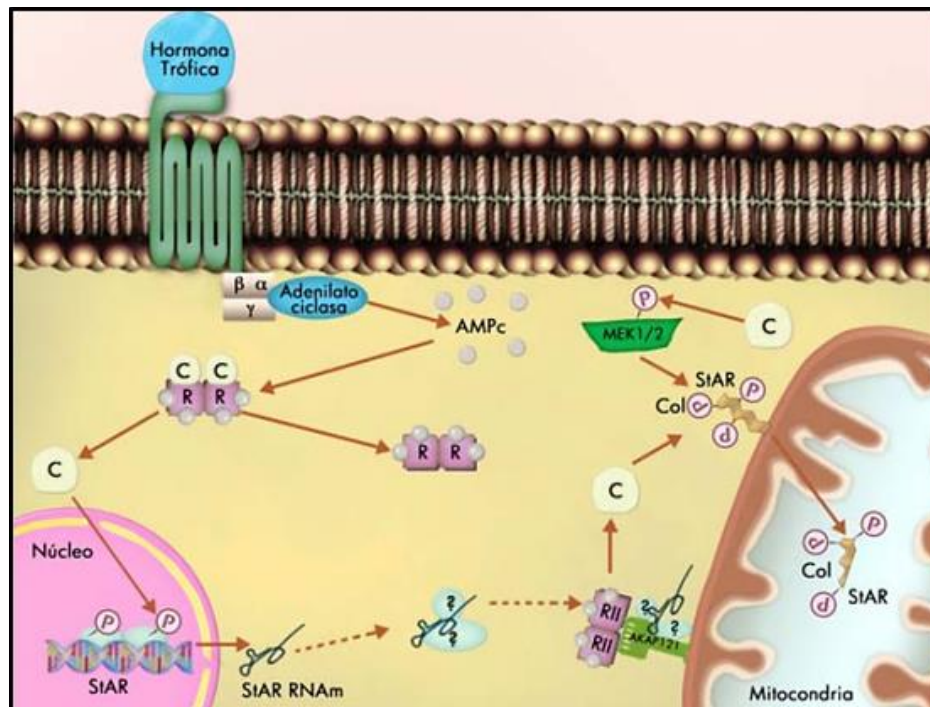
Los tejidos esteroideogénicos sintetizan y liberan hormonas esteroideas que ejercen su función en células diana en general alejadas de su lugar de síntesis. Las hormonas esteroideas en los mamíferos regulan diversas funciones fisiológicas, como la reproducción, principalmente por el eje hipotalámico-pituitario-gonadal, el equilibrio de la sal sanguínea, el mantenimiento de las características sexuales secundarias, la respuesta al estrés, la función neuronal y diversos procesos metabólicos <sup>42</sup>.

La esteroideogénesis es estimulada por hormonas tróficas <sup>38</sup>. Entre estas hormonas, las hormonas peptídicas: hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) son hormonas sintetizadas en la *pars distalis* de la adenohipófisis. Las hormonas tróficas actúan en sus tejidos diana uniéndose a sus receptores específicos de membrana plasmática acoplados a proteína Gs. Posteriormente, se produce la activación de la adenil ciclasa (AC) que genera el incremento de los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc). Este segundo mensajero activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) <sup>43-45</sup>. La PKA produce la fosforilación de proteínas regulatorias de la esteroideogénesis y como resultado final se obtiene un incremento de la síntesis de hormonas esteroideas (Figura 4) <sup>38</sup>.

El precursor común de las hormonas esteroideas es el colesterol. La primera enzima de la vía de la síntesis de hormonas esteroideas que utiliza el colesterol como sustrato es el complejo P450cc. El sitio activo del complejo P450cc se encuentra en la membrana interna de la mitocondria. El paso limitante de la esteroideogénesis es el transporte del colesterol desde la membrana mitocondrial externa (MME) a la membrana mitocondrial interna (MMI) y no la actividad enzimática de P450scc en sí misma <sup>38,46-48</sup>. Por lo tanto, este es el primer paso en la vía de síntesis de hormonas esteroideas. Este evento es regulado por acción hormonal <sup>38,46,49-51</sup> y requiere de la síntesis *de novo* de proteínas <sup>38,52</sup>.

En las células esteroideogénicas, se ha caracterizado una proteína inducida por estímulo hormonal e involucrada en el transporte del colesterol denominada Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) <sup>38,53-55</sup>. Esta proteína es la que realiza la transferencia de colesterol del espacio externo al interior de la mitocondria participando en el paso limitante de la vía <sup>38,47,56,57</sup>. El precursor de StAR de 37 kDa presenta en su extremo amino terminal una secuencia de localización mitocondrial. La estimulación hormonal en células esteroideogénicas activa un clivaje proteolítico secuencial sobre el precursor de StAR que genera una proteína madura de 30 kDa <sup>38,47</sup>. StAR se sintetiza

*de novo* en el citosol frente al estímulo hormonal <sup>52</sup> y es importada a la mitocondria. La región C-terminal de StAR contiene un dominio de transferencia de lípidos denominado START, el cual estaría involucrado en la transferencia del colesterol. La entrega de colesterol al complejo enzimático P450scc finaliza con la escisión del dominio N-terminal de StAR (Figura 4) <sup>47</sup>.



**Figura 4. Vía canónica de síntesis de hormonas esteroideas.** Las hormonas tróficas estimulan la síntesis de hormonas esteroideas en distintos tejidos vía proteínas G. El proceso requiere la activación de la PKA y MAPKs, la inducción del gen *StAR* y la activación por fosforilación de la proteína StAR. Esta cascada de señalización permite el ingreso de colesterol a la mitocondria y su posterior conversión en pregnenolona, el primer esteroide.

Por otro lado, se ha descrito que el AA participa en la regulación hormonal de la esteroidogénesis. La estimulación hormonal de la síntesis de esteroides en la corteza adrenal y en las células testiculares de Leydig produce un incremento de los niveles de AA libre. Se ha demostrado que metabolitos del AA están involucrados en la regulación de la esteroidogénesis. En relación a esto, por ejemplo, se demostró que en las células de la zona fasciculata de la corteza de la glándula adrenal, los metabolitos 15-lipoxigenados participan en la regulación de la síntesis de P5 <sup>58</sup>. De hecho, el tejido



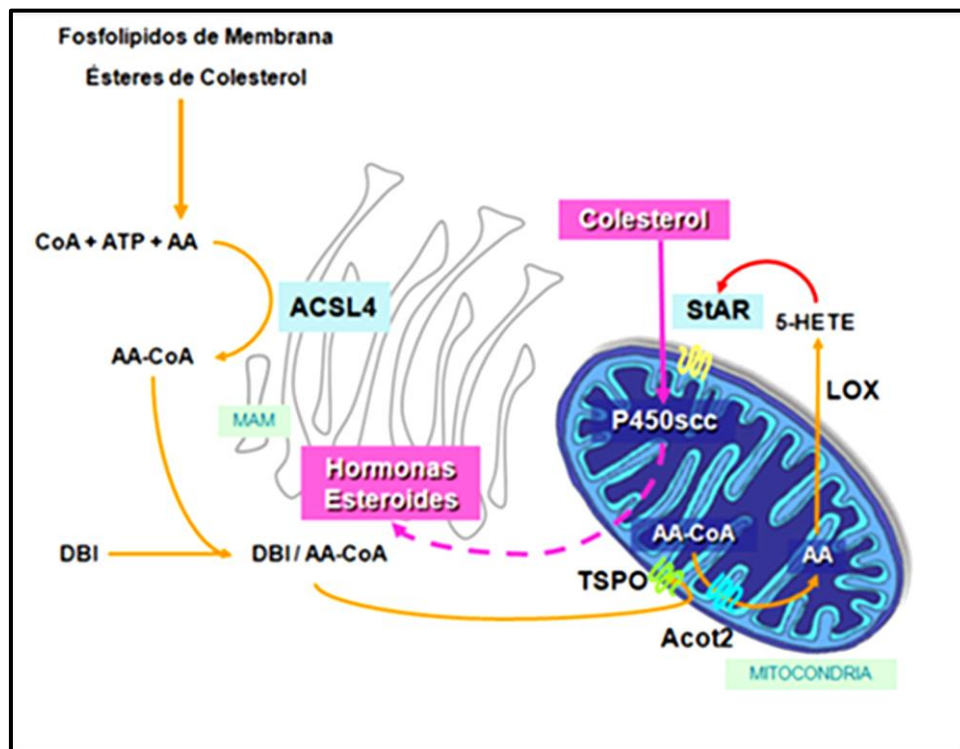
adrenocortical posee las vías 5-LOX y 15-LOX que generan 5-HETE y 15-HETE respectivamente a partir de AA <sup>59</sup>. En células de Leydig se demostró que 5-HPETE o 5-HETE están involucrados en el incremento de la producción de progesterona (P4) <sup>60</sup>.

El AA y sus metabolitos juegan un papel en la regulación de la expresión de StAR ya que, en la fase aguda de la síntesis de esteroides, la liberación de AA en la mitocondria es el primer estímulo para el transporte de colesterol <sup>61</sup>. En células de Leydig los metabolitos de AA producidos por 5-LOX son activadores de la expresión génica de StAR. El elemento de respuesta al AA reside en la región comprendida entre las bases -67/-96 del promotor StAR <sup>60</sup>. Se ha sido descrito en células de Leydig que por metabolitos de la epoxigenasa <sup>62</sup> tienen un efecto regulatorio sobre la expresión del gen de StAR y la esteroidogénesis.

### 3.2 Expresión y función de ACSL4 en tejidos esteroideogénicos

Inicialmente se planteó que la liberación de AA era producida por la PLA2 mediante la regulación hormonal <sup>63</sup>. Sin embargo, no hay evidencia directa que demuestre que PLA2 libere AA en tejidos esteroideogénicos, ni de que las hormonas esteroideogénicas activen a esta enzima. Estas observaciones sugirieron que otro tipo de mecanismo de liberación de AA debería operar en la regulación de la biosíntesis de esteroides desencadenada por hormonas tróficas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito un mecanismo de liberación de AA, regulado hormonalmente, en el que opera ACSL4 <sup>21,64-67</sup>. En este mecanismo mencionado ACSL4 secuestra al AA del *pool* libre citosólico para esterificarlo a AA-CoA <sup>19,66</sup>. Posteriormente interviene la enzima de la MMI denominada Acil- CoA tioesterasa 2 (ACOT2) <sup>21,64-68</sup>. Esta enzima hidroliza en la membrana mitocondrial el AA-CoA liberando los productos AA y CoA en el interior de la mitocondria <sup>21</sup> (Figura 5). ACOT2 pertenece a una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de diversos ésteres de CoA a ácido libre más CoA <sup>69,70</sup> y en consecuencia tienen implicancia sobre la regulación de los niveles intracelulares de esas moléculas y por ende en los procesos celulares que involucran a estos compuestos. Se ha demostrado que tanto el silenciamiento de la expresión de ACOT2 como de ACSL4 inhiben la producción de esteroides y la expresión de StAR <sup>21,66</sup>. Estos efectos se revierten por el agregado de AA o derivados permeables del colesterol, pero no por agregado de otros ácidos grasos, indicando que ACSL4 está involucrada específicamente en este mecanismo. También se demostró, que el inhibidor de ACSL4 Triacsina C, inhibe la esteroidogénesis estimulada por AMPc y la expresión de StAR <sup>66</sup>.

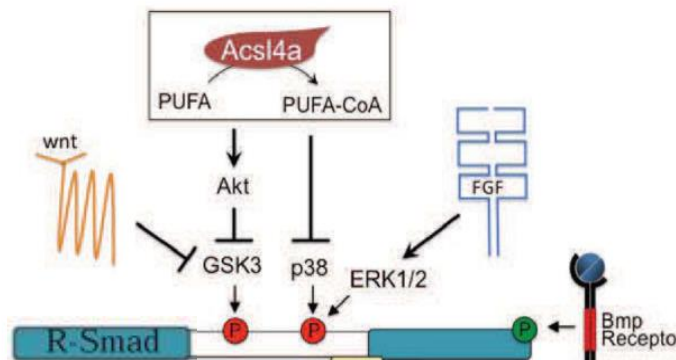
En este mecanismo el AA-CoA sería transportado hacia la mitocondria unido al Inhibidor de unión a diazepam o proteína DBI <sup>57,70,71</sup>, que se une al acil-CoA y que se expresa en altas concentraciones en células esteroidogénicas <sup>72,73 74</sup>. La proteína DBI es ligando del transportador TSPO localizado en la MME <sup>75-77</sup>. Esto posiblemente facilitaría la transferencia de AA-CoA a las mitocondrias con la consecuente disponibilidad del sustrato para ACOT2 en su sitio de acción <sup>21,37,66,78</sup>. Estos estudios proporcionan evidencia de una vía alternativa de generación de AA que involucra a ACSL4/ACOT2 y que compartimentaliza al AA y AA-CoA <sup>21,66,79</sup>. Todos estos resultados establecen un rol coordinado entre ACSL4 y ACOT2 ante el estímulo trófico que genera la liberación de AA en el interior de la mitocondria y la inducción de la expresión de StAR estimulando así la síntesis de hormonas esteroides.



**Figura 5. Modelo de liberación de AA al interior de la mitocondria y su relación con la esteroidogénesis.** Esquema tomado y modificado de “ACSL4” Maloberti P.M., Castillo A.F., Orlando U., Podesta E.J. (2016). Choi S. (eds) Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer, New York, NY.

#### 4. Rol de ACSL4 en diversas funciones y en patologías

Los AGs poliinsaturados de cadena larga y sus metabolitos juegan un rol importante en la biología celular y el desarrollo embrionario. Se demostró que *Acsl4a*, la enzima homóloga a ACSL4 en *zebrafish*, es esencial para el patrón dorsoventral apropiado en el desarrollo<sup>80</sup>. La pérdida de *Acsl4a* afecta la vía de señalización BMP (Bone Morphogenetic Protein). Los Bmp son ligandos de receptores Serina/Treonina quinasa los cuales regulan a los factores de transcripción dependientes de Smad (R-Smad) que a su vez regulan la transcripción de genes dependientes de Bmp. Los R-Smad pueden ser regulados también por otras vías de señalización diferentes que influyen en la embriogénesis. *Acsl4a* modula la actividad de factores de transcripción Smad, los mediadores río abajo de la señalización de BMP. *Acsl4a* promueve la inhibición de la quinasa p38, de la familia de las MAPKs y la inhibición mediada por Akt de la glucógeno sintasa quinasa 3, inhibidores críticos de la actividad de Smad (Figura 6). Estos resultados revelan un papel crítico para *Acsl4a* en la modulación de la actividad de BMP-Smad y proporcionan una vía potencial de los ácidos grasos insaturados de cadena larga para influir en una variedad de procesos de desarrollo. La pérdida de *Acsl4a* durante el desarrollo en *zebrafish* afecta a la vía de Bmp e induce un fenotipo dorsalizado anormal<sup>80</sup>.



**Figura 6. Esquema representativo de la regulación de la actividad de R-Smad por Acsl4a en zebrafish.** En la figura se observa el rol de ACSL4 en distintas vías de señalización en zebrafish a través de la regulación ejercida por *Acsl4a* sobre la actividad de R-Smad. PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. PUFA-CoA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga-CoA. FGF: factor de crecimiento de fibroblastos. (Imagen adaptada de Miyares, Stein et al. 2013).

Se ha descrito también que, en las células musculares lisas arteriales humanas (SMC), ACSL4 modula la liberación de la prostaglandina E2 (PGE2)<sup>81</sup>. ACSL4 es una

de las isoformas de ACSL expresadas en SMC arteriales humanas <sup>82</sup>. Estas células también expresan ACSL1, ACSL3 y ACSL5.<sup>81</sup> La enzima ACSL4 presente en SMC permite una importante incorporación de ácidos grasos 20: 4 en fosfolípidos lo cual regula la liberación de PGE2. Por lo tanto, en este sentido, ACSL4 desempeña también un papel importante en la biología y patología vascular <sup>81</sup>.

En humanos, se ha descrito también, que ACSL4 se encuentra mutada en familias con retraso mental no sindrómico asociado al cromosoma X <sup>83,84</sup>.

En *Drosophila melanogaster*, se demostró que la enzima homóloga de ACSL4 está involucrada en el transporte axonal de vesículas sinápticas y se requiere para el desarrollo normal del sistema nervioso <sup>71</sup>. Distintos grupos de trabajo han estudiado las funciones de ACSL4 en el desarrollo utilizando como modelo de estudio a *Drosophila*. Se sabe que la enzima en *Drosophila*, denominada dAcsl, es altamente homóloga a ACSL3 y ACSL4 humanas. Se demostró que dAcsl y ACSL4 son altamente conservadas en función dado que ACSL4 puede substituir las funciones de dAcsl en términos de viabilidad en las mutantes letales, almacenamiento de lípidos, y en las conexiones sinápticas del centro visual. En el desarrollo, la producción de Dpp (decapentaplegic, una proteína similar a BMP) disminuye específicamente en el cerebro de la larva en mutantes dAcsl. Esto produce una disminución de células de la glía y neuronas y alteraciones axonales en la corteza visual. Todos estos efectos son revertidos por la enzima ACSL4, pero no por la enzima mutada proveniente de pacientes con retraso mental asociado al cromosoma X <sup>85</sup>.

Por último, se ha observado una expresión alterada de ACSL4 en algunos tipos de cáncer y se ha demostrado que esta enzima tiene un rol en el desarrollo de un fenotipo agresivo en las células tumorales <sup>86-89</sup>. Por lo tanto, del rol de ACSL4 en cáncer nos explayaremos más adelante.

#### **4.1 ACSL4 y ferroptosis**

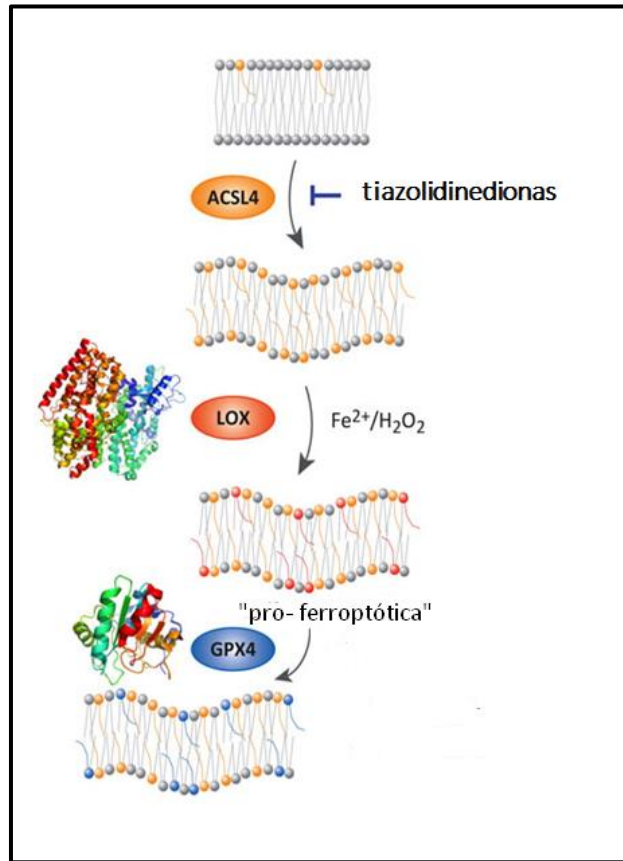
En los últimos años se ha encontrado que ACSL4 está involucrada en una nueva forma de muerte celular programada, la ferroptosis <sup>90-92</sup>. Esta nueva forma de muerte celular se descubrió en el 2012 al estudiar el mecanismo de células tumorales mutantes para RAS que destruyen la erastina. La ferroptosis se caracteriza por un desequilibrio redox que generalmente resulta en una gran cantidad de acumulación de hierro y un aumento en peróxidos de lípidos. La disminución de la reducción de peróxidos lipídicos causada por la inhibición de la enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4) y el aumento de

la generación de peróxidos lipídicos a partir de AA son dos vías principales que conducen a la ferroptosis <sup>93</sup>. Por otro lado, se demostró que la privación de cisteína conduce a la hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial y acumulación de peróxido de lípidos. La inhibición del ciclo del Krebs mitocondrial o la cadena de transporte de electrones mitiga la hiperpolarización del potencial de la membrana mitocondrial, la acumulación de peróxidos de lípidos y la ferroptosis <sup>94</sup>. La ferroptosis se ha estudiado en diversas enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Parkinson y el accidente cerebrovascular <sup>95</sup>. Este tipo de muerte celular se caracteriza morfológicamente por la presencia de mitocondrias más pequeñas que lo normal, membrana mitocondrial condensada, reducción o desaparición de las crestas mitocondriales y ruptura de la membrana mitocondrial externa. Puede ser inducida por compuestos experimentales (erastina, pequeña molécula letal Ras-selectiva 3, butioninasulfoximina), o por drogas clínicas (sulfasalazina, sorafenib, artesunat) en células tumorales y en algunas células normales (p.ej.: células tubulares del nefrón, neuronas, fibroblastos, linfocitos T). La desregulación de la ferroptosis está implicada en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la muerte de células tumorales, neurotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas, hepatotoxicidad inducida por drogas, fallas renales agudas, lesión por isquemia/reperfusión hepática y miocárdica entre otras <sup>96</sup>. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que la activación de ACSL4 inducida por isquemia contribuye a la lesión tisular mediada por ferroptosis en la isquemia/reperfusión intestinal <sup>95</sup>.

A través de distintos enfoques experimentales desarrollados en líneas celulares resistentes a la ferroptosis, se demostró también que ACSL4 es un componente esencial para la ejecución de este mecanismo. Se ha demostrado que ACSL4 dictamina la sensibilidad a la ferroptosis al dar forma a la composición lipídica celular. En este contexto, se observó que la inhibición farmacológica de ACSL4 con tiazolidinedionas (TZDs), atenúa la muerte tisular en un modelo de ferroptosis murino <sup>90,91</sup> y que este efecto ocurre a través de la inhibición de ACSL4. Estos compuestos han sido reportados para mejorar las condiciones patológicas en las que se le ha asignado a la ferroptosis un papel de gran importancia (Figura 7) <sup>91</sup>.

Por otro lado, Sebastián Doll y colaboradores, demostraron también que ACSL4 puede predecir la sensibilidad a la ferroptosis en un subconjunto de líneas celulares de cáncer de mama basal <sup>91</sup>. Como veremos más adelante, distintos estudios han correlacionado los niveles de expresión de ACSL4 con fenotipos de cáncer más agresivos, incluyendo mayor invasividad y proliferación <sup>89,97,98</sup>. Por lo tanto, sabiendo que estos tipos de cáncer de mama de mayor agresividad se encuentran entre los más

difíciles de tratar, resalta la urgencia de desarrollar agentes inductores de ferroptosis *in vivo* que sean eficaces para tratarlos de manera adecuada.



**Figura 7. Rol de ACSL4 en ferroptosis.** Esquema representativo del rol ejercido por ACSL4 en la ferroptosis. (Imagen tomada de Sebastián Doll y colaboradores 2016).

## 4.2 ACSL4 y Cáncer

### 4.2.1 Generalidades sobre el cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte en lo que respecta a la salud humana, más de 10 millones de pacientes mueren de cáncer cada año. Sin embargo, aunque se han revelado muchas hipótesis tumorales y estrategias de intervención, el mecanismo real de iniciación del tumor es aún desconocido <sup>99</sup>.

La tumorigénesis es el proceso por el cual se genera un desequilibrio entre la proliferación y la muerte celular. El resultado de este desequilibrio es lo que se conoce

como neoplasia, lo que consiste en una proliferación celular descontrolada que puede ser benigna o maligna. Las neoplasias benignas son lesiones caracterizadas por un crecimiento expansivo, frecuentemente a un ritmo lento, que no invaden los tejidos u otros órganos circundantes. En general, estas neoplasias forman tumores localizados delimitados regularmente por una cápsula fibrosa, de forma regular y células bien diferenciadas. Una neoplasia benigna sólo causa daño por compresión a los órganos o tejidos vecinos y no recurre después de la extirpación quirúrgica. Por otro lado, las neoplasias malignas se conocen colectivamente como cánceres. Las neoplasias malignas muestran características agresivas ya que pueden invadir y destruir tejidos adyacentes y hacer metástasis hacia otras partes del cuerpo a través de la circulación sanguínea y/o el sistema linfático<sup>100</sup>. Estas neoplasias se caracterizan por tumores que presentan células que se multiplican sin control y tienen capacidad de invasión <sup>101</sup>.

Según las estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud, en el año 2018, el cáncer era la segunda causa principal de muerte a nivel mundial. Entre los tipos de cáncer más comunes en los hombres se encuentran el cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado; mientras que el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, pulmonar, cervical y de tiroides son los más comunes entre las mujeres.

A nivel molecular, las últimas dos décadas han sido testigos de enormes avances en nuestra comprensión del cáncer. Este conocimiento ha revelado un gran número de objetivos nuevos e interesantes para el desarrollo de terapias efectivas, algunas de los cuales ya han entrado en la práctica clínica. Hoy día se sabe que el proceso por el cual las células normales se transforman progresivamente en malignas requiere la adquisición secuencial de mutaciones que surgen como consecuencia de daño al genoma. Este daño puede ser el resultado de procesos endógenos como errores en la replicación del ADN, la inestabilidad química intrínseca de ciertas bases del ADN o el ataque de radicales libres generados durante el metabolismo <sup>102</sup>. Este daño en el genoma puede causar la desregulación de múltiples vías celulares lo que puede derivar en desdiferenciación celular, evasión de apoptosis, incremento de proliferación, migración e invasión celular, entre otros <sup>101,103</sup>.

Hacia principios de los años 80 se informó la existencia de una correlación entre el proceso conocido como Transición Epitelio Mesenquimal (EMT) y el cáncer <sup>104</sup>. La EMT clásica, se describió por primera vez en el desarrollo embrionario, dicho mecanismo da como resultado la transición de células epiteliales (E) a células con un

fenotipo mesenquimal (M), definido por marcadores prototípicos, como E-cadherina y vimentina. Se ha demostrado que la EMT es crucial para muchas etapas del desarrollo embrionario<sup>103</sup>. De manera similar al desarrollo embrionario, se ha demostrado que los cambios en los fenotipos celulares definidos como EMT desempeñan un papel en el proceso tumorigénico<sup>103</sup>. Las células tumorales benignas adquieren propiedades de infiltración y metástasis durante la progresión del tumor debido a la EMT<sup>104</sup>.

La EMT permite que los tumores sólidos se vuelvan más malignos, aumentando su capacidad de invasión y actividad metastásica. Los eventos que ocurren durante la EMT incluyen la pérdida de uniones adherentes y la regulación negativa de citoqueratinas y E-cadherina, marcadores epiteliales específicos. Por otro lado, involucra el aumento de marcadores mesenquimales, como la fibronectina, N-cadherina y vimentina, la obtención de un fenotipo invasivo del tipo fibroblastoide y la adquisición de resistencia a la anoikis / apoptosis<sup>103,104</sup>.

A medida que aumenta el volumen tumoral, las células que se localizan en el centro del tumor quedan en un microambiente hipóxico, es decir, con menor acceso al oxígeno. La hipoxia induce la expresión de factores de angiogénesis, proceso fisiológico por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Se ha demostrado que, en muchos tipos de cáncer diferentes, se hace uso de los mecanismos angiogénicos en beneficio del tumor, con el objetivo de estimular el crecimiento del mismo y de esta manera favorecer la progresión de la enfermedad. El primer paso antes de la metástasis es la invasión, la cual es favorecida por la angiogénesis del tumor. La metástasis es un proceso de diseminación de células tumorales a partir de una masa tumoral primaria a un sitio diferente a través de vasos sanguíneos y vasos linfáticos<sup>105-108</sup>.

#### **4.2.2 Breves nociones sobre el cáncer de mama**

El cáncer de mama se origina a partir de los diferentes elementos que constituyen la anatomía del tejido mamario. Este tipo de cáncer representa un grupo heterogéneo de lesiones en términos de presentación clínica, características histopatológicas y biológicas, exhibiendo comportamientos diferentes, lo que refleja su complejidad molecular y diversidad biológica<sup>109</sup>. Esta situación lleva a la existencia de diferentes respuestas a los tratamientos y la necesidad de recibir diferentes estrategias terapéuticas<sup>110</sup>.



Una de las clasificaciones existente para los tumores de mama los divide de la siguiente manera: los que expresan receptor de estrógeno (ER<sup>+</sup>) y los que no expresan receptor de estrógeno (ER<sup>-</sup>). Los carcinomas ER<sup>+</sup> son de baja agresividad y tienen buena respuesta al tratamiento mientras que los ER<sup>-</sup> son agresivos y aún no poseen un tratamiento adecuado. Un cáncer de mama puede comenzar como ER<sup>+</sup> y convertirse gradualmente en ER<sup>-</sup> a medida que progresa la EMT <sup>111</sup>.

En relación a la clasificación anteriormente mencionada, actualmente existen tres clases principales de terapia endócrina en el cáncer RE<sup>+</sup>: los moduladores selectivos del ER (SERM), los reguladores negativos del RE (SERD) y los inhibidores de aromatasa <sup>112</sup>. El prototipo del SERM es el tamoxifeno, que compite con el estradiol (E<sub>2</sub>) por su unión al ER y en tejido mamario actúa antagonizando las acciones mitogénicas de los estrógenos. Sin embargo, tiene funciones parcialmente estrogénicas en ciertos tejidos <sup>111</sup>. El Fulvestrant, que funciona como un SERD, es un antagonista de RE en todos los tejidos y compite por la unión de E<sub>2</sub> y acelerando la degradación del receptor. Un problema importante en el tratamiento del cáncer de mama es que muchas pacientes, particularmente aquellas con enfermedad metastásica, rápidamente desarrollan resistencia a estos tratamientos.

De acuerdo con los perfiles de expresión génica, los estudios pioneros realizados por Sorlie y colaboradores <sup>113</sup> dieron a conocer un "retrato molecular" distintivo del cáncer de mama según el cual los tumores se clasifican en cinco subtipos intrínsecos distintos: luminal A, luminal B (HER2<sup>+</sup> o HER2<sup>-</sup>), HER2 sobreexpresado (no luminal), tumores del tipo basal o triple negativos (Tabla 1) <sup>109,110</sup>, donde HER2 refiere al Factor de crecimiento epidérmico humano.

Aproximadamente el 70% de los cánceres de mama triple negativo (TNBCs) pertenecen al subtipo de tipo basal. Los TNBCs representan aproximadamente del 10% al 15% de los cánceres de mama diagnosticados. Este tipo de cáncer constituye un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que son más agresivas y se asocian con un mal pronóstico <sup>114</sup>. Tal como se detalla en la Tabla 1, los TNBCs se definen por la ausencia de expresión de RE, del receptor de progesterona (RP) y de HER2 y resultan insensibles tanto a la terapia endócrina como a la inmunoterapia (Trastuzumab y Lapatinib) por lo que no existe un tratamiento adecuado para este tipo de patología <sup>115</sup>.

Los TNBCs están asociados con riesgo incrementado de metástasis y alto grado de recurrencia. Los pacientes con TNBC tienen peor pronóstico y sobrevida más corta

entre todos los tipos de cáncer de mama <sup>116,117</sup>. Hoy en día el tratamiento se basa en cirugía y quimioterapias que presentan poco éxito.

Subtipo Intrínseco	Inmunohistoquímica	Pronóstico	Prevalencia (%)
Luminal A	ER+/ PR+/ HER2- Ki67-	Bueno	23,7
Luminal B	ER+/PR+ / HER2 ±/ Ki67+	Intermedio (HER2-)/ Pobre (HER2+)	38,8 / 14
HER2+ sobreexpresado	ER- /PR- / HER2+	Pobre	11,2
Basal (TNBC)	ER- /PR- / HER2 -	Pobre	12,3

**Tabla 1. Resumen del subtipo molecular de tumores de mama según expresión génica y porcentaje de prevalencia.** En la tabla se indica las características inmunohistoquímicas de cada subtipo tumoral, el pronóstico y la prevalencia. Ki67 se utiliza como marcador de proliferación celular. La prevalencia de cada subtipo fue tomada de Cheang MC y colaboradores 2009 y de Sorlie y colaboradores 2003 <sup>118,119</sup>.

- Líneas celulares para el estudio del cáncer de mama in vitro:

Las líneas celulares de cáncer de mama (BCC) humanas que se utilizan para el estudio de esta enfermedad a nivel mundial se obtuvieron a partir de muestras de pacientes y continúan siendo expandidas en los laboratorios. La primera línea celular de cáncer de mama que se estableció fue la BT-20 en 1958 <sup>120</sup>. En este trabajo se utilizaron dos de las líneas que con más frecuencia aparecen en los distintos trabajos de investigación. Dichas líneas celulares son: MDA-MB-231 <sup>121-123</sup>, y la línea MCF-7<sup>123</sup>, representando modelos tumorales de alta agresividad y baja agresividad respectivamente. Las líneas celulares de cáncer de mama pueden exhibir fenotipos epiteliales o fibroblásticos como se refleja por sus morfologías y expresión de proteínas <sup>124</sup>. Una célula de cáncer de mama con un fenotipo epitelial puede experimentar una transición a un fenotipo fibroblástico, lo que da lugar a una capacidad más invasiva. La progresión del cáncer de mama en humanos resulta primero en la pérdida del ER y, posteriormente, en la adquisición de Vimentina (Vim). Esto último se asocia con un mayor potencial metastásico a través de una mayor capacidad de invasión<sup>124</sup>. Por lo tanto, la falta de ER y la presencia de Vim se asocian con un mal pronóstico en el cáncer de mama humano. La línea celular MCF-7 es ER<sup>+</sup>/Vim<sup>-</sup>, no es invasiva y tiene un fenotipo

tendiente al epitelial. La línea MDA-MB-231 es ER<sup>-</sup>/Vim<sup>+</sup> y presentan un fenotipo altamente invasivo con tendencia a un fenotipo fibroblástico<sup>125-127</sup>.

Línea Celular	Clasificación	ER	PR	HER 2	Ki 67	ACSL4	Vim	Agresividad	Migración
MDA-MB-231	TNBC	-	-	-	++++	++++	+++	++++	++++
MCF-7	Luminal A	+++	+	-	++++	-/+	-	+	+

**Tabla 2.** Características fenotípicas y genotípicas de las líneas celulares utilizadas en este trabajo de tesis: MDA-MB-232 y MCF-7.

Recientemente se realizó una caracterización molecular por inmunocitoquímica utilizando marcadores que permitieron verificar las características fenotípicas de varias líneas BCC<sup>127</sup>. Se ha agregado al conocido marcador de proliferación celular Ki 67, el cual ha sido muy estudiado en los últimos tiempos. En la Tabla 2 se presenta un resumen de las características fenotípicas y genotípicas de las líneas BCC utilizadas en este trabajo de tesis<sup>97,127,128</sup>.

#### 4.2.3 Metabolismo del ácido araquidónico y relación con la tumorigénesis

Durante la última década, se ha hecho evidente que el metabolismo de AA juega un papel clave en la carcinogénesis. Dichos datos son particularmente convincentes con relación al metabolismo de AA mediado por la ciclooxigenasa (COX)<sup>129</sup>. Actualmente, se ha establecido firmemente el rol de la sobreexpresión de COX y los eicosanoides derivados de COX en la carcinogénesis, así como los efectos antineoplásicos de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Otras líneas de estudio similares han implicado la sobreexpresión de otras enzimas metabólicas del AA en la supervivencia de las células cancerosas, a su vez, inhibidores de estas enzimas han demostrado propiedades antineoplásicas<sup>130</sup>.

Estudios epidemiológicos, clínicos y en animales proporcionaron evidencia de que la activación de las vías de COX y LOX durante la inflamación crónica y la carcinogénesis da como resultado un metabolismo aberrante del AA, que puede contribuir a la carcinogénesis<sup>131</sup>. Se ha informado que los AINEs tienen efectos

beneficiosos en la reducción del riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer, incluidos cáncer de mama, colon, pulmón y próstata<sup>132</sup>. Estos medicamentos son agentes antiinflamatorios bien conocidos y ejercen sus efectos a través de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas al bloquear la enzima COX<sup>133</sup>. Un incremento de la actividad de las LOX estimula la proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis de células cancerosas<sup>134–137</sup>. Las LOX se sobreexpresan en diversos tipos de cáncer: gástrico, de mama y de tiroides anaplásico<sup>138–140</sup>. La sobreexpresión de LOX potencia la proliferación celular y la angiogénesis tumoral en distintos tipos de tumores<sup>137,141</sup>.

Cabe mencionar que existen dos isoformas de COX: COX-1 y COX-2. En general, tanto la COX-1 como la COX-2 están involucradas en la síntesis de prostaglandinas. La enzima COX1 está constitutivamente activa y se encuentra presente en la mayoría de las células del cuerpo, mientras que la expresión constitutiva de la COX-2 se restringe en gran medida al riñón y a áreas del sistema nervioso central. Sin embargo, los niveles de COX-2 son altamente inducibles en muchos tejidos por estímulos proinflamatorios y mitogénicos, incluidas las citoquinas y el factor de crecimiento. Las prostaglandinas producidas por COX-1 juegan un papel en la función plaquetaria y la cito- protección gastrointestinal, mientras que las producidas por COX-2 están involucradas en el dolor y la inflamación<sup>133,142</sup>. La inducción o sobreexpresión de COX-2 está asociada con un aumento de la producción de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), uno de los principales productos de COX-2. La PGE<sub>2</sub> proinflamatoria es la más abundante en diversos tipos de cáncer humano, incluyendo cáncer de colon y recto, pulmón, mama y cáncer de cabeza y cuello, y a menudo se asocia con un mal pronóstico<sup>143</sup>.

Por otro lado, la importancia de los metabolitos del AA derivados del citocromo P450 (CYP), tales como el ácido 20-hidroxi-eicosatetraenoico (20-HETE) y los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) han sido descritos como promotores del crecimiento tumoral en varios tipos de cáncer<sup>144</sup>. En particular el 20-HETE es conocido por generar respuestas mitogénicas en células cancerosas. Se ha demostrado en células de cáncer de próstata que el 20-HETE puede actuar como una molécula de señalización en las vías implicadas en la viabilidad celular tras la estimulación del receptor de andrógenos (AR)<sup>145</sup>.

#### 4.2.4 Expresión y función de ACSL4 en cáncer

Se ha demostrado en varios estudios que existe un incremento en la expresión de ACSL4 en varios tipos de cáncer como el de colon, hígado, gástrico, mama y próstata, y dicho aumento se vio asociado a una mayor agresividad tumoral <sup>86,126,146–148</sup>. Xinyu Wu y colaboradores demostraron que la expresión ectópica de ACSL4 en células de cáncer de próstata negativas para ACSL4 aumenta la proliferación, migración e invasión de las mismas. Los estudios que llevaron a cabo en este modelo celular, demostraron además que ACSL4 regula positivamente distintas proteínas de vías de traducción, incluidas la vía p-AKT, LSD1 y  $\beta$ -catenina <sup>98</sup>.

En lo que respecta al cáncer de mama particularmente, se sabe que ACSL4 se expresa diferencialmente en función del estado receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ )<sup>22</sup>. Se ha demostrado que existe una relación inversa entre la expresión ER $\alpha$  y la expresión ACSL4, dicha relación también se observó para el estado del receptor de andrógenos (AR) en cáncer de mama y de próstata<sup>148</sup>. Esta correlación inversa también fue observada por otros autores en muestras de tumores de pacientes <sup>148</sup> observándose la mayor expresión de ACSL4 en los TNBCs. Además, se ha reportado que la pérdida de la sensibilidad a hormonas esteroideas en los TNBCs se asocia a una inducción de la expresión de ACSL4 <sup>88,97,126,128,149</sup>.

En nuestro laboratorio hemos determinado que ACSL4 posee un rol causal en el control del fenotipo agresivo en el cáncer de mama <sup>89,97,126,128</sup>. La sobreexpresión de ACSL4 tanto a nivel proteína como ARNm contribuye a la mayor agresividad incrementando la proliferación, invasión y migración <sup>97,128</sup>. En células TNBC esta sobreexpresión genera un aumento de la producción de agentes potenciadores de la agresividad tumoral como el AA intramitocondrial y los metabolitos derivados de COX-2 y 5-LOX, enzimas que también presentan un aumento de expresión en estas células <sup>128</sup>. En relación con esto, se ha logrado disminuir la proliferación celular *in vitro* en líneas TNBC y la producción de tumores *in vivo* utilizando una combinación de inhibidores de ACSL4, 5-LOX y COX-2, en dosis que “per se” no son efectivas, sugiriendo que existe una sinergia de estos inhibidores. Se sugirió entonces que ACSL4, COX-2 y 5-LOX interactúan funcionalmente y forman un sistema integrado que opera de manera concertada para regular el crecimiento tumoral y consecuentemente pueden ser potenciales blancos terapéuticos para el control de la proliferación como del potencial metastásico de células de cáncer de mama <sup>97,128</sup>.

Se sabe que los niveles de ACSL4 están elevados en la línea celular de cáncer de mama TNBC altamente agresiva como es la línea MDA-MB-231, en contraposición con lo que sucede en las células de la línea MCF-7, las que presentan una menor agresividad tumoral y son positivas para la expresión del ER. A través de varios estudios, se ha demostrado la correlación entre ACSL4 y la mayor agresividad del cáncer de mama <sup>22,148</sup>.

A nivel experimental, se ha observado que la sobreexpresión transitoria de ACSL4 en células MCF-7, genera una mayor agresividad tumoral y un aumento en la invasión, migración y proliferación celular. Por otro lado, la inhibición de la expresión de ACSL4 mediante la utilización de un shARN en células MDA-MB-231 generó una disminución en la agresividad de la línea <sup>22,88</sup>. En un estudio similar sobre las líneas de cáncer de mama SK- BR3, positiva para ER, en las que se sobreexpresó ACSL4 se observó un aumento en la proliferación celular <sup>88</sup>. En concordancia con estos resultados, en nuestro laboratorio se obtuvieron líneas estables inducibles de células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 bajo el control de tetraciclina o doxiciclina (MCF-7 tet/off ACSL4). La sola sobreexpresión de ACSL4 en la línea estable MCF-7 tet-off transformó el fenotipo de esta línea a un fenotipo altamente agresivo con respecto a la línea celular control MCF-7 tet-off (MCF-7 tet-off control) en la cual la transfección se realizó con el plásmido vacío <sup>127</sup>. En concordancia con lo anterior, la inhibición de la expresión por tratamiento con un shRNA en células MDA-MB-231 altamente agresivas, produjo una pérdida de la agresividad medida por la disminución de la proliferación, migración, producción de metabolitos lipooxigenados e invasión en matrigel <sup>22,88</sup>.

En nuestro laboratorio se ha observado que la sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7 tet-off modula negativamente la expresión del ER y PR tanto a nivel ARNm como de proteína y esta respuesta se revierte por tratamiento de estas células con doxiciclina <sup>97</sup>. A su vez, otros autores han silenciado ER en células MCF-7 que sobreexpresaban ACSL4 y han observado que dicho silenciamiento induce aún más la expresión de ACSL4 <sup>149</sup>. Se ha reportado además que el silenciamiento de ACSL4 en la línea MDA-MB-231 reestablece la expresión de ER <sup>126</sup>. Todos estos datos evidencian y confirman lo mencionado anteriormente, que existe una relación inversa en la expresión de ACSL4 y ER.

Además, utilizando las células estables inducibles MCF-7 tet-off/ACSL4 se realizaron experimentos *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos *in vitro*. Al

inocular células de la línea MCF-7 tet/off ACSL4 en un modelo xenogénico (ratones hembra nude atímicos) se observó el desarrollo de tumores con un marcado polimorfismo nuclear, alto índice mitótico y baja expresión de ER y PR tanto a nivel ARNm como de proteína, cuyo crecimiento fue inhibido al disminuir la expresión de ACSL4 con doxiciclina <sup>127</sup>. Cabe destacar que las células de la línea MCF-7 no desarrollan tumores cuando son inoculadas en los ratones mencionados previamente, sin embargo, al sobreexpresar ACSL4 pueden producir tumores aún sin el agregado de estrógenos. Por tanto, la sola sobreexpresión de ACSL4 es capaz de transformar a las células MCF-7, en generadoras de tumores *in vivo*. Resultados similares a este fueron observados por otros autores<sup>127,149</sup>.

Por otro lado, también se realizaron previo a este trabajo de tesis doctoral análisis de transcriptómica y proteómica funcional en las células MCF-7 tet-off/ACSL4 y su respectivo control, los cuales sirvieron como base para este trabajo.

#### **4.2.5 ACSL4 y su relación con la vía mTOR en células de cáncer de mama**

El mecanismo molecular que subyace a la resistencia endócrina del cáncer de mama es muy complicado e involucra muchas moléculas y vías de transducción <sup>150</sup>. La vía PI3K / Akt / mTOR es un ejemplo de eso, y está involucrada en el crecimiento, proliferación, supervivencia, motilidad, metabolismo y regulación de la respuesta inmune. La activación de esta vía es una de las principales causas de resistencia de las células cancerosas a las terapias antitumorales <sup>151</sup>. A través del análisis del transcriptoma y ensayos de proteómica funcional se demostró que ACSL4 es un regulador de esta vía en las células tumorales de cáncer de mama. En nuestro laboratorio se realizó, previo a este trabajo de tesis doctoral, el estudio del transcriptoma de las células MCF-7 tet-off/ ACSL4 y MCF-7 tet-off control a través de la secuenciación total del mismo mediante RNA sequencing (RNA-seq) <sup>152</sup>. La secuenciación directa de más de 30.000 transcritos demostró que las células que sobreexpresan ACSL4 poseen alrededor de 4.000 transcritos que claramente presentan diferencias significativas de expresión con respecto a las células control. De los mismos alrededor de 2.500 están incrementados y 1.500 están disminuidos<sup>97,152</sup>. El análisis bioinformático mediante el programa IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Quiagen) demostró que diferentes funciones celulares se ven afectadas por ACSL4 dentro de dichas funciones se destacan las relacionadas con la proliferación, migración e invasión celular. A su vez, a través de este análisis, la vía de señalización AKT-mTOR-p70S6K fue identificada como una de las

principales vías relacionadas con el mecanismo de acción de ACSL4 en el comportamiento tumoral.

Por otro lado, previamente se realizaron estudios de proteómica funcional mediante la técnica Reverse Phase Protein Array (RPPA), que consiste en la detección de proteínas por anticuerpos de alto rendimiento desarrollados para medir estados de fosforilación como también niveles de intermediarios de vías de señalización con el objetivo de entender qué caminos metabólicos están involucrados en este proceso. Se comparó la proteómica funcional de células MCF-7 tet-off/ACSL4 con respecto a las células MCF-7 tet-off control<sup>97</sup>. El patrón de expresión de proteínas y/o fosforilación fue notablemente diferente entre las MCF-7 tet-off/ACSL4 y MCF-7 tet-off control. El análisis de los datos obtenidos en el RPPA con el programa bioinformático The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) determinó que ACSL4 regula la vía de mTOR debido a que se ha demostrado que la sobreexpresión de ACSL4 induce significativamente la fosforilación de proteínas asociadas a esta vía<sup>97</sup>. Los resultados demostraron que la sobreexpresión de ACSL4 induce la fosforilación de proteínas que actúan río abajo del complejo mTORC1 como la proteína ribosómica S6 quinasa 70 kDa polipéptido 1 (p70S6K) que fosforila a la proteína ribosómica S6, la cual también aumenta su nivel de fosforilación. También se induce la fosforilación del factor de iniciación 4E-BP1, sustrato de mTORC1. En cuanto al complejo mTORC2, se observó que la sobreexpresión de ACSL4 induce la fosforilación del componente Rictor<sup>97</sup>. Otra fosfoproteína interesante que es modulada por la expresión ACSL4 es la proteína quinasa activada por AMP subunidad catalítica alfa 1 (AMPK). Mediante fosforilaciones se da como resultado la activación de la vía de mTOR. La especificidad de ACSL4 fue establecida por la inhibición específica de su expresión en células MCF-7 tet-off/ACSL4 tratadas con doxiciclina. En este caso, los datos de RPPA mostraron un patrón similar al de MCF-7 tet-off control apoyando aún más el papel de ACSL4 en los efectos observados. Estos resultados fueron validados con ensayos *in vitro* en el mismo sistema celular con y sin doxiciclina y también mediante la sobreexpresión de ACSL4 en la línea T47D y el silenciamiento de ACSL4 en MDA-MB-231. Todos estos hallazgos sugieren que la ruta de mTOR es parte de la transducción de señales involucrada en los efectos de ACSL4. Además, los análisis de RPPA confirmaron los hallazgos previos que muestran que ACSL4 negativamente regula la expresión de ER<sup>97</sup>.

Estos resultados avalaron a ACSL4 como un nuevo regulador de la vía de mTOR. Se evaluaron también los efectos de los metabolitos de LOX sobre la vía mTOR



donde se demostró que la reducción de LOX-5 reduce la fosforilación de p70S6K y Rictor demostrando que los metabolitos de LOX-5 son, en parte, los mediadores de los efectos de ACSL4 en la regulación de la vía mTOR <sup>97</sup> (Figura 8).

El cáncer de mama metastásico o MBC de sus siglas en inglés, es un tipo de cáncer de mama en el cual las células han migrado e invadido otros órganos como los pulmones y los huesos, generalmente se considera incurable, con tasas de respuesta y duración que disminuyen progresivamente con las líneas de tratamiento posteriores. El MBC tiene una etiología heterogénea, incluido el cáncer de mama triple negativo, y es una de las causas más frecuentes de muerte por cáncer, con más de 500.000 muertes anuales en todo el mundo. El tratamiento del cáncer diseminado generalmente enfrenta obstáculos asociados a la resistencia a la terapia <sup>89</sup>. Recientemente, basándonos en nuestras evidencias de que ACSL4 participa en la resistencia tumoral a la terapia hormonal <sup>97</sup>, nuestro grupo de laboratorio ha estudiado y reportado evidencia que sugiere que la resistencia en MBC dependiente de ACSL4 podría implicar la activación del camino mTOR <sup>89</sup> (Figura 8).

#### **4.2.6 Inhibición de ACSL4 y de la proliferación en células de cáncer de mama**

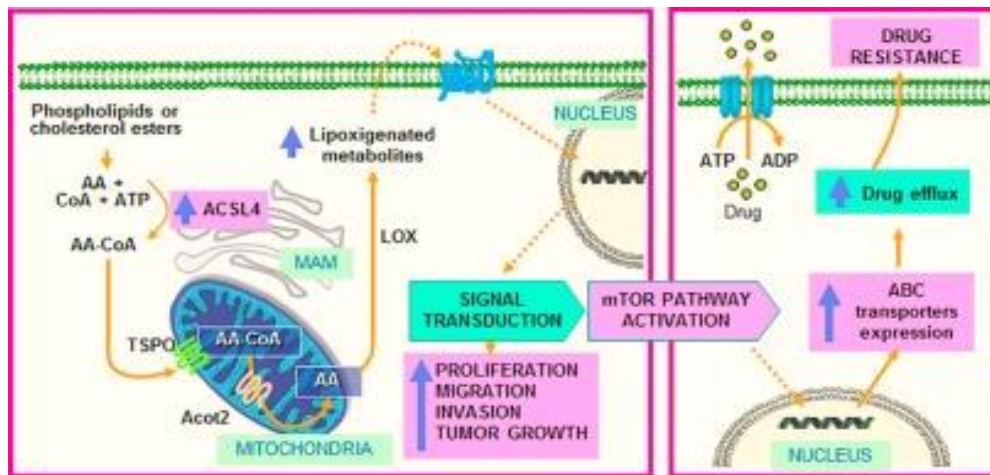
Las tiazolidinedionas (TZDs) son una clase de agentes orales sensibilizadores a la insulina, ampliamente utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2. El mecanismo de acción de TZD está mediado en gran medida a través de la activación de PPAR- $\gamma$ , un miembro de la superfamilia de factores de transcripción nuclear activados por ligando. Las TZDs también pueden ejercer efectos no genómicos. Por ejemplo, se ha demostrado que la rosiglitazona (una TZD) activa la AMPK a través de un mecanismo independiente de PPAR- $\gamma$ . Con respecto a las isoformas de ACSL, los estudios *in vitro* de proteínas recombinantes de ratas han demostrado que las TZDs pueden inhibir directamente la actividad de uno de los productos génicos, ACSL4 <sup>82</sup>.

Se ha demostrado que la Rosiglitazona, inhibidor de ACSL4, junto con Rapamicina, inhibidor de la vía de mTOR, pueden actuar en combinación para inhibir la proliferación celular en células de cáncer de mama MCF-7 tet-off/ACSL4. La sinergia en la acción de estos compuestos también se observó mediante la inhibición de la expresión de la proteína fosfo-S6. Además, en células que no expresan ACSL4, no se

ha visto esta sinergia, demostrando que los efectos observados se deben a la presencia de ACSL4 en el modelo utilizado<sup>97</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación celular *in vitro* y del crecimiento tumoral *in vivo* mediante la combinación de inhibidores de ACSL4 y de ER. La combinación fue efectiva inhibiendo la proliferación celular y el crecimiento tumoral en MDA-MB-231. Estos resultados sugieren que, inhibidores de ACSL4 e inhibidores de ER, puede ser una combinación interesante en el tratamiento del cáncer de mama, y siendo utilizados en dosis menores a las de los tratamientos convencionales debido a la potenciación de su acción al utilizarlos en conjunto. De esta manera, se podrían prevenir los efectos secundarios de la utilización de dosis supra-máximas y generar mejores beneficios en la terapia que cuando se utiliza una única droga <sup>97</sup>.

En relación con la resistencia a medicamentos en el MBC, nuestro grupo de laboratorio realizó estudios con el objetivo de dilucidar la participación de ACSL4 en la resistencia a los medicamentos contra el cáncer y los mecanismos subyacentes. Los medicamentos utilizados en dicho estudio se encontraban entre los agentes quimioterapéuticos más comunes utilizados para tratar los tumores de mama. Se demostró que la inhibición de ACSL4 resulta efectiva con los tres fármacos quimioterapéuticos utilizados: cisplatino, doxorubicina y paclitaxel. Por lo tanto, el bloqueo de ACSL4 en combinación con medicamentos quimioterapéuticos podría mejorar significativamente el crecimiento tumoral <sup>89</sup>. Otros ensayos revelaron el papel de ACSL4 como un nuevo regulador de algunos transportadores dependientes de energía, ya que la sobreexpresión de ACSL4 aumentó la expresión de algunos de estos transportadores, tales como ABCC8, ABCC4 y ABCG2, mientras que la inhibición de su expresión o de su actividad con Triacsina C redujo los niveles de las proteínas. Además, la inhibición de la actividad ABCG2 restauró la sensibilidad a cisplatino, doxorubicina y paclitaxel en células al sobreexpresar ACSL4 <sup>89</sup> (Figura 8).



**Figura 8. Rol de ACSL4 en cáncer y resistencia a medicamentos.** Esquema representativo del rol de ACSL4 en la activación de la vía mTOR<sup>97</sup>, la agresividad tumoral y la resistencia a droga extraído del trabajo realizado por Orlando U. y colaboradores <sup>89</sup>.

Por lo tanto, la inhibición de ACSL4 tiene un beneficio potencial en aplicaciones terapéuticas en el futuro y también es importante el rol que pudiera tener como biomarcador en la agresividad del cáncer de mama debido a su correlación con el cáncer TNBC. En tumores donde esta correlación no se dé, es probable que la expresión de ACSL4 posea un valor pronóstico negativo en cuanto a progresión de la enfermedad o sensibilidad a los tratamientos. Los resultados expuestos en conjunto avalan fuertemente el rol causal de ACSL4 en la inducción del fenotipo agresivo en células de cáncer de mama TNBC.

## 5. Regulación de la expresión de ACSL4

### 5.1 Regulación transcripcional de ACSL4

La regulación transcripcional de ACSL4 ha sido ampliamente estudiada. Estudios previos han descrito y analizado las secuencias promotoras de la enzima tanto en el gen humano como en el murino. Se ha demostrado que no existe la secuencia correspondiente a la caja TATA pero sí la existencia de una caja CCAAT dentro del promotor del gen de ACSL4 humano <sup>6,17,153</sup>. Es sabido que, los promotores que carecen de TATA Box (80 % en mamíferos) <sup>153</sup> son ricos en islas GC (GpC) <sup>153</sup> y, en estos genes, el sitio de inicio de la transcripción (TSS) puede ocurrir en varios lugares. Sp1 es un factor de transcripción con un rol importante en el reclutamiento de la maquinaria de transcripción en este tipo de promotores <sup>154</sup>. Se han identificado, en el promotor de ACSL4 posibles elementos en *cis* para diferentes factores de transcripción.

Además, se pudo determinar la presencia de secuencias ricas en GC con características de GpC cercanas a los TSS en los análisis realizados en el promotor tanto humano como murino <sup>6,17</sup>.

En nuestro laboratorio, se caracterizó con anterioridad el promotor de ACSL4 murino. Mediante la inducción con las hormonas hCG y ACTH en células de Leydig, demostramos que la inducción de la actividad de este promotor es mediada por AMPc como segundo mensajero. Y, mediante delecciones unidireccionales, se pudo identificar que los sitios necesarios para la transcripción basal del mismo y aquellos inducidos por AMPc se encuentran en un fragmento de 150 pb <sup>6</sup>. Esta secuencia contiene los sitios consenso para los factores de transcripción Sp1 y CREB. El factor de transcripción CREB está asociado a la activación de genes inducidos por AMPc. Distintos estudios realizados en el promotor de ratón permitieron concluir, en esta especie que Sp1 está involucrado en la transcripción basal de ACSL4 mientras que CREB está involucrado en la inducción de la transcripción de ACSL4 por AMPc. Más aun, los resultados obtenidos en estos trabajos demostraron por primera vez el papel de Sp1 y CREB en la regulación de la transcripción del gen de ACSL4 <sup>6</sup>.

Por otro lado, recientemente, en nuestro laboratorio, demostramos que las diferencias de expresión en ACSL4 en líneas celulares de cáncer de mama humano de diferente agresividad se deben a diferencias en la regulación a nivel transcripcional. Demostramos que los elementos del receptor huérfano relacionado al retinoide alfa (ROR $\alpha$ ), Sp1 y E2F están involucrados en la actividad del promotor de ACSL4. Además, establecimos por primera vez que el receptor relacionado al estrógeno alfa (ERR $\alpha$ ) es un factor de transcripción involucrado en una mayor activación del promotor de ACSL4 humano en las células de cáncer de mama <sup>155</sup>.

## **5.2 Regulación post- transcripcional de ACSL4**

### **5.2.1 Regulación de ACSL4 por micro- ARNs**

Los microARNs (miRs) son una clase de moléculas no codificantes de ARN monocatenario, de 17 a 27 nucleótidos, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional<sup>156</sup>. Los miR juegan un papel importante en varios procesos biológicos, incluida la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis, el desarrollo de órganos, el metabolismo de los lípidos y la tumorigénesis <sup>157</sup>.

Se ha demostrado, previamente, la existencia de una regulación de ACSL4 por diferentes miRs. En este sentido, se ha observado en células de cáncer de colon, a través de un análisis del genoma, que mir34a regula el metabolismo lipídico mediante la regulación de la expresión de ACSL4. Se demostró que una mutación en el gen p53 produce la inhibición de la expresión de mir34a lo que lleva a que los genes regulados por este micro ARN aumenten su expresión<sup>158</sup>.

Por otro lado, recientemente, Wang y colaboradores demostraron que miR-34a regula la adipogénesis en adipocitos intramusculares porcinos teniendo como blanco a ACSL4<sup>157</sup>. En este trabajo a través de un análisis bioinformático se identificó a ACSL4 como un blanco transcripcional de miR-34a. Se logró demostrar en las células 293T de adipocitos porcinos, mediante ensayos de dual luciferasa, que mir34a no solo reduce la expresión a nivel de ARNm y proteína de ACSL4 si no también la expresión de genes involucrados en la lipogénesis, incluidos PPAR $\gamma$ , aP2 y SREBP-1<sup>157</sup>.

Un estudio reciente demostró que ACSL4 es regulada por miR-211-5p en carcinoma hepatocelular (HCC). En dicho estudio, se logró demostrar que ACSL4 es blanco directo de la acción de miR-211-5p en HCC, y que miR-211-5p suprime el fenotipo maligno mediante la inhibición de la expresión de ACSL4. Además, se observó que la sobreexpresión de miR-211-5p afectó la tumorigénesis y el crecimiento de HCC *in vivo*<sup>159</sup>.

### **5.3 Regulación post- traduccional de ACSL4**

#### **5.3.1 Regulación de ACSL4 por fosforilación**

En la regulación de la expresión de ACSL4 también podrían estar implicadas otras modificaciones post-traduccionales, entre ellas, la fosforilación<sup>160</sup>. Dado que las hormonas esteroideogénicas desencadenan la activación de quinasas, y que, algunos eventos como la localización subcelular, la dimerización y la vida media de las proteínas podría regularse mediante la adición de un grupo fosfato es que, en el año 2013, el grupo, Smith y colaboradores, procedieron a dilucidar mediante estudios en células esteroideogénicas murinas, si *Acs14* es fosforilada ante un estímulo hormonal. En este estudio se logró demostrar que, en células esteroideogénicas de ratón, *Acs14* es una fosfoproteína cuya fosforilación es hormonodependiente. Los estudios *in vitro* demostraron que *Acs14* es un sustrato tanto de PKA como de PKC y que su fosforilación

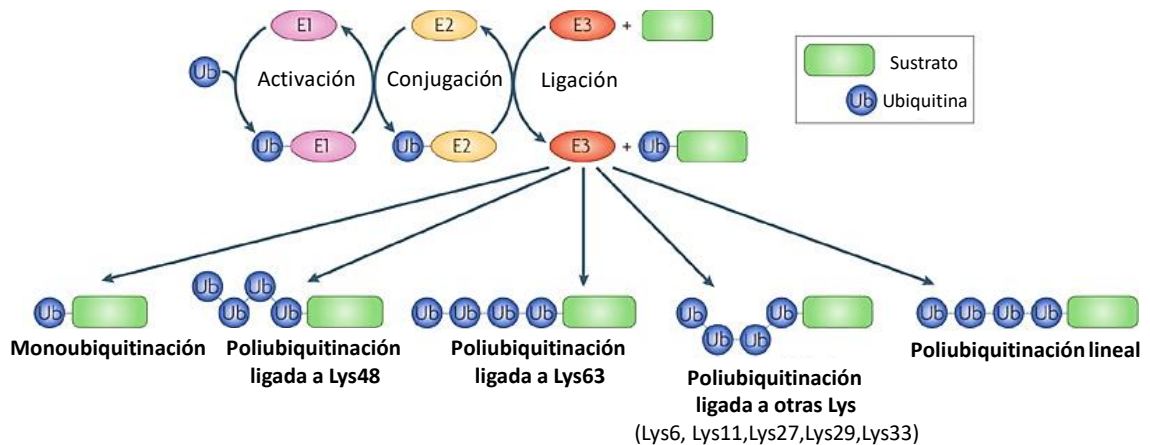
por estas quinasas regulan su actividad<sup>160</sup>. Sin embargo, hasta la actualidad, no se establecieron cuáles son los sitios de fosforilación y su relevancia en otros modelos no esteroideogénicos.

### 5.3.2 Regulación de ACSL4 por ubiquitinación

La ubiquitinación de proteínas es un mecanismo de modificación post-traducciona dinámico y multifacético involucrado en casi todos los aspectos de la biología eucariota <sup>161</sup>. Este mecanismo juega un rol de importancia en diferentes procesos celulares incluyendo no solo la degradación de proteínas sino también señalización, endocitosis y posee relación con la funcionalidad del sistema inmune <sup>162</sup>.

La ubiquitinación requiere de la actividad de tres enzimas: una enzima activadora de ubiquitina (E1), una enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y una enzima ligadora de ubiquitina (E3), que reconoce el sustrato. La finalización de un ciclo de ubiquitinación da como resultado un sustrato monoubiquitinado. Sin embargo, el ciclo se puede repetir para formar sustratos poliubiquitinados. Para esto, se pueden ligar moléculas de ubiquitina adicionales a un residuo de lisina (K o Lys) tales como Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 o Lys63, en una ubiquitina previamente unida para formar cadenas de poliubiquitina (Figura 9) <sup>163</sup>. Se ha demostrado que las cadenas de poliubiquitina que se forman mediante la unión a través de la Lys48 de la molécula de ubiquitina son las cadenas que se relacionan con el mecanismo asociado a la degradación proteasomal, mientras que, por otro lado, por ejemplo, se ha observado que aquellas cadenas de poliubiquitinación en donde las moléculas de ubiquitina se unen a través de la Lys6 de esta proteína han sido relacionadas con la homeostasis mitocondrial <sup>161</sup>.

En células hepáticas, se ha descrito que ACSL4 es blanco de ubiquitinación y consecuente degradación proteasomal. Por lo tanto, en este modelo celular, la ubiquitinación de ACSL4 sería un mecanismo de regulación post-traducciona que afectaría los niveles de expresión de la enzima <sup>164</sup>. El estudio mencionado, demostró además que el AA es el responsable de promover la degradación de ACSL4 a través del sistema de ubiquitina (Ub)-proteasoma. Este mecanismo regulador es muy específico tanto para ACSL4 como para el AA ya que la estabilidad de la proteína ACSL4 no se ve afectada por otros ácidos grasos insaturados, y el AA no ejerce ningún efecto significativo sobre los niveles proteicos de otras isoenzimas pertenecientes a la familia ACSL <sup>164</sup>.



**Figura 9. Esquema de la cascada enzimática que conduce a la ubiquitinación de un sustrato.** Para la ubiquitinación se requiere la actividad de una enzima activadora de ubiquitina (E1), una enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y una enzima ligadora de ubiquitina (E3), que reconoce el sustrato. La finalización de un ciclo de ubiquitinación da como resultado un sustrato monoubiquitinado. Sin embargo, el ciclo se puede repetir para formar sustratos poliubiquitinados. Alternativamente, las moléculas de ubiquitina se pueden unir de la cabeza a la cola para formar cadenas lineales. En la figura sólo se muestran las cadenas de ubiquitina homotípicas; sin embargo, algunas combinaciones de enzimas E2-E3 pueden producir cadenas de ubiquitina de enlace mixto. (Figura extraída y traducida al español del trabajo de Dikic Ivan y col. 2009).

La ubiquitinación se inicia por lo tanto con la adición de una molécula de ubiquitina a un residuo lisina de la proteína blanco. En este proceso son las E3- ligasas las enzimas que promueven la transferencia de una ubiquitina de un intermediario tioéster a enlaces amida en proteínas blanco o cadenas de poliubiquitina <sup>165</sup>. Las E3- ligasas son un grupo grande y diverso de proteínas caracterizadas por un motivo particular. Estos motivos incluyen al dominio HECT, al dominio RING o a la caja U (un motivo RING modificado). Mientras que las E3 ligasas del tipo HECT tienen un papel directo durante la ubiquitinación, las E3 ligasas del tipo RING y U-box facilitan la ubiquitinación de proteínas, acercando a la proteína blanco, a la enzima E2 y a la ubiquitina, lo suficiente como para promover la ubiquitinación de dicho sustrato <sup>166,167</sup>.

Además, existen otro tipo de E3- ligasas, las ligasas RING-between-RING (RBR). Estas ligasas se caracterizan por poseer un mecanismo híbrido del tipo RING-HECT, único que se une con las enzimas E2 conjugadas a ubiquitina para transferir la ubiquitina a proteínas blanco para su degradación proteasomal. La evidencia emergente ha demostrado que las E3- RBR- ligasas desempeñan un papel esencial en enfermedades neurodegenerativas, infecciones, inflamación y cáncer <sup>168</sup>. En relación a

lo mencionado, se ha observado que la E3- RBR ligasa de ubiquitina Parkina es una ligasa con un rol de importancia en distintos tipos de cáncer y que lleva a la degradación de proteínas por el proteasoma en condiciones que afectan el potencial de membrana mitocondrial <sup>169,170</sup>. A continuación, nos explayaremos sobre esta ligasa en particular.

- Parkina: E3-RBR- Ubiquitina Ligasa

Parkina es E3- RBR- ligasa de ubiquitina. Esta proteína ubiquitina una amplia variedad de proteínas de la membrana mitocondrial externa tras la despolarización mitocondrial. Esta ligasa sintetiza múltiples tipos de cadenas de ubiquitina, con mayor frecuencia enlaces en las lisinas K63, K48, K11 y K6. Parkina posee un dominio del tipo ubiquitina en el extremo amino-terminal (dominio Ubl) y cuatro dominios similares a RING: RING0, RING1, IBR y RING2 hacia el extremo carboxilo-terminal <sup>171</sup>. Esta ligasa normalmente se localiza en el citosol celular en su forma autoinhibida. Parkina es codificada por el gen PARK2 <sup>171,172</sup>. Esta ligasa ha sido ampliamente estudiada en la enfermedad de Parkinson donde se vio que las mutaciones de pérdida de función en el gen PARK2 representan la mayor causa de la enfermedad <sup>169</sup>. En *Drosophila melanogaster* se vio que la ausencia de Parkina genera un severo fenotipo con pérdida de neuronas dopaminérgicas, interrupción de la espermatogénesis y mitocondrias inflamadas y desordenadas; dicho fenotipo aparece antes de la degeneración de los músculos de vuelo indirecto de la mosca<sup>173</sup>.

En un principio se propuso que Parkina cumplía el rol de ubiquitinar proteínas mal plegadas para su degradación vía proteasomal. Sin embargo, en el año 2008, el grupo de Richard Youle <sup>169</sup> demostró que la Parkina citosólica es reclutada a las mitocondrias dañadas para la degradación de las mismas vía autofagia, lo que abrió un nuevo campo de investigación donde la mitofagia es mediada por Parkina <sup>162</sup>. Este mecanismo, conocido como vía canónica de la mitofagia PINK1/Parkina será detallado más adelante en este trabajo de tesis doctoral. Un estudio reciente, demostró que en la enfermedad de Parkinson la mitofagia mediada por Parkina está involucrada en la señalización por Ca<sup>2+</sup> y el contacto entre el retículo endoplásmico y la mitocondria <sup>27</sup>, lo que modula la comunicación entre ambos compartimentos celulares <sup>174</sup>.

La evidencia acumulada a lo largo de los años sugiere que Parkina actúa como un supresor tumoral. La expresión de esta enzima está frecuentemente regulada negativamente en distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. Sin



embargo, los mecanismos que subyacen al rol de Parkina en la supresión tumoral están poco estudiados hasta el momento <sup>170</sup>.

Los sustratos de Parkina más descriptos son las mitofusinas 1 y 2 (MFN1/2) y RHOT1/2 (Miro en *Drosophila*)<sup>175-177</sup>, cuyo recambio por el proteasoma altera los ciclos de fisión-fusión y el tráfico de mitocondrias dependiente de microtúbulos, respectivamente. Los estudios proteómicos de mitocondrias purificadas también han identificado proteínas adicionales con sitios consenso para la ubiquitinación por Parkina, ante la despolarización mitocondrial, siendo ACSL4 una de estas proteínas, que estaría interactuando con Parkina en línea celular de tumor hepático<sup>177</sup>. Estos estudios de proteómica sugieren por lo tanto una posible interacción entre ACSL4 y la E3-RBR-ubiquitina ligasa Parkina.

#### **5. 4 Otros mecanismos de regulación de ACSL4**

En nuestro laboratorio se estudió ampliamente la regulación hormonal de ACSL4 en tejidos esteroideogénicos y su correlación con la regulación hormonal de la esteroideogénesis. Se demostró que las hormonas tróficas ACTH y LH inducen rápidamente la expresión de ACSL4 en la corteza adrenal y en células de Leydig respectivamente a través de un mecanismo dependiente de AMPc. En estos modelos se observó que estos estímulos también generan un aumento en los niveles de ARNm de ACSL4 en forma más tardía respecto de la inducción proteica <sup>66</sup>.

En nuestro laboratorio también se han descrito mecanismos de inducción hormonal de ACSL4 independientes de AMPc. En células de Leydig MA-10 y adrenocorticales Y1 la expresión de ACSL4 se induce por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en un patrón bifásico <sup>79</sup>. Se ha evaluado también la inducción de esta proteína por ANG II en células adrenales de la zona glomerulosa. Se observó un aumento tanto de la expresión como de los niveles de ARNm de ACSL4. El aumento de los niveles de ARNm muestra un perfil bifásico dependiente del tiempo<sup>178</sup>. En estas células se ha visto también que el estímulo que ejerce el potasio es idéntico al observado con ANG II <sup>178</sup>. Otros autores han estudiado la regulación de ACSL4 por glucocorticoides y se demostró que éstos inhiben la expresión de esta proteína <sup>179</sup>.

Además, en nuestro laboratorio se ha caracterizado con anterioridad el rol de proteínas con actividad de tirosina fosfatasa (PTPs) sobre la esteroidogénesis <sup>61,180–183</sup>. Se ha observado que la inhibición de la actividad de PTPs produce una disminución en la expresión de ACSL4, teniendo también un efecto inhibitorio sobre la inducción de StAR y la esteroidogénesis <sup>178,184</sup>. Se identificó a SHP2 (Tyrosine Protein Phosphatase Non-Receptor Type 11) como una de las PTPs que están involucradas en la regulación de ACSL4, StAR y la esteroidogénesis en células de Leydig y en células adrenales <sup>178,183–185</sup>.

## 6. ACSL4 y Metabolismo Mitocondrial

### 6.1 Introducción a la estructura y función mitocondrial

El origen de las mitocondrias se remonta aproximadamente a unos 1500 millones de años, a partir de la endosimbiosis de una  $\alpha$ -protobacteria por un antecesor de una célula eucarionte moderna, hecho que fue ampliamente descrito en los trabajos de Lynn Margulis, como varios pasos de endosimbiosis y se conoce como “La teoría endosimbionte” <sup>186</sup>.

La mitocondria, es una organela que está presente en todas las células eucariotas y es uno de los principales sistemas de endomembrana más antiguos <sup>187</sup>. Es la única organela a través del cual se provee energía para el metabolismo celular mediante el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS).

La mitocondria está compuesta por dos membranas, la membrana mitocondrial interna (MMI) y la membrana mitocondrial externa (MME), que rodean una densa matriz, o matriz mitocondrial, en donde se encuentran las enzimas que median la OXPHOS (Figura 10). En dicha matriz también suceden otras reacciones celulares, y contiene múltiples copias de un genoma mitocondrial que codifica para unas pocas proteínas de la membrana interna y los ARN de transferencia que van a ser utilizados para su traducción. Los varios cientos de otras proteínas presentes en la mitocondria son codificados por el ADN nuclear, y son sintetizados e importados desde el citosol a la mitocondria <sup>188</sup>.

El mecanismo fundamental de transducción de energía en la mitocondria es la quimio-osmosis <sup>189</sup>, en el cual la energía libre de la oxidación de los ácidos carboxílicos es usada para bombear protones fuera de la matriz, estableciendo un gradiente electroquímico. La ATP sintasa acopla el transporte estos protones a favor de su

gradiente a través de la membrana interna y hacia la matriz, con la fosforilación de ADP para producir ATP.

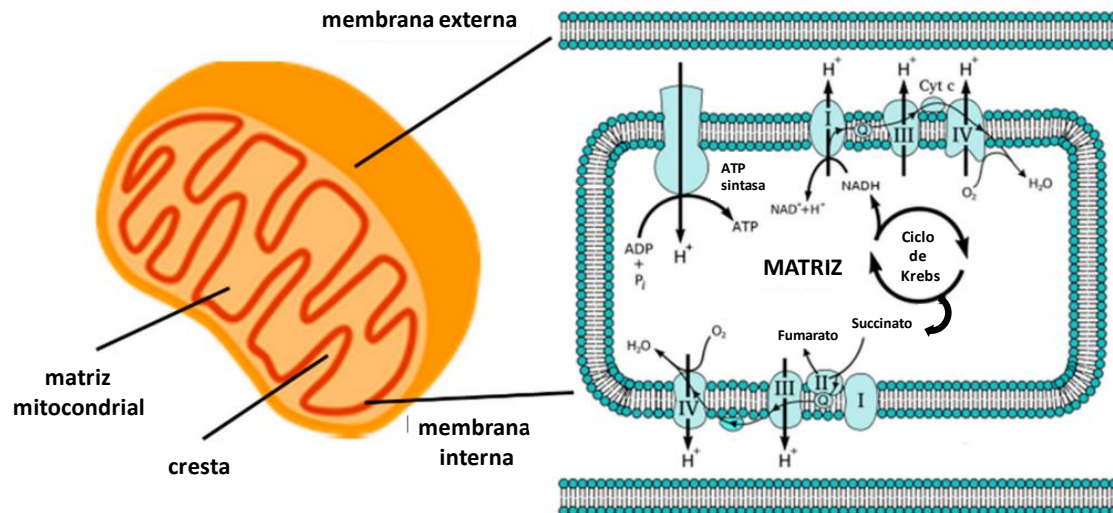
Hoy en día se comprende a la mitocondria como una red dinámica en constante fusión y fisión, formando un complejo retículo que interactúa con otros componentes celulares, en particular el citoesqueleto y el retículo endoplásmico (RE)<sup>190</sup>.

La mitocondria es una organela de estructura compleja, que se caracteriza por tener una doble membrana. La MME es permeable a pequeñas moléculas, por ejemplo, menores a 5 kDa y a iones que se transportan por canales transmembrana no selectivos llamados porinas. Específicamente, uno de los canales de aniones más importantes en la mitocondria es el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). El VDAC parece ser un punto de convergencia para una variedad de señales de supervivencia y muerte celular mediadas por su asociación con varios ligandos y proteínas. Se conoce que el VDAC tiene gran relevancia en la distribución de ATP, homeostasis del Ca<sup>2+</sup>, protección frente al estrés oxidativo, regulación de la apoptosis y está implicado en diversas enfermedades, con un rol en la acción de diferentes fármacos<sup>191,192</sup>. Existen 3 isoformas fundamentales de VDAC, 1, 2 y 3 y se observó en células HeLa que el VDAC1 es 10 veces más abundante que VDAC2 y 100 veces más prevalente que VDAC3<sup>193</sup>. Se determinó que el VDAC está expresado en alta cantidad en la MME, siendo aproximadamente el 10% de las proteínas totales de la MME<sup>194</sup> y aproximadamente el 0,4% de la población total de proteínas mitocondriales<sup>195</sup>.

Por otro lado, la MMI es impermeable a la mayoría de las moléculas pequeñas y iones, inclusive a los H<sup>+</sup>. La MMI consta de distintas regiones morfológicas que incluyen el límite de la membrana, las uniones de crestas y las crestas mismas. La morfología y la remodelación son procesos necesarios para la correcta función de la mitocondria y se llevan a cabo por las mitofilinas<sup>196</sup>, las cuales son proteínas de la MMI acumuladas entre las membranas interna y externa, en lo que se conoce como espacio intermembrana. Las crestas son invaginaciones de la MMI, lo cual aumenta significativamente el área de superficie de la membrana y permite a la mitocondria tener una tasa metabólica elevada (Figura 10).

En la MMI también se encuentran las proteínas de la cadena de transporte de electrones (CTE) o cadena respiratoria, como ser los complejos I-IV, Fo-F1 ATP sintasa, ADP-ATP translocasas y otros transportadores de membrana. El espacio delimitado por la MMI se conoce como matriz mitocondrial donde se encuentran el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH), las enzimas del ciclo de Krebs, las de la vía de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y las enzimas de la oxidación de aminoácidos, o sea que en

la matriz ocurren casi la totalidad de los procesos de oxidación, salvo la glucólisis que tiene lugar en el citosol. Además de su papel central en diversas vías bioquímicas, las mitocondrias son reguladores clave de la apoptosis, y participan en diferentes procesos como desarrollo, apoptosis, envejecimiento y cáncer.



**Figura 10. Estructura mitocondrial. Esquema de la estructura y función mitocondrial.** Izquierda: Esquema de una mitocondria donde se observan las membranas externa e interna, las crestas y la matriz. Derecha: el ciclo de Krebs, o del ácido cítrico, provee coenzimas reducidas a cadena de complejos respiratorios I a IV que crean un gradiente eléctrico y de protones ( $H^+$ ), la fuerza electromotriz a través de la membrana interna. La ATP sintasa utiliza la fuerza electromotriz para generar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico ( $P_i$ ) en lo que se conoce como fosforilación oxidativa. (Imagen tomada y traducida al español de Bartolák-Suki, Imsirovic, et al. 2017).

## 6.2 Cadena de transporte de electrones

La producción de ATP en condiciones aeróbicas ocurre en la mitocondria en un proceso denominado fosforilación oxidativa, en el cual las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavina adenina dinucleótido ( $FADH_2$ ), generadas durante la glucólisis, el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, son oxidadas por el  $O_2$ . Para optimizar la energía liberada de estas reacciones redox altamente exergónicas y capturar la mayor cantidad como energía útil (formando el enlace fosfato del ATP), la mitocondria reduce los equivalentes de reducción de NADH y  $FADH_2$  en varias etapas. En lugar de ser una transferencia directa de electrones al  $O_2$ , estos se transfieren a través de una serie de intermediarios redox que tienen progresivamente

mayor potencial de reducción. Estos intermediarios son complejos proteicos que tienen grupos prostéticos redox como la flavina mononucleótido (FMN), centros hierro-azufre (Fe-S), grupos hemo (porfirina con  $\text{Fe}^{2+}$ ) o centros de Cu. La excepción es la ubiquinona, que es un transportador de electrones de origen lipídico y tiene un efecto anti-oxidante fundamental en la MMI<sup>197</sup>.

La mayoría de los transportadores de electrones están ordenados espacialmente en complejos proteicos incluidos en la MMI y ordenados de manera de optimizarla velocidad en el transporte de electrones y la eficiencia del sistema (Figura 10). Estos complejos utilizan la energía liberada durante la transferencia de electrones, a favor del potencial de reducción para generar la translocación de  $\text{H}^+$  activamente desde la matriz hacia el espacio intermembrana, en contra de gradiente (proceso endergónico) lo que lleva a una acumulación de carga y gradiente de protones a través de la MMI, llamada fuerza protón-motriz.

Los complejos proteicos mitocondriales de la CTE son 4: I, II, III y IV. Los tres complejos que bombean protones son la NADH-ubiquinona oxidoreductasa o complejo I, ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa o complejo III y citocromo c oxidasa o complejo IV. En particular, en este trabajo de Tesis hemos analizado al Complejo III. La succinato deshidrogenasa o complejo II no bombea protones, pero contribuye a reducir la ubiquinona mediante la transferencia de los electrones del  $\text{FADH}_2$ . Los complejos I, III y IV se presentan en cierta medida como supercomplejos en la MMI, llamados respirasomas.

COMPLEJO III: Este complejo acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo  $c+3$ , con transporte vectorial de  $\text{H}^+$  de la matriz hacia el espacio intermembrana. El complejo III presenta una estructura homodimérica donde cada monómero posee un centro  $2\text{Fe}-2\text{S}$  de la proteína de Rieske, un citocromo b y el grupo hemo del citocromo c. Además, presenta dos sitios de unión a la ubiquinona. El ubiquinol proveniente de la reducción por el complejo I y II, se oxida por los centros  $2\text{Fe}-2\text{S}$  formando el radical semiubiquinona, con la translocación de dos  $\text{H}^+$ , como ya fue mencionado. A continuación, la semiubiquinona reduce el citocromo b y para completar el ciclo se oxida una segunda molécula de ubiquinol, se bombean  $2\text{H}^+$  al espacio intermembrana y se transfieren los electrones por la misma vía. Finalmente, los 2 electrones que recibió el centro  $2\text{Fe}-2\text{S}$  se transfieren al citocromo c. El citocromo c es una proteína soluble que se asocia reversiblemente con el lado P de la MMI (el que mira hacia el espacio intermembrana) y luego de aceptar un electrón, se desplaza en el espacio intermembrana hacia el complejo IV.

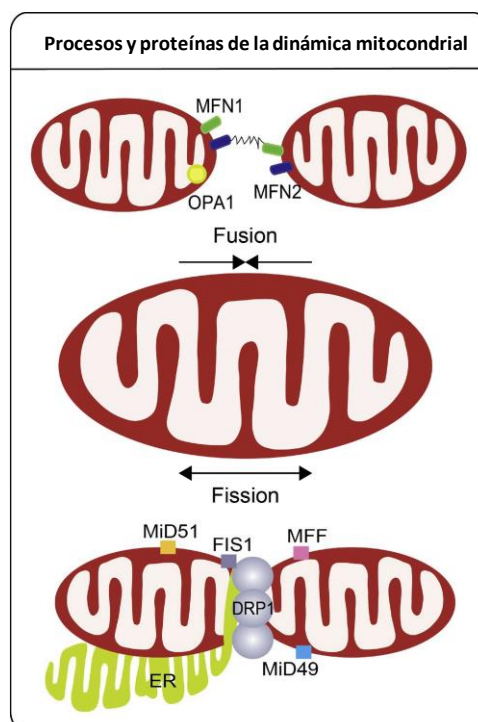
El componente terminal de la CTE es la Fo-F1 ATP sintasa, que utiliza la fuerza protón-motriz para catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, acompañado del flujo de H<sup>+</sup> desde el espacio intermembrana hasta la matriz. Todo el proceso se conoce como fosforilación oxidativa o, de sus siglas en inglés, OXPHOS <sup>188,198</sup> (Figura 10). Sin embargo, los protones pueden migrar a la matriz independientemente de la ATP sintasa, un proceso conocido como "fuga de protones" o en inglés proton leak. Se puede definir como la disipación del gradiente protón-motriz en presencia de oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa. Esta fuga de protones representa los protones que migran a la matriz sin producir ATP; por eso resulta en un acoplamiento incompleto del consumo de oxígeno en la CTE y la generación de ATP. El proton leak es el mecanismo principal, aunque no el único, en la generación del acoplamiento incompleto mencionado. Sin embargo, hasta el momento, el mecanismo exacto de cómo se produce la fuga de protones no se conoce por completo. La regulación fisiológica de la fuga de protones se clasifica en dos: fuga de protones basal o constitutiva y regulada o inducible. La fuga de protones basal de protones representa solo el 5% del total, no está regulada y depende fuertemente de la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana. La fuga de protones inducible es catalizada por proteínas específicas de la membrana interna mitocondrial como proteínas desacoplates (UCP; uncoupling proteins). Las UCP son una subfamilia de proteínas mitocondriales solubles que median el transporte de varios metabolitos a través de la MMI. Hay cinco tipos de UCP en mamíferos, denominados UCP1-5. De los cinco UCP, UCP1 fue la primera en ser identificada en el tejido adiposo pardo y la más extensamente estudiada <sup>199</sup>.

Entre los parámetros respiratorios mitocondriales, la capacidad respiratoria de reserva (CRR) o SRC del inglés, spare respiratory capacity, representa un parámetro funcional particularmente sólido para evaluar la reserva mitocondrial. Esta capacidad de reserva se define como la diferencia entre el ATP producido por la fosforilación oxidativa durante el OXPHOS basal en comparación con el de la actividad máxima. La CRR puede verse comprometida en algunas enfermedades <sup>200</sup> y es un indicador clave que está relacionado con la disfunción mitocondrial.

### **6.3 Dinámica mitocondrial: fusión y fisión**

Las mitocondrias se separan y fusionan usando procesos de fisión y fusión en respuesta a los cambios en el estado de energía y estrés. La investigación sobre la fusión y fisión mitocondrial o también llamada dinámica mitocondrial, ganó mucha atención en los últimos años ya que es importante para la comprensión de muchos

procesos biológicos, incluidos el mantenimiento de funciones mitocondriales, apoptosis y envejecimiento celular <sup>198</sup>. La fusión ocurre cuando dos mitocondrias adyacentes se unen, mientras que la fisión separa una mitocondria en dos. La fusión está coordinada en la MME por las mitofusinas (MFN1 y MFN2), y en la MMI por la proteína OPA1 (Optic Atrophy 1). La fisión comienza cuando el retículo endoplásmico (RE) se recluta en el sitio de constricción. Luego, múltiples proteínas unidas a la MME (FIS1, MFF, MiD49 y MiD51) reclutan a una GTPasa clave en la fisión mitocondrial que es la DRP1 (Dynamin Related Protein 1) a la superficie de las mitocondrias, ayudando en la constricción mediada por el RE. (Figura 11).



**Figura 11. Modelo simplificado de fusión y fisión mitocondrial en células humanas.** La fusión mitocondrial une dos mitocondrias, mientras que la fisión separa una en dos. La fusión está coordinada en la OMM por las mitofusinas (MFN1 y MFN2), y en la IMM por la atrofia óptica 1 (OPA1). La fisión comienza cuando el retículo endoplásmico (RE) se recluta en el sitio de constricción, marcado por ADNmt. Luego, múltiples proteínas unidas a OMM (FIS1, MFF, MiD49 y MiD51) reclutan DRP1 a la superficie de las mitocondrias, ayudando en la constricción mediada por el RE (Imagen tomada y traducida de Yasmine J. Liu et al. 2020).

La dinámica determina la forma y la interconectividad de la mitocondria en la regulación de varios aspectos de su funcionalidad, incluyendo la producción de ATP, mantenimiento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , homeostasis de los radicales libres, herencia del

ADN mitocondrial, regulación de la apoptosis y el control de calidad mitocondrial <sup>201</sup>. El balance entre los eventos de fusión y fisión mitocondrial es clave en el mantenimiento de la morfología y la función mitocondrial, así como también en la supervivencia celular <sup>202</sup>.

#### **6.4 Interacción entre glucólisis y respiración mitocondrial**

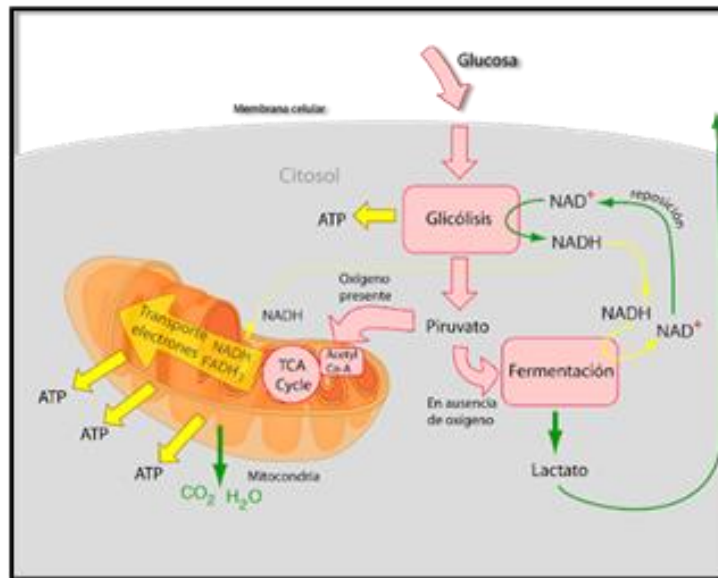
La glucólisis es una vía metabólica antigua, lo que significa que evolucionó hace mucho tiempo, y se encuentra en la gran mayoría de los organismos vivos en la actualidad. Esta vía metabólica consiste en una serie de reacciones que extraen energía de la molécula de glucosa al dividirla en dos moléculas de tres carbonos llamadas piruvato.

En los organismos que realizan respiración celular, la glucólisis es la primera etapa de este proceso. Sin embargo, la glucólisis no requiere oxígeno, y muchos organismos anaeróbicos también utilizan esta vía para metabolizar la glucosa (glucólisis anaeróbica) (Figura 12). La glucólisis anaeróbica o fermentación no es eficiente en la producción de energía para el abastecimiento celular completo ya que solo se generan 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa; que condiciones anaeróbicas el piruvato se convierte en lactato por enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el citoplasma. Por otro lado, la respiración mitocondrial (aeróbica) produce 36 moléculas de ATP por la oxidación completa de una molécula de glucosa <sup>203</sup>. En condiciones aeróbicas, el piruvato generado en la glucólisis se transforma en Acetil-CoA por la PDH, el cual ingresa al ciclo de Krebs, los átomos de carbono son oxidados completamente a CO<sub>2</sub> y los electrones fluyen por la CTE y OXPHOS, donde finalmente el ATP es sintetizado por la ATP sintasa (Figura 12). El complejo de la PDH es un complejo clave en el mantenimiento de la glucólisis y la respiración mitocondrial y juega un papel importante en la canalización del piruvato hacia la formación de ATP aeróbico por la respiración mitocondrial <sup>203</sup>. La tasa de consumo de oxígeno (TCO) es una medida de la utilización del oxígeno en las células y es un indicador de la función mitocondrial.

La mayoría de las células pueden cambiar de manera dinámica su dependencia relativa del metabolismo glucolítico frente al oxidativo en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, durante el desarrollo y/o en la enfermedad <sup>204</sup>. Las vías metabólicas como la glucólisis y la respiración mitocondrial son las principales fuentes de ATP celular <sup>203</sup>. Tales cambios en el metabolismo pueden ocurrir en diferentes escalas de tiempo a través de una variedad de mecanismos que permiten a las células hacer frente a la disponibilidad del nutriente predominante o a demandas energéticas <sup>204</sup>. Por ejemplo, muchas células cancerosas dependen de la glucólisis anaeróbica (denominado efecto



Warburg)<sup>205</sup> y un estudio reciente ha demostrado que cambiar farmacológicamente su metabolismo hacia la respiración puede retrasar el crecimiento del tumor <sup>206</sup>. Por el contrario, estudios en modelos animales han demostrado que la inhibición de la respiración mitocondrial y la redirección del metabolismo hacia uno más glucolítico y anaeróbico puede prevenir las consecuencias patológicas de la lesión por isquemia-reperfusión en el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular <sup>207,208</sup>.

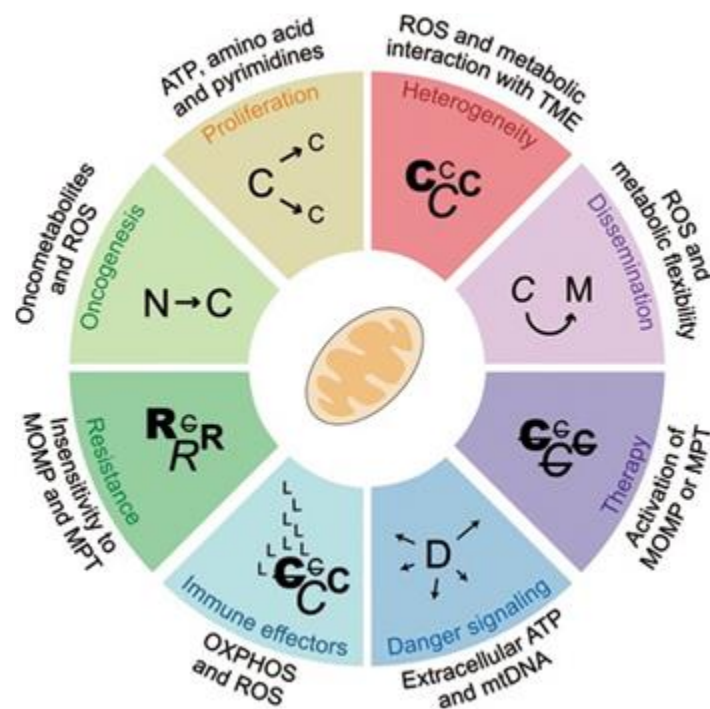


**Figura 12. Descripción esquemática de la glucólisis y la respiración mitocondrial.** La glucólisis y la respiración mitocondrial son dos vías principales que producen energía. La glucosa se convierte en piruvato en la vía glucolítica. El destino del piruvato depende de muchos factores, de los cuales la disponibilidad de oxígeno es importante. En condiciones anaeróbicas, la LDH convierte el piruvato en lactato en el citoplasma. En condiciones aeróbicas, el piruvato ingresa al ciclo del ácido cítrico a través del complejo PDH y se cataboliza por fosforilación oxidativa, y el ATP es producido por la ATP sintasa (complejo V).

## 6.5 Mitocondrias y Cáncer

Como mencionamos hasta el momento, las mitocondrias son organelas muy dinámicas que responden al estrés celular a través de cambios en la masa global, la interconexión entre ellas, y la localización subcelular <sup>209</sup>. El cambio en la masa mitocondrial general refleja un equilibrio entre la biogénesis mitocondrial y las tasas de mitofagia (degradación de las mitocondrias en el autofagosoma). Las mitocondrias también son dinámicas en términos de dónde se encuentran en la célula, con el aumento de la localización perinuclear en condiciones de hipoxia en comparación con la

normoxia, y el movimiento a lo largo de los microtúbulos hacia lisosomas, en condiciones que promueven mitofagia. Existen evidencias de una desregulación en la dinámica mitocondrial, en la masa mitocondrial y la organización espacial subcelular en cáncer<sup>209,210</sup>. Actualmente, está claro que las mitocondrias juegan un papel clave en la oncogénesis<sup>211</sup> (Figura 13). Se ha demostrado que las vías energéticas mitocondriales de las células pueden reprogramarse para modular la progresión y la agresividad en el cáncer de mama<sup>212</sup>.



**Figura 13. Metabolismo mitocondrial y oncogénesis.** Las mitocondrias tienen un gran impacto en prácticamente todos los procesos relacionados con la oncogénesis, que abarcan la transformación maligna, la progresión tumoral, la respuesta al tratamiento y la inmunovigilancia contra el cáncer. C, célula cancerosa; D, célula cancerosa moribunda; L, linfocito; M, célula cancerosa metastásica; ADNmt, ADN mitocondrial; MOMP, permeabilización de la membrana externa mitocondrial; MPT, transición de la permeabilidad mitocondrial; N, célula normal; OXPHOS, fosforilación oxidativa; R, célula cancerosa resistente; ROS, especies reactivas de oxígeno; TME, microambiente tumoral. (Esquema tomado del trabajo de Paolo E. Porporato y col. 2017)

Se conoce que las células cancerosas generalmente obtienen energía y mantienen el crecimiento anabólico mediante la glucólisis anaeróbica, conocido como

efecto Warburg. Según la teoría de Otto Warburg (1931) las células malignas tienen, típicamente, una tasa de consumo de glucosa una 200 veces mayor que las de las células normales que les dieron origen; y esto ocurre aún con un aporte pleno de oxígeno <sup>213</sup>. Otto Warburg postuló que este cambio en el metabolismo es la causa fundamental del cáncer. Es decir que, además de un metabolismo mitocondrial defectivo, en las células tumorales aumenta la expresión y actividad de enzimas glucolíticas claves. Mientras que el "efecto Warburg" es una característica indiscutible de muchas (pero no todas) las células cancerosas, el razonamiento de Warburg de que surgió de la respiración mitocondrial dañada causó inmediata controversia <sup>205</sup>. Ahora entendemos que mientras las mitocondrias dañadas impulsan el efecto Warburg en algunos casos, muchas células cancerosas que muestran el metabolismo de Warburg poseen respiración mitocondrial intacta, con algunos subtipos de cáncer que en realidad dependen de la respiración mitocondrial. Estudios sobre la respiración mitocondrial en el cáncer han establecido el marco para una nueva frontera enfocada en funciones adicionales de las mitocondrias en el cáncer, que han identificado roles pleiotrópicos de las mitocondrias en la tumorigénesis. Una función principal de las mitocondrias es la producción de ATP. Sin embargo, las mitocondrias desempeñan muchos roles más allá de la producción de energía, incluido la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas redox y metabolitos, regulación de señalización y muerte celular, y metabolismo biosintético. Estas funciones multifacéticas de las mitocondrias en fisiología normal las hacen importantes sensores celulares de estrés y permiten la adaptación celular al medio ambiente. Las mitocondrias también imparten una flexibilidad considerable para el crecimiento tumoral y supervivencia en ambientes hostiles, como durante el agotamiento de nutrientes, hipoxia y tratamientos contra el cáncer, y son por lo tanto jugadores clave en la tumorigénesis <sup>210</sup>.

Por otro lado, se sabe que la función mitocondrial es regulada por la vía de señalización de la vía de mTOR, esta vía es fundamental en el crecimiento celular, la homeostasis energética y su desregulación está involucrada en muchas enfermedades, incluido el cáncer. mTOR regula la biogénesis mitocondrial tanto transcripcionalmente a través de activación de PGC-1 $\alpha$ /Yin Yang 1 (YY1), que da como resultado inducción de la expresión génica mitocondrial y a través de la represión de inhibidores de las proteínas de unión 4E (4E-BP) que regulan la traducción de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo <sup>210</sup>.

## 6.6 Mitofagia: Mecanismo de autofagia mitocondrial

La mitofagia es una forma especializada de autofagia por la cual se degradan y reciclan selectivamente las mitocondrias dañadas o con funcionalidad reducida, transportándolas al compartimento hidrolítico de la célula, como los lisosomas <sup>214</sup>. Este proceso celular se puede desencadenar en condiciones de privación de nutrientes o en condiciones de baja concentración de oxígeno. Puede estar destinado a la eliminación de mitocondrias que son disfuncionales por desgaste, o como un control de calidad en el caso de que se haya producido una biogénesis defectuosa de esta organela. La finalidad sería evitar que las mitocondrias dañadas (por ejemplo, con una menor tasa de velocidad de CTE y OXPHOS), produzcan un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) con efectos dañinos potenciales para el resto de la célula <sup>215</sup>. Una mitocondria se recambia aproximadamente cada 15 días; entonces, la mitofagia puede ser un proceso normal en el desarrollo de algunas células, y es importante en una variedad de situaciones fisiológicas. Por ejemplo, es necesaria para que los reticulocitos se conviertan en eritrocitos, o para la maduración de los linfocitos T <sup>216</sup>.

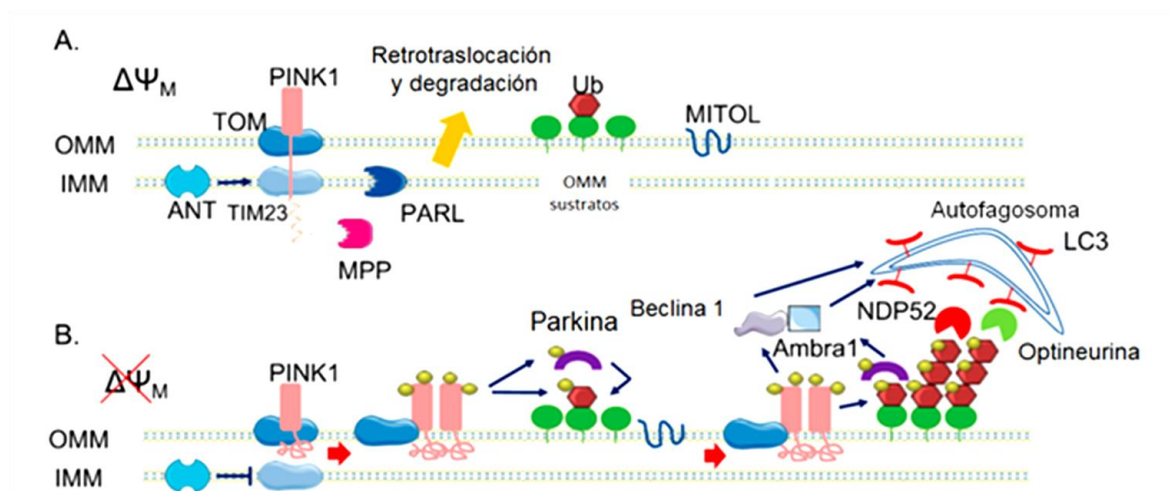
En relación con los mecanismos moleculares de la mitofagia, se han reportado receptores mitocondriales como BNIP3, NIX/BNIP3L, FUNDC y Atg32 en levadura, así también como varias proteínas reguladoras de la mitofagia, como AMBRA, MUL1, AMFR, SMURF y RHEB han sido identificadas <sup>215,217-219</sup>.

### 6.6.1 Vías canónicas de mitofagia

- Mitofagia mediada por PINK1/Parkina:

La vía PINK1/Parkina es la vía más estudiada en el proceso de mitofagia <sup>171,220,221,222</sup>. La quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) es la iniciadora de esta vía. En condiciones normales, PINK1 se importa a la MMI a través de los complejos Traslocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM) y Traslocasa de la membrana interna mitocondrial (TIM), donde PINK1 es escindida por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) y la proteasa transmembrana (PARL) <sup>220,221</sup> y posteriormente ubiquitinada y degradada por el proteasoma, manteniendo normalmente bajos los niveles de PINK1 <sup>215</sup>. La translocación de PINK1 hacia la MMI depende del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ); por lo tanto, si el potencial de membrana es disipado y se produce la despolarización mitocondrial, se impide la translocación PINK1. Ante un daño mitocondrial con pérdida del potencial de membrana y en respuesta a la despolarización mitocondrial, PDK2 fosforila PARL inactivándola y haciéndola incapaz

de escindir a PINK1. Este evento lleva a la inserción del dominio transmembrana de PINK1 en la MME. En consecuencia, se genera la acumulación de PINK1 en la MME y el consecuente reclutamiento de la Parkina citosólica en la superficie del lado citosólico de la MME. PINK1 fosforila la serina 65 del dominio de tipo ubiquitina de Parkina, lo que promueve la actividad de E3 ubiquitina ligasa de la enzima. Una vez activada, Parkina ubiquitina proteínas mitocondriales clave (como MFN1, MFN2, VDAC1 o Miro1)<sup>171,215</sup> que a su vez reclutan otras proteínas a las mitocondrias para iniciar la mitofagia (Figura 14)<sup>220</sup>.



**Figura 14. Esquema representativo de la mitofagia mediada por PINK1/ Parkina.** (A) En las mitocondrias sanas, PINK1 se importa de forma constitutiva a través de TOM/TIM23 (IMM), escindido por dos proteasas MPP y PARL respectivamente y luego es retro-translocado al citosol, donde se degrada. (B) Cuando se disipa el potencial de membrana mitocondrial ( $\psi_m$ ), el transportador de nucleótidos de adenina ANT inhibe la importación de PINK1 mediada por TIM23, que no se procesa y se acumula en la membrana externa (OMM). Aquí, se forma un super complejo, compuesto por subunidades del complejo TOM y homodímeros PINK1, que facilitan la autofosforilación y activación de PINK1. Una vez activado, PINK1 fosforila los sustratos ubiquitinados en el OMM y por lo tanto recluta y fosforila la Parkina. Parkina fosforilada comienza a ubiquitinar varias proteínas en el OMM, que son nuevos sustratos de la fosforilación de PINK1; se produce un ciclo de retroalimentación positiva iniciado, lo que lleva al cubrimiento de las mitocondrias dañadas con la cadena de fosfoubiquitina, flechas rojas. Las cadenas de fosfoubiquitina están unidas por dos adaptadores de mitofagia, la proteína 52 del dominio nuclear 10 (NDP52) y Optineurina, flechas azules. Los dos adaptadores reclutan autofagosomas a través de la unión de la proteína 1A / 1B-cadena ligera 3 (LC3) asociada a microtúbulos, lo que permite la absorción de mitocondrias disfuncionales. En paralelo, PINK1 interactúa con Beclin-1 y Parkina

con Ambra1, estimulando aún más la formación de autofagosomas, flechas azules. (Imagen adaptada de Barazzuol et al. 2020)<sup>174</sup>.

## 6.7 Mitofagia y Cáncer

Estudios recientes han sugerido que la pérdida funcional de los reguladores de la mitofagia está estrechamente relacionada con el desarrollo y la progresión del cáncer. La estrecha relación entre la mitofagia y el cáncer es evidente a través de la regulación de la expresión de Parkina, BNIP3, NIX y otros por supresores de tumores representativos como p53 y Rb y oncogenes como NF-κB, FOXO3 y HIF-1α<sup>223</sup>.

Las células cancerosas necesitan dirigir su metabolismo de manera flexible para satisfacer las tres necesidades básicas de las células en división: generación rápida de ATP para mantener el estado energético, suministro de precursores metabólicos para cumplir con las altas tasas de biosíntesis de macromoléculas y mantenimiento de un estado redox celular apropiado<sup>215</sup>. La creciente evidencia indica que la autofagia apoya la plasticidad metabólica de las células cancerosas, proporcionando prácticamente todos los componentes esenciales del metabolismo del carbono a través de la degradación de carbohidratos, proteínas, lípidos y nucleótidos<sup>224</sup>.

Se sabe que la mitofagia no solo se limita al recambio de mitocondrias disfuncionales, sino que también promueve la reducción de la masa mitocondrial general en respuesta a ciertas situaciones de estrés, como la hipoxia y la falta de nutrientes. Esto evita la generación de especies reactivas de oxígeno y conserva nutrientes para que no se consuman de manera ineficiente, promoviendo así la supervivencia celular en condiciones de estrés energético. Diferentes estudios han demostrado alteraciones en vías de la mitofagia relacionadas a procesos tumorales. Por ejemplo, se ha visto que la pérdida de Parkina promueve el efecto Warburg, la tumorigénesis en mama, colon e hígado y la linfomagénesis inducida por radiación<sup>225,226</sup>, mientras que la inhibición de BNIP3 o NIX promueve la progresión tumoral<sup>227</sup>. Estos resultados sugieren que la mitofagia juega un papel fundamental en la supresión del desarrollo del cáncer. El aumento de ROS podría ser responsable de facilitar el desarrollo del cáncer tras la reducción de la mitofagia. De hecho, el aumento de ROS debido a la disminución de la mitofagia se ha demostrado en el modelo de *C. elegans*<sup>228</sup>. El aumento de ROS induce daño al ADN y contribuye al desarrollo del cáncer al promover alteración en la expresión de numerosos genes.

### 6.7.1 Mitofagia en el cáncer de mama

En el cáncer, se ha demostrado que la mitofagia es un mecanismo pro y anti-tumorigénico según el estadio del tumor. Se han identificado mutaciones genéticas con pérdida de función en el gen PARK2, en varios tipos de tumores humanos, incluido el cáncer de mama triple negativo <sup>229</sup>. En relación con esto, se ha observado en un número creciente de estudios una correlación entre el deterioro de la actividad de Parkina y el aumento del desarrollo del cáncer, lo que lleva al concepto emergente de que la actividad de Parkina, o mitofagia en general, es un mecanismo de supresión de tumores <sup>222</sup>.

En distintos tipos de cáncer humano, incluido el cáncer de mama, se ha observado la pérdida de heterocigosidad y la pérdida del número de copias de PARK2 <sup>230,231</sup>. En comparación con los tejidos mamarios normales y las células MCF-10A de mama normales, la expresión de Parkina disminuyó en varias células de cáncer de mama <sup>170</sup>. Sin embargo, en el cáncer de mama solo se han observado mutaciones del gen PARK2 que codifica en muy bajo porcentaje para Parkina (<1%), lo que sugiere que la mutación de este gen no es un mecanismo de importancia que contribuye a la disminución de la expresión de Parkina en el cáncer de mama <sup>170,230,231</sup>.

Por otro lado, la disminución en los niveles del ARNm de Parkina en el cáncer de mama se asoció significativamente con mal pronóstico de los pacientes. Esto sugiere un papel importante de Parkina en este tipo de cáncer. Además, se ha demostrado que Parkina interactúa con HIF-1 $\alpha$  y promueve la degradación de este a través del mecanismo de ubiquitinación, que a su vez inhibe la metástasis de las células de cáncer de mama <sup>170</sup>. Por lo tanto, en estas células, la disminución de los niveles de Parkina promueve la metástasis, que puede inhibirse al silenciar la expresión de HIF-1 $\alpha$  <sup>170,232</sup>.

Se ha demostrado que Parkina regula negativamente la proliferación de células de cáncer de mama a través de una mayor expresión de la quinasa dependiente de ciclina 6 <sup>233</sup>.

Sin embargo, los mecanismos subyacentes desencadenados por Parkina en la supresión tumoral son poco conocidos y los potenciales sustratos de Parkina implicados en la tumorigénesis siguen siendo en gran parte desconocidos.

Se ha demostrado que existe una expresión diferencial de los niveles proteicos de Parkina en células de cáncer de mama de distinta agresividad tumoral. En líneas celulares de menor agresividad y positivas para la expresión del ER, como las MCF-7 y T47 D se ha observado una mayor expresión de Parkina en comparación con líneas

celulares TNBC , como lo son las MDA-MB.231, donde la expresión de esta proteína es muy baja<sup>170</sup>.

## 6.8 ACSL4 y metabolismo mitocondrial en células de cáncer de mama

Recientemente se ha propuesto que la alteración en la bioenergética celular es un sello distintivo del cáncer. En este contexto, la regulación positiva del metabolismo lipídico es uno de los cambios metabólicos más llamativos observados en muchas células tumorales<sup>234</sup>. Las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos en las células cancerosas han recibido usualmente menos atención, pero son cada vez más reconocidas y estudiadas. En el centro de todos estos eventos dependientes de lípidos regulados positivamente se encuentran las enzimas ACSLs que activan los ácidos grasos de forma intracelular<sup>25,234</sup>. Se ha demostrado que la sobreexpresión de ACSL4 promueve la supervivencia de las células tumorales al prevenir la apoptosis, probablemente a través de la depleción intracelular del AA no esterificado, el cual produce una señal proapoptótica<sup>235</sup>.

En relación con el cáncer de mama, se ha demostrado que, tanto en líneas celulares como en muestras de tejidos tumorales, la expresión de ACSL4 se correlaciona directamente con una mayor agresividad e inversamente con los niveles de ER $\alpha$ <sup>88,152</sup>. Se sabe que en las células tumorales existe una alteración del balance entre las vías antagónicas de biogénesis mitocondrial y mitofagia y es por esto por lo cual, en este trabajo de tesis doctoral, se procedió al análisis de diferentes marcadores de estos procesos mencionados.

Previamente en nuestro laboratorio, a través del RNA-seq realizado sobre el transcriptoma de las células MCF-7 tet-off/ACSL4 y su respectivo control<sup>152</sup> y mediante el estudio bioinformático por IPA pudimos observar que ACSL4 podría estar regulando la expresión de genes relacionados a diferentes vías canónicas mitocondriales tales como la biogénesis mitocondrial, la cadena de transporte de electrones, fosforilación oxidativa, entre otros. Además, entre los resultados obtenidos y analizados, se logró demostrar que ACSL4 ejerce una regulación en la vía de señalización de mTOR modulando los niveles de fosforilación de diferentes componentes de la vía, en la línea de cáncer de mama MCF-7. A pesar de que sí hemos comprobado que la expresión de ACSL4 activa la vía mTOR en las células tumorales de mama, no se conoce hasta el momento si dicha enzima puede regular algunos parámetros mitocondriales funcionales como la respiración, biogénesis, mitofagia, entre otros, en células de cáncer de mama<sup>97,152</sup>.



# *Hipótesis y Objetivos*

Las enzimas ACSL catalizan la producción de acil- CoA de ácidos grasos de cadena larga. Dentro de esta familia de enzimas, ACSL4 tiene una fuerte preferencia por el AA como sustrato. El AA puede actuar directamente o puede ser convertido en una variedad de compuestos que median la respuesta celular en una amplia variedad de tejidos. La preferencia de sustrato de esta isoforma supone que ACSL4 es una enzima importante para el control de los niveles de AA libre <sup>5,11</sup>.

Recientemente, varios grupos han reportado diversas funciones de ACSL4 en diferentes procesos fisiológicos y patológicos <sup>80,84,127,236</sup>. Durante varios años, nuestro grupo de trabajo ha contribuido con numerosos estudios al conocimiento sobre la regulación y función de la proteína ACSL4 <sup>66,152,237,238</sup>. Además, hemos demostrado la participación de ACSL4 en la biosíntesis de esteroides. Se demostró que la actividad de esta enzima es obligatoria para la generación y metabolización de AA intramitocondrial<sup>21,65</sup>. La acción del AA intramitocondrial, sobre la esteroidogénesis, es ejercida a través de su metabolización a productos lipooxygenados <sup>65</sup>.

En células tumorales de cáncer de mama, demostramos que un aumento en los niveles de expresión de ACSL4 correlacionan con una mayor agresividad tumoral. El aumento de la expresión de la enzima produce la disminución del receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) promoviendo, de este modo, la agresividad tumoral, y participando de los mecanismos que producen resistencia al tamoxifeno <sup>97,148</sup>. Mas aun, existen evidencias de una regulación diferencial de ACSL4 a nivel transcripcional en células de cáncer de mama de distinta agresividad <sup>237</sup>.

Por otro lado, un estudio de RNA-seq realizado previamente en nuestro laboratorio en células de cáncer de mama que sobreexpresan ACSL4, cuyos datos fueron analizados mediante el Ingenuity Pathway Analysis, demostraron que ACSL4 afecta la expresión de transcritos involucrados en el metabolismo y bioenergética mitocondrial <sup>152</sup>. Actualmente, se sabe que las mitocondrias juegan un papel clave en la oncogénesis. Se ha demostrado que las vías energéticas mitocondriales de las células pueden reprogramarse para modular la progresión y la agresividad en el cáncer de mama<sup>211,212</sup>.

Sin embargo, hasta el momento, los mecanismos que regulan la expresión de ACSL4 a distintos niveles, entre ellos la regulación post-traducciona, así como el rol de ACSL4 en el metabolismo mitocondrial en células tumorales mamarias aún siguen siendo desconocidos. Por lo tanto, *nuestra hipótesis plantea que la regulación post-traducciona de proteínas es un mecanismo molecular que está involucrado en la regulación de la expresión de ACSL4, de manera diferencial en células de cáncer de*

*mama, de distinta agresividad y malignidad. En este contexto, la regulación diferencial de ACSL4 conlleva un impacto en la actividad y función mitocondrial, lo cual correlaciona con la agresividad del tumor.*

En función de la hipótesis descripta y los antecedentes mencionados, se trabajó en la presente tesis con dos líneas celulares de cáncer de mama humano de diferente nivel de agresividad. La línea celular epitelial MDA-MB-231 de cáncer de mama humano con una alta tasa de proliferación y un fenotipo altamente agresivo, descriptas como células de cáncer de mama triple negativo. Por otro lado, también se utilizó la línea celular MCF-7, que se caracteriza por poseer un fenotipo de características epitelio luminal y poco agresivo, respondiendo al tratamiento con estrógenos.

### **OBJETIVO GENERAL**

*Profundizar en el conocimiento de distintos mecanismos celulares que regulan los niveles de expresión y la estabilidad de ACSL4 en células de cáncer de mama de distinta agresividad, así como también dilucidar el rol de esta enzima en el metabolismo y función mitocondrial, procesos que resultan ampliamente afectados en tumores.*

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para lograr cumplir con el objetivo propuesto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

### **- Objetivo Específico N°1**

Estudiar mecanismos de regulación post-traducciona, como la ubiquitinación y/o fosforilación, que estarían involucrados en la expresión de ACSL4

### **- Objetivo Específico N° 2**

Estudiar si distintos procesos celulares usualmente alterados en tumores, como la mitofagia y la producción de energía a nivel mitocondrial están regulados por la actividad y/o expresión de ACSL4 en células tumorales.

# *Materiales y Métodos*

## 1. Materiales y Reactivos utilizados

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): puromicina, seroalbúmina bovina (BSA), BSA libre de ácidos grasos, estándares de peso molecular para electroforesis, ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA), hidroximetil amino metano (Tris), ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N, N,N',N' tetra-acético (EGTA), leupeptina, pepstatina A, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, Temed™, y Poli-L-lisina. Las enzimas de restricción, la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), Go Taq ADN polimerasa, dNTPs, inhibidor de ribonucleasas RNAsin®, Pfu ADN polimerasa, fosfatasa alcalina de intestino de becerro (CIAP), ADN ligasa T4 y diversos reactivos de biología molecular fueron provistos por Promega (Madison, WI, USA). El detergente no prótico NP-40 (Tergitol tipo NP40) fue obtenido de Sigma Aldrich- Merck (Darmstadt, Alemania). Los cebadores utilizados y la desoxirribonucleasa I (ADNasa I) fueron adquiridos en Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) y en Macrogen Inc (Seul, Corea). La agarosa (libre de DNAsa y RNAsa) se adquirió en TransGen Biotech Co. (Beijing, China). El material plástico para cultivo se compró a ORANGE (NY, USA). Penicilina-estreptomocina, solución tripsina-EDTA, Opti-MEM, TRIzol®, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), y Lipofectamina™ 2000 fueron provisto por Gibco-LifeTechnologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA). El suero fetal bovino (SFB) fue de PAA laboratories GmbH (Pasching, Austria). Los reactivos de tinción mitoncondrial, Mitotracker Deep Red FM y Mitotracker Green fueron obtenidos de Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Los anticuerpos utilizados fueron del siguiente origen: los anticuerpos policlonales obtenidos de conejo anti-ACSL4 fueron desarrollados previamente en nuestro laboratorio (Maloberti, Castilla et al. 2005); el anticuerpo monoclonal de ratón anti-  $\beta$ - tubulina fue comprado a Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA); los anticuerpos monoclonales anti- Parkina, anti- VDAC-1, anti- subunidad 2 del Complejo III y el anticuerpo monoclonal anti-GAPDH fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA); el anticuerpo monoclonal anti- DDK fue obtenido de OriGene Technologies (Rockville, MD, USA); los anticuerpos anti-IgG de ratón y de conejo desarrollados en cabra y conjugados con peroxidasa fueron adquiridos a BioRad Laboratories (Hércules, California, USA). Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), reactivos (acrilamida, bisacrilamida, Bradford y otros) y equipos de electroforesis (Mini-Protean II y equipos de transferencia) fueron provistos por BioRad Laboratories. El equipo de electroforesis para geles de agarosa Gel XL ultra V-2 es de Labnet International (Edison, NJ, USA). El reactivo de detección de Western blot por quimioluminiscencia (ECL) se adquirió en GE (Buckinghamshire, UK). Todos los

reactivos comerciales que se utilizaron son del más alto grado de pureza disponible y de calidad para biología molecular.

## 2. Medios de cultivo y soluciones de uso frecuente

Todos los cultivos de células de mamíferos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. El SFB fue inactivado previo a su utilización por calor a 56°C. Los pasajes celulares se realizaron con tripsina-EDTA 1X.

DMEM alta glucosa (1 litro): 13,4 g de Dulbecco's modified eagle medium alta glucosa; 2 g de NaHCO<sub>3</sub>.

DMEM alta glucosa completo: 10% SFB; 10% penicilina-estreptomicina; DMEM alta glucosa para un volumen final de 1 litro.

Los cultivos de bacterias se incubaron a 37°C.

LB (para 1 litro): 10 g triptona; 5 g extracto de levadura; 5 g NaCl.

LB agar (para 1 litro): 1 litro de LB; 15 g agar.

LB ampicilina (para 1 litro): 1 litro de LB; 50 mg ampicilina.

LB agar ampicilina (para 1 litro): 1 litro de LB Agar; 50 mg ampicilina.

LB kanamicina (para 1 litro): 1 litro de LB, 25 mg de kanamicina.

LB agar kanamicina (para 1 litro): 1 litro de LB Agar, 25 mg de kanamicina.

### Soluciones amortiguadoras generales:

TBS (para 1 litro): 20 ml Tris-HCl 1 M pH 7,4; 29,22 g NaCl.

TTBS (para 1 litro): 1 litro de TBS; Tween- 20 0,5%.

TAE (para 1 litro): 4,84 g Tris-HCl; 1,14 ml ácido acético glacial; 0,74 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O pH 8,3.

PBS (para 1 litro): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4).

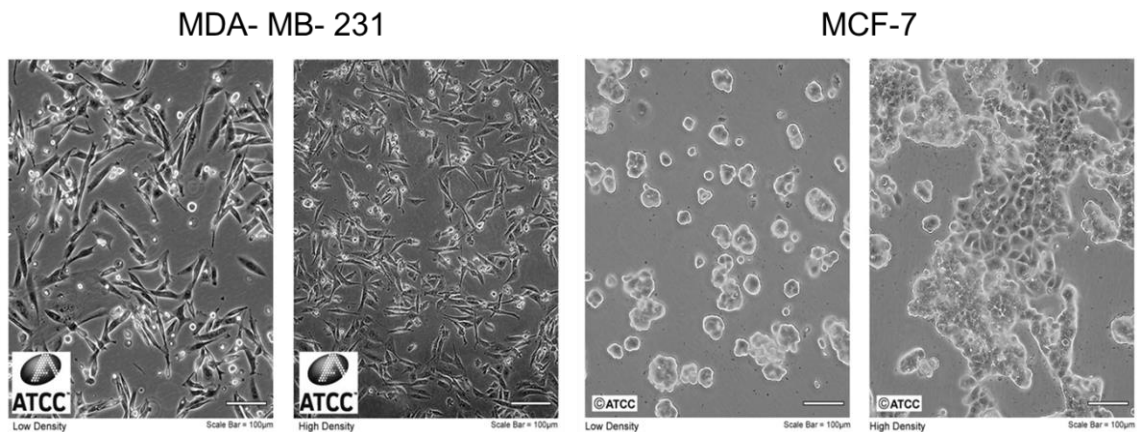
### 3. Líneas celulares

#### 3.1 Líneas humanas de cáncer de mama

La línea celular epitelial MDA-MB-231 de cáncer de mama humano fue obtenida de una paciente caucásica de 51 a partir de una efusión pleural de un sitio metastásico proveniente de un adenocarcinoma en la glándula mamaria. Estas células presentan características tipo fibroblasto, una alta tasa de proliferación y un fenotipo altamente agresivo <sup>239</sup>. Se clasifican dentro de las células de cáncer de mama triple negativo (TNBC) por ausencia en su fenotipo de los receptores de estrógenos (ERs), progesterona (PR) y Her 2.

La línea celular MCF-7 fue aislada originalmente de un sitio metastásico (derrame pleural) proveniente de un adenocarcinoma mamario de una mujer caucásica de 69 años. Esta línea posee varias características de las células mamarias epiteliales diferenciadas, en las que se encuentra la capacidad de responder a estradiol ( $E_2$ ) ya que expresa ER y, a su vez, posee expresión del PR. La línea celular MCF-7 se caracteriza por poseer un fenotipo de características epitelio luminal y poco agresivo <sup>240</sup>.

Todas estas líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM alta glucosa completo.



**Figura 15. Líneas celulares de cáncer de mama humano.** Imágenes microscópicas obtenidas del ATCC de las líneas de cáncer de mama humano utilizadas en este trabajo de tesis. Las imágenes muestran a cada línea celular sembrada en baja densidad (izquierda) y en alta densidad (derecha) respectivamente.



### 3.2 Líneas celulares de cáncer de mama modificadas

En este trabajo de tesis se hizo uso de líneas celulares de cáncer de mama modificadas de manera estable previamente en nuestro laboratorio, la cuales fueron previamente utilizadas en otras publicaciones.

#### - **MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off ACSL4**

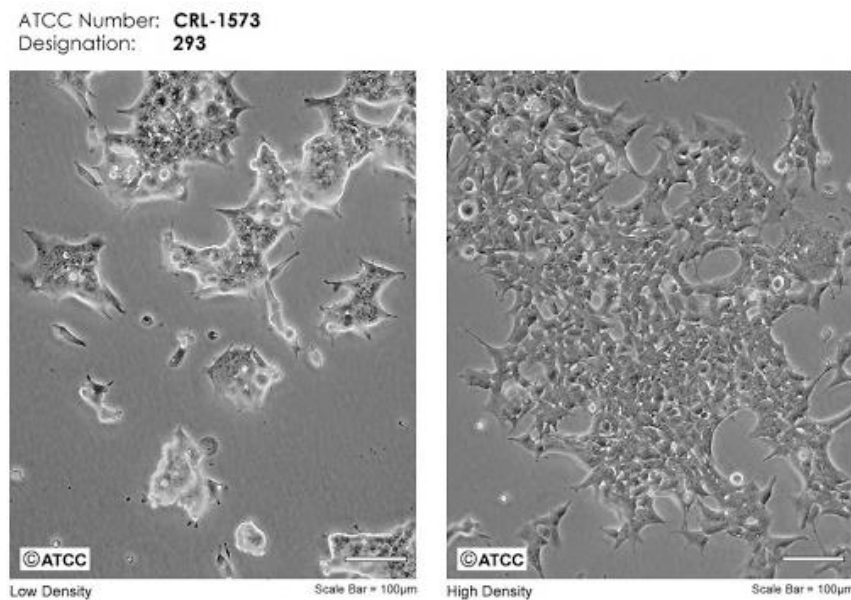
En nuestro laboratorio, la línea celular MCF-7 reprimible por tetraciclina, denominada MCF-7 tet-off, se usó para la transfección estable del ADNc de ACSL4 bajo el control del elemento de respuesta a la tetraciclina usando el sistema de expresión génica tet-off (Laboratorios Clontech, Inc, Mountain View, CA, EE. UU.). Después de la transfección, las células se mantuvieron en DMEM completo suplementado con 0,3 µg/ml de Puomicina. Después de varias semanas, se seleccionaron, cultivaron y sometieron a ensayos funcionales diferentes colonias en las que la expresión de ACSL4 fue regulada mediante la adición de tetraciclina (2 µg/ml). Veinte clones de represión inducida por MCF-7 tet-off de ACSL4 denominado en nuestro laboratorio como MCF-7 tet-off/ACSL4, se mantuvieron adicionalmente en DMEM completo y sometidos a diferentes ensayos funcionales <sup>22,127</sup>

#### - **MDA-MB-231 shRNA**

En nuestro laboratorio, previo al desarrollo de esta tesis se generó la línea MDA-MB-231 silenciada para la expresión de ACSL4. Para la construcción de esta línea, las células se sembraron el día anterior y se cultivaron hasta un 80% de confluencia. Se realizó luego la transfección en medio Opti-MEM con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) usando el plásmido pSUPER.retro (OligoEngine, Seattle, WA, EE. UU.) el cual contiene un short hairpin ARN (shARN) que interfiere con la expresión de ACSL4 (AAGATTATTCTGTGGATGA) para las células MDA-MB-231. El respectivo vector vacío se usó como control. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se seleccionaron en medios que contenían 500 µg/ml de G418 y 1 µg/ml de Puomicina durante 1 mes y luego se recogieron para ensayos bioquímicos y celulares. La línea MDA-MB-231 transfectada con el shRNA de ACSL4 se denominó como MDA-MB-231 shACSL4 mientras que aquellas células transfectadas con el vector vacío como control fueron denominadas MDA-MB-231 shControl <sup>97</sup>.

### 3.3 Línea humana de riñón embrionario

La línea celular HEK293 fue obtenida de riñón humano en estadio embrionario. Estas células son de propiedad adherente y con una característica morfología epitelial. La línea celular HEK293 se ha utilizado ampliamente como una herramienta de expresión para proteínas recombinantes desde que se generó hace más de 25 años. Los principales atributos que han hecho a la línea celular HEK293 una opción de gran popularidad entre científicos son su rápida tasa de reproducción y fácil mantenimiento así también como la gran susceptibilidad a la transfección a través de una amplia variedad de métodos distintos. Estas células son ampliamente utilizadas en biología molecular y celular por las propiedades anteriormente mencionadas <sup>241</sup>.

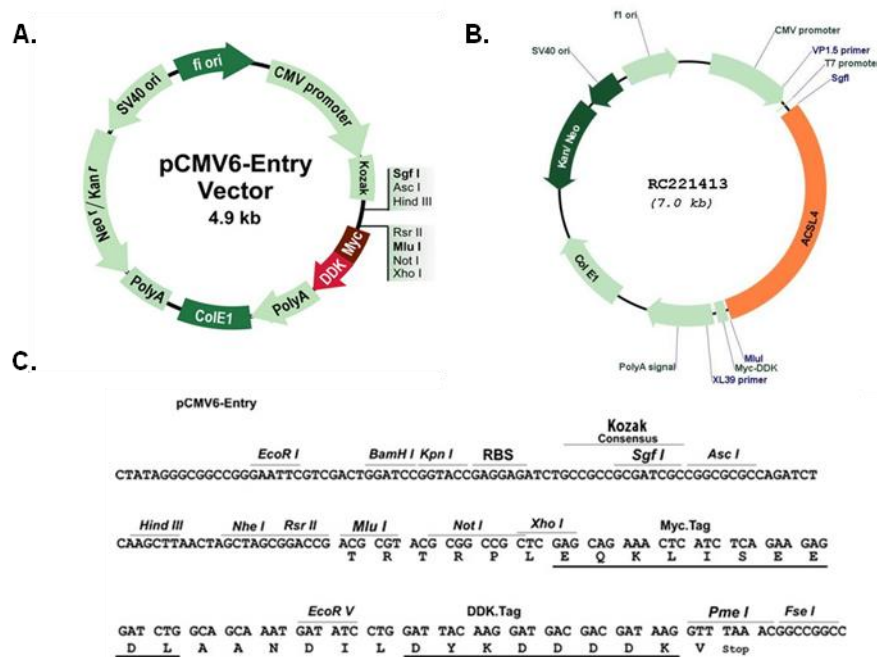


**Figura 16. Línea celular HEK293.** Imágenes microscópicas obtenidas del ATCC de la línea celular embrionaria de riñón humano utilizada en este trabajo de tesis. La imagen muestra a la línea celular sembrada en baja densidad (izquierda) y en alta densidad (derecha) respectivamente.

#### 4. Plásmidos utilizados

##### - Vector pCMV6-Entry- ACSL4-FLAG (FACL4)

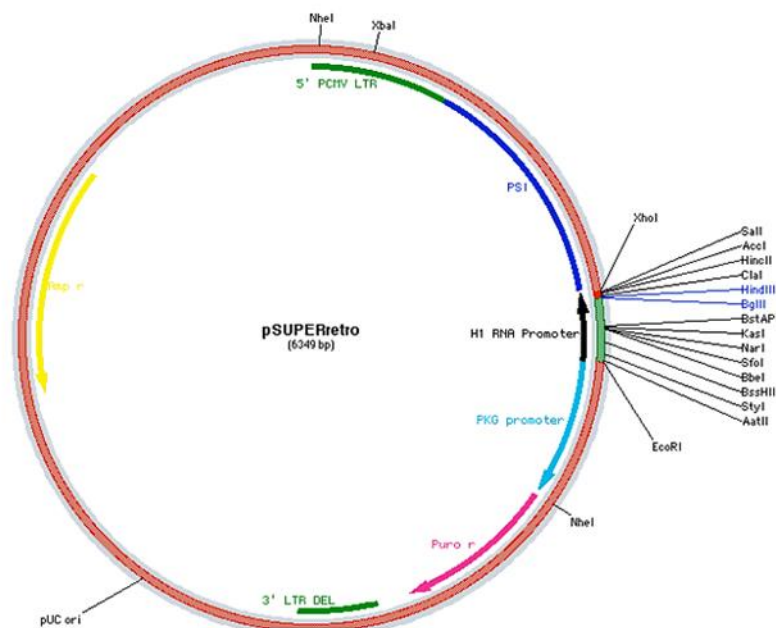
El vector plasmídico pCMV6-Entry fue obtenido de ORIGENE<sup>®</sup> (Rockville, MD, USA) (Figura 17A). Dicho vector contiene una etiqueta DDK-Myc (FLAG-Myc) y fue obtenido con la proteína ACSL4 previamente clonada en su interior (FACL4 (ACSL4) Human Tagged ORF Clone, ORIGENE<sup>®</sup>) lo que le confiera la capacidad de expresar la versión larga de la proteína ACSL4 unida a una etiqueta FLAG que permitirá el seguimiento de dicha proteína. En esta construcción, el gen de ACSL4 se encuentra regulado por el promotor fuerte de citomegalovirus humano (promotor CMV) (Figura 17B). En este trabajo de tesis, este plásmido fue utilizado para la sobreexpresión transitoria y/o estable de ACSL4 en las líneas celulares previamente mencionadas. El gen de ACSL4 se encuentra clonado en el vector entre los sitios de restricción SgfI y MluI, por lo que para el clonado y subclonado se utilizaron las enzimas BamHI, EcoRI, XhoI según el procedimiento a realizar, sitios de restricción que se encuentran por fuera del sitio de clonado del gen en cuestión (Figura 17C).



**Figura 17.** Mapa del plásmido comercial pCMV6-Entry (A), del plásmido con la ACSL4 (B) y del sitio de múltiple clonado (C).

- **Vector de expresión de ARN pequeño de interferencia de horquilla pSUPER.retro.puro.**

El plásmido pSUPER.retro.puro de OligoEngine (Figura 18), es un vector de expresión de ARN pequeño de interferencia horquilla (shARN) de células eucariontes.



**Figura 18. Mapa del plásmido comercial pSUPER.retro.puro**

Este vector produce un shARN que carece de una cola de poliadenosina, tiene un comienzo de transcripción bien definido y una señal de terminación que consta de cinco timinas sucesivas. Este sistema se ha utilizado para producir una disminución eficiente y específica de la expresión génica. La expresión estable de shARN usando este vector, establece una inhibición que persiste en el tiempo de la expresión génica, lo que permite el análisis de fenotipos por pérdida de función que se desarrollan durante períodos de tiempo más largos <sup>242</sup>.

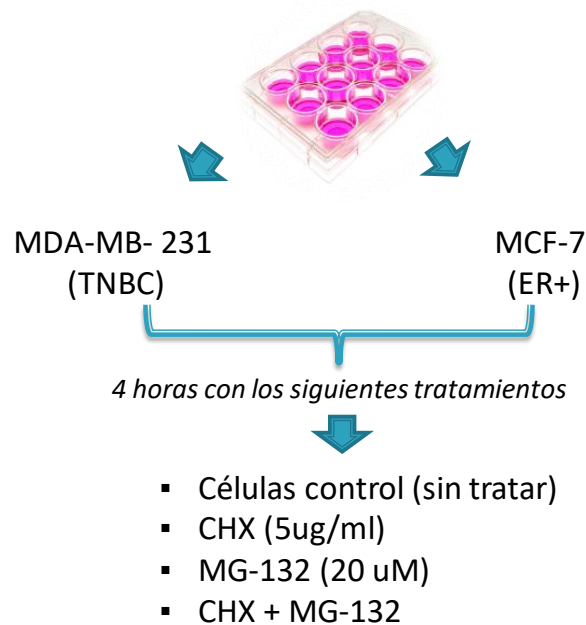
Este vector se utilizó tanto para transfecciones transitorias como para la producción de líneas que expresen un shARN de forma estable. En este trabajo se utilizó el plásmido pSuper-ACSL4 que ya había sido obtenido en el laboratorio <sup>22</sup> y su correspondiente plásmido vacío. La secuencia del inserto contenido en el pSuper-ACSL4 es 5' AAGATTATTCTGTGGATGA 3'.

## 5. Ensayo de estabilidad de ACSL4

Células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pocillo durante 48 horas en medio completo. Luego fueron incubadas en medio sin suero con un inhibidor de la síntesis proteica, cicloheximida (CHX), en una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a diferentes tiempos en ausencia de suero (control= 0, 2, 4 y 6 horas). Por último, se obtuvieron los lisados celulares correspondientes y se analizaron por western blot para la expresión de ACSL4. Con estos datos se realizó una curva de niveles de expresión de ACSL4 en función del tiempo.

## 6. Ensayo de inhibición proteasomal

Se utilizó el reconocido inhibidor del proteasoma, el MG-132, en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 y se procedió como se indica a continuación.



**Figura 19. Protocolo realizado en el ensayo de inhibición proteasomal**

Una vez realizado el ensayo se procedió a la obtención de los lisados celulares de cada línea y a la evaluación de los niveles de expresión de ACSL4 mediante western blot.

## 7. Cebadores utilizados

En la Tabla 3 se indican la totalidad de los cebadores utilizados en este trabajo de tesis indicando en qué tipo de reacción se utilizaron, la denominación del cebador y la secuencia de 5' a 3'.

Reacción	Cebador	Secuencia (5' → 3')	T° melting (T <sub>m</sub> )	
Mutagénesis Sitio Dirigida	VP 1.5 directo (cebador externo del vector)	GGACTTTCCAAAATGTCG	51,4°C	
	XL39 reverso (cebador externo del vector)	ATTAGGACAAGGCTGGTGGG		
	mut K702R directo	GGAGCTGAGGAACCATTACCTCCGAGACATTGAACGAATGTATGG	82°C	
	mut K702R reverso	CCATACATTCTACTATGTCTCGGAGGTAATGGTTCCTCAGCTCC		
	mut K621R directo	GTTTTGTGGTTCCTAACCAGCGAAGGTTGACACTTTTGGC	79°C	
	mut K621R reverso	CAAAACACCAAGGATTGGTCGCTTCCAAGTGTGAAAACCG		
qPCR Cuantitativa en tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>ADN mitocondrial</u> (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>)</li> </ul>	tRNA 3212 directo	CACCCAAGAACAGGGTTTGT	58,4°C
		tRNA 3319 reverso	TGGCCATGGGTATGTTGTTA	56,4°C
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>ADN nuclear</u> (β2-microglobulina)</li> </ul>	β2M 594 directo	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	62,5°C
		β2M 679 reverso	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	64,2°C

**Tabla 3.** Denominación, secuencia y temperatura de hibridación (T melting, T<sub>m</sub>) de los cebadores utilizados en este trabajo de tesis.

## 8. Mutación sitio-dirigida

Con el fin de realizar mutaciones sitio dirigidas sobre ACSL4 modificando los sitios de posible ubiquitinación correspondientes a las lisinas 621 y 702 de ACSL4, se diseñaron cebadores específicos utilizando las indicaciones del kit de Agilent, QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis <sup>243</sup>. Los pares de cebadores son complementarios entre sí y contienen las mutaciones diseñadas sobre las bases que se corresponden al codón que codifica para el aminoácido que se quiere mutar. Los cebadores se diseñaron según las sugerencias del fabricante que indican la ubicación de la mutación en el centro del cebador, un T<sub>m</sub> mayor a 78°C, una longitud de entre 25 y 45 bp, un contenido de CG mayor al 40% y una terminación en C o en G. La Tabla 3 contiene las características de los cebadores utilizados para realizar cada mutación: mut K702R directo y reverso, mutK621R directo y reverso respectivamente.

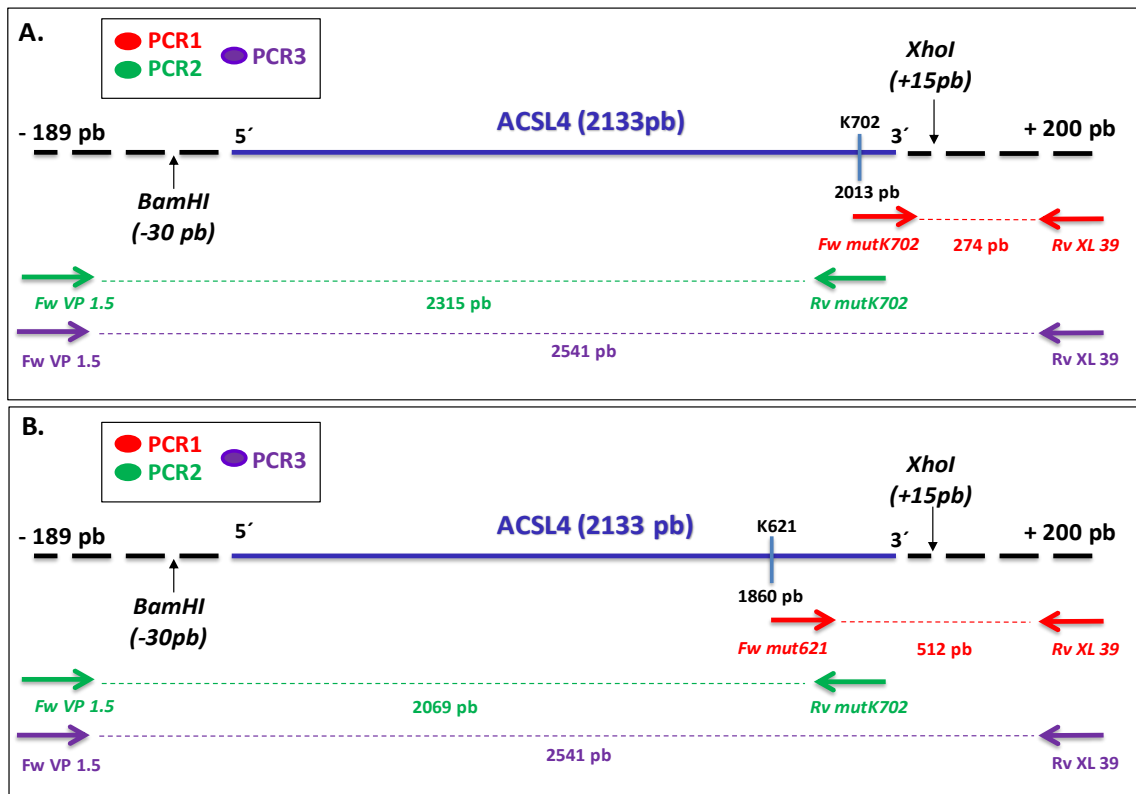
Para realizar las mutaciones se utilizó como molde el vector FACL4 (ACSL4). El protocolo que se llevó a cabo para la realización de las mutaciones utiliza la combinación de los cebadores diseñados mediante el QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit y cebadores externos pertenecientes al vector: el XL39 y VP1.5, (ver tabla 3) junto con el uso de la técnica de PCR tradicional. Este protocolo de mutación sitio dirigida es una modificación del protocolo conocido como *megaprimers* <sup>244,245</sup>.

Se realizaron 3 reacciones de PCR distintas. En cada reacción de PCR se utilizó un par de cebadores distintos combinados para permitir obtener la mutación deseada (Tabla 4). La tercera reacción de PCR se realizó utilizando como templado una mezcla en relación 1:1 de los productos de la primera y segunda reacción de PCR realizada (Figura 20).

Reacción de PCR	Cebadores utilizados
<b>PCR 1</b>	Cebador mutación directo (K621R o K702R)  Cebador externo VP 1.5 reverso
<b>PCR 2</b>	Cebador externo XL39 directo  Cebador mutación reverso (K621 o K702R)
<b>PCR 3</b>	Cebador externo XL39 directo  Cebador externo VP1.5 reverso

**Tabla 4.** Cebadores utilizados en las reacciones de PCR realizadas para la obtención de las mutaciones sobre ACSL4.





**Figura 20. Reacciones de PCR utilizadas para la mutagénesis sitio dirigida de ACSL4.** Se muestra un esquema de las reacciones de PCR que se realizaron para mutar la lisina 702 (A) y la lisina 621 (B) de ACSL4 introduciendo una arginina como aminoácido de reemplazo. Se detallan los cebadores utilizados y el tamaño de fragmento obtenido en cada reacción.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron mediante PCR de alta fidelidad con la enzima Pfu ADN Polimerasa de Promega. La Pfu es una polimerasa termófila que replica ADN a 75°C y tiene actividad correctora de errores (*proof-reading*) debido a su actividad 3'-5' exonucleasa. La tasa de error de esta enzima es un orden de magnitud inferior respecto a la de polimerasas que carecen de actividad *proof-reading*. Esta enzima no presenta actividad endonucleasa ni actividad 5'-3' exonucleasa. Está recomendado su uso para reacciones de PCR que requieran alta fidelidad de copia. En todos los casos, se utilizó 5 µl del buffer de reacción 10X provisto por el kit, 2 µl de templado (1,5 ng), 1 µl (100 ng) de cada cebador (100 ng/µl), 1 µl de la mezcla de dNTPs provista por el kit y la cantidad de H<sub>2</sub>O bidestilada para llevar a un volumen final de 50 µl. Luego se adicionó 1 µl de Pfu Ultra HF ADN polimerasa (2,5 U/µl) provista por el kit. Para las reacciones se tuvo en cuenta la T<sub>m</sub> de los primers utilizados y el tamaño del producto generado considerando que la tasa de amplificación de la enzima Pfu es de 500 pb/ minuto. Por lo tanto, las condiciones de amplificación para cada reacción fueron las siguientes:

**PCR 1 (1) y PCR2 (2)**

- Mut K7020R

Desnaturalización inicial	94°C - 2 min	
Desnaturalización	94°C - 30 seg	} 30 ciclos
Apareamiento	65°C (1) 55°C (2) 30 seg	
Elongación	72°C 1 min (1), 5,30 min (2)	
Extensión	72°C 5 min	

- Mut K621R

Desnaturalización inicial	94°C - 2 min	
Desnaturalización	94°C - 30 seg	} 30 ciclos
Apareamiento	65°C (1) 55°C (2) 30 seg	
Elongación	72°C 1,3 min (1), 5 min (2)	
Extensión	72°C 5 min	

**PCR3**

Las condiciones utilizadas en la reacción de la PCR 3 fueron las mismas para las mutaciones K702R y K621R y se detallan a continuación:

Desnaturalización inicial	94°C - 2 min	
Desnaturalización	94°C - 30 seg	} 25 ciclos
Apareamiento	55°C 30 seg	
Elongación	72°C 6 min	
Extensión	72°C 5 min	

El producto de la reacción de PCR3 se corrió en un gel de agarosa 1,5%. La banda correspondiente se cortó y se purificó del gel mediante el kit de extracción Wizard SV Gel® and PCR Clean-Up System (Promega) según como se indica en punto 9 de esta sección. El producto de purificación correspondiente a la mutación deseada se cortó con las enzimas de restricción correspondientes y necesarias para la ligación en el vector pCMV6- Entry, el cual fue previamente tratado con las mismas enzimas de restricción que el producto. La muestra correspondiente a la mutación fue ligada con el vector mediante la T4 ligasa de Promega. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-Blue y posteriormente se realizó la obtención de los plásmidos con las respectivas mutaciones a mediana escala.

## 9. Purificación de fragmentos de ADN

Se utilizó este método con el fin de purificar a partir de los medios de reacción los productos de amplificación por PCR y los fragmentos de ADN obtenidos a partir de cortes con enzimas de restricción. Se usó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Para cada purificación de ADN se realizó la electroforesis de las muestras, productos de reacción de la PCR3, en un gel de agarosa 1,5% y se escindió del mismo la banda de interés, la cual fue recolectada en un tubo eppendorf. Se adicionaron al tubo 10 µl de solución de unión a la membrana (isotiocianato de guanidina 4,5 M, AcK 0,5 M, pH 5) por cada 10 mg de gel de agarosa y se incubó 10 minutos a 55-65°C, mezclando vigorosamente cada 2 minutos para disolver la agarosa. Se transfirió la mezcla de gel disuelto a una minicolumna Wizard® conteniendo una membrana de sílica. Luego se incubó por 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto a 16.000 x g. El ADN de interés quedó adherido a la sílica. Se descartó el eluido y se lavó la columna con 700 µl de solución de lavado de la membrana (AcK 10 mM; EDTA 16,7 µM; etanol 80% v/v) y se repitió la centrifugación. Se realizó un segundo lavado con 500 µl de solución, centrifugando esta vez durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó 1 minuto adicional. Se eluyó el ADN con 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas centrifugando 1 minuto a 16.000 x g.

## 10. Digestión con endonucleasas de restricción

Para la digestión con endonucleasas de restricción, 1 µg de ADN se digirió con 5 UI de enzimas de restricción en una mezcla de digestión que contenía 2 µl del buffer

de reacción 10X adecuado para la reacción, 2  $\mu$ l de BSA acetilada (2 mg/ml) y  $H_2O_d$  hasta un volumen final de 20  $\mu$ l. Se incubó durante 2 a 3 h a 37°C con agitación suave. Los productos de la digestión se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa. Las endonucleasas de restricción utilizadas para realizar los cortes tanto de producto como del vector fueron EcoRI y XhoI para ambas mutaciones.

## 11. Electroforesis en geles de agarosa

Para la resolución de muestras de ADN se utilizaron geles de agarosa de distintos porcentajes (por lo general entre 1-1,5% p/v) conteniendo 0,5 mg/ml de bromuro de etidio y preparados en solución TAE 5X. La separación se realizó en un aparato de electroforesis horizontal conteniendo solución TAE 5X a voltaje constante (100 voltios). La visualización de los fragmentos se realizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de 305 nm. Se obtuvieron fotografías con una cámara digital Nikon y las imágenes de los geles se cuantificaron con el software Gel-Pro analyzer (IPS, North Reading, MA, USA).

## 12. Desfosforilación de vectores y reacción de ligación

Los plásmidos fueron cortados con las enzimas de restricción correspondientes y purificados. Los productos de la digestión fueron desfosforilados utilizando CIAP. Esta enzima cataliza la hidrólisis del grupo 5'-fosfato del ADN, ARN y ribo- y desoxirribonucleósidos trifosfatos. La desfosforilación se usa para prevenir la recircularización del vector. El plásmido cortado y purificado fue disuelto en 40  $\mu$ l de Tris-HCl 10 mM pH 8,0. La reacción de desfosforilación contenía el ADN plasmídico (hasta 10 pmol de extremos 5'), 40  $\mu$ l del buffer de reacción CIAP 10X (Tris-HCl 500 mM pH 9,3,  $MgCl_2$  10 mM,  $ZnCl_2$  1 mM y espermidina 10 mM) y 5  $\mu$ l de CIAP (0,01 U/ $\mu$ l) en un volumen final de 50  $\mu$ l. La reacción se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego se adicionó una nueva alícuota de CIAP y se continuó la incubación por otros 30 minutos adicionales a 37°C. Finalizada la incubación se adicionó 300  $\mu$ l de solución stop (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, SDS 0,5%). La mezcla de reacción se purificó por medio de columna como fue descrito anteriormente. Los fragmentos de ADN purificados y digeridos se ligaron al plásmido correspondiente digerido y desfosforilado. Se colocó 1  $\mu$ l de solución buffer 10X para ADN ligasa de T4 (Tris-HCl 300 mM pH 7,8,  $MgCl_2$  100 mM, DTT 100 mM, polietilenglicol 10%, ATP 10 mM), 1  $\mu$ l (25 ng) del vector, la cantidad correspondiente del fragmento de ADN a ligar

en relación molar 3:1 (inserto:vector) y 1  $\mu$ l de ADN ligasa de T4 (3 UI) en un volumen final de 10  $\mu$ l. Se dejó transcurrir la reacción durante toda la noche a 4°C. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-Blue como se describe en detalle más adelante.

### 13. Cepa bacteriana

La cepa de *Escherichia coli* utilizada en las transformaciones de plásmidos fue XL1-Blue de Stratagene Labs Systems (La Jolla, CA, USA). Genotipo de la cepa XL1-Blue: endA1, gurA96, hsdR17, recA1, relA1, supE44, thi-1, F<sup>'</sup>lac<sup>q</sup>Z  $\Delta$ M15, proAB, Tn10.

### 14. Preparación de bacterias *Escherichia coli* competentes

Para la preparación de bacterias competentes, se inoculó una colonia aislada de la cepa *Escherichia coli* XL1-Blue en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación continua durante toda la noche. A continuación, se sembró una alícuota de 0,1 ml del cultivo de bacterias en 10 ml de medio LB fresco y se incubó nuevamente a 37°C con agitación hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial (DO 600nm = 0,4 - 0,6). Luego, el cultivo fue centrifugado a 5.000 rpm (Sorvall SS34) durante 10 minutos y el sedimento fue resuspendido en 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y estéril. La suspensión fue mantenida en hielo durante 20 minutos repitiendo posteriormente el paso de centrifugación. En este caso, el sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de solución fría de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se incubó durante toda la noche a 4°C con el agregado de glicerol estéril (25%). A continuación, las células fueron fraccionadas en alícuotas de 200  $\mu$ l y se conservaron a -70°C.

### 15. Transformación de *Escherichia coli* XL1-Blue competentes

Todos los materiales para el procedimiento de transformación, incluyendo las soluciones y los tubos de polipropileno, se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso. El método empleado es una variación del método de Hanahan <sup>246</sup>. Las bacterias competentes se descongelaron durante 20 minutos en hielo. En un tubo Eppendorf conteniendo 200  $\mu$ l de la suspensión de bacterias competentes se adicionaron 10  $\mu$ l de la solución de ADN plasmídico (0,1  $\mu$ g) de manera circular y suave, mezclando con pipeta para homogeneizar la mezcla. Se dejó estabilizar durante 30 minutos a 4°C y luego se realizó un choque térmico a 42°C por 45 segundos, seguido inmediatamente

por una incubación en hielo durante otros 2-3 minutos. Posteriormente se adicionaron 700 µl de medio LB y se incubaron a 37°C durante 60 minutos, para lograr la recuperación de las células. Finalmente se centrifugó a temperatura ambiente a 5.000 g durante 5 minutos y las bacterias del residuo (100 µl) se plaquearon en LB agar ampicilina o kanamicina respectivamente. La placa se incubó en estufa a 37°C durante toda la noche.

## 16. Aislamiento y Purificación de ADN plasmídico

### - Pequeña escala

Para el aislamiento y purificación del ADN plasmídico en pequeña escala (MiniPrep) se utilizó el sistema Wizard® (Promega) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Para la obtención de las bacterias, colonias aisladas seleccionadas con antibiótico se inocularon en 5 ml de LB ampicilina y/o kanamicina y se incubaron durante la noche a 37°C con agitación continua. El cultivo obtenido se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspendió en 200 µl de una solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y ARNasa A 100 µg/ml. A continuación, se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 200 µl de solución de neutralización (AcK 1,32 M pH 4,8). La suspensión obtenida se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se trasvasó a una columna conteniendo la resina DNA Wizard® (Promega) y luego se centrifugó la columna a 10.000 x g durante 2 minutos. El ADN plasmídico quedó retenido en la columna y la misma se lavó con 2 ml de una solución conteniendo NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 5 mM y etanol 55 %. Luego se volvió a centrifugar a 10.000 x g durante 2 minutos. Por último, se eluyó el ADN de la resina con 50 µl de agua libre de nucleasas mediante centrifugación a 10.000 x g durante 2 minutos.

### - Mediana escala

Para la purificación del ADN plasmídico a mediana escala (MIDIPREP) se utilizó el sistema Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) procediendo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Colonias bacterianas aisladas transformadas seleccionadas se inocularon en 100 ml de LB ampicilina y/o kanamicina y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación continua. El cultivo obtenido se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en

3 ml de una solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y ARNasa A 100 mg/ml. A continuación, se agregaron 3 ml de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 3 ml de solución de neutralización (AcK 1,32 M, pH 4,8). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La suspensión resultante se centrifugó a 14.000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se trasvasó a un tubo conteniendo la resina DNA Wizard®. La mezcla ADN/resina se trasvasó a una columna conectada a una bomba de vacío. Luego de aplicar vacío, el ADN plasmídico quedó retenido en la columna. La matriz se lavó dos veces con 15 ml de una solución de lavado conteniendo AcK 80 mM, Tris-HCl 8,3 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 10 mM y etanol 55%. Luego de secar la resina durante 30 segundos, se cortó la columna y la parte inferior de la misma se transfirió a un tubo Eppendorf. El sistema se centrifugó a 10.000 x g durante 2 minutos. Finalmente, el ADN de la resina se incubó con 300 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a 60°C durante 1 minuto y posteriormente se eluyó por centrifugación a 10.000 x g durante 20 segundos.

## **17. Verificación de mutaciones por secuenciación del ADN plasmídico**

Los plásmidos obtenidos a mediana escala correspondientes a las mutaciones realizadas en ACSL4 fueron mandados a secuenciar al servicio ofrecido por MacroGen Inc (Seul, Corea del Sur). Los chequeos de las mismas fueron realizados a través de los cromatogramas y secuencias que nos entregaron como resultados de la secuenciación.

## **18. Transfección de líneas celulares**

### **- Transfección transitoria**

Se utilizó el siguiente procedimiento para transfectar transitoriamente células de mamífero en un formato de 24 pocillos. Para transfectar células en otros formatos, el procedimiento se realizó escalando los volúmenes de reactivos utilizados. Un día antes de la transfección, se sembraron 200.000 células en 500 µl de medio de cultivo completo para llegar a un 80-95% de confluencia en el momento de la transfección. El medio de cultivo fue reemplazado 24 h después por 500 µl de medio completo sin antibióticos por pocillo. Para cada muestra de transfección se prepararon los complejos ADN-Lipofectamina™ 2000 de la siguiente manera: se diluyó 0,8 µg de ADN plasmídico en 50 µl de medio Opti-MEM sin suero y se mezcló suavemente. En otro tubo se diluyó la cantidad apropiada de Lipofectamina™ 2000 en 50 µl del mismo medio (2 µl para un

pocillo de 24). Se mezcló suavemente e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se combinaron la dilución de Lipofectamina™ 2000 con la del ADN plasmídico y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente (volumen final 100 µl). Se agregaron los 100 µl de complejos ADN-Lipofectamina™ 2000 formados a cada pocillo de células. Se mezcló suavemente. El medio se cambió a las 6 h por medio de cultivo completo. Las células se incubaron durante 48 h salvo que se indique un tiempo diferente en algún experimento en particular. Los controles de los plásmidos se realizaron mediante la transfección del plásmido vacío correspondiente.

Para llevar a cabo las transfecciones de las construcciones de las diferentes mutaciones, se tuvo en cuenta la concentración de la muestra de los plásmidos a transfectar. Por lo tanto, todos los plásmidos se utilizaron en cantidades equimolares.

- **Co- transfección transitoria**

El protocolo utilizado se corresponde con el utilizado en la transfección transitoria (arriba). En este caso para realizar la co- transfección de los plásmidos se transfectaron concentraciones equivalentes de cada construcción respetando la cantidad de ADN posible de transfección indicada por el fabricante.

- **Transfección estable**

Se generaron líneas estables tanto de MDA-MB.231 como de MCF-7 para la construcción FLAG-ACSL4. El procedimiento consistió en transfectar dichas líneas celulares en forma estable. La transfección de las células con la construcción FACL4 (FLAG-ACSL4) lleva a la degradación específica del ARNm. El plásmido contiene un sitio de resistencia a Neomicina (G418) por lo que este antibiótico fue el que se utilizó para la selección de los clones transfectados.

Brevemente, se cultivaron células MCF-7 y MDA- MB- 231 en placas de cultivo de 60 mm. Las células fueron transfectadas con el vector FACL4 mediante la utilización de Lipofectamina™ 2000 y medio Opti-MEM tal como se explicó en el apartado anterior. Después de 48 horas de realizada la transfección, las células fueron expuestas en forma continua y durante aproximadamente un mes al antibiótico de selección G418 (0,5 mg/ml). Las células que sobrevivieron a la exposición al antibiótico fueron aisladas y sembradas en muy baja densidad en placas de 100 mm. Al sembrarlas en tan baja densidad se aseguró que queden separada de a una célula. Se realizó un seguimiento



en el crecimiento de dichas células hasta que cada una formó una colonia. Cada colonia fue aislada y cultivadas en placas de 96 pocillos (aproximadamente 20 clones). La multiplicación de los clones se realizó mediante sucesivos pasajes a placas de 48, 24 y 12 pocillos y por último a frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie. Para corroborar que las células se hayan transfectado eficientemente se realizó el western blot correspondiente contra el FLAG del vector. En base a los resultados de esta técnica, se eligieron los clones que se utilizaron en algunos ensayos de esta tesis.

## **19. Obtención de lisados totales**

Los lisados celulares totales fueron obtenidos después de un lavado de las células con solución salina PBS. La lisis se realizó con una solución conteniendo Tris-HCl 20 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 125 mM y Triton® X-100 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasas (leupeptina 10 mM, pepstatina A 1 mM, PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 mM, NaF 50 mM y β-glicerol fosfato 40 mM), en una proporción que varió entre 100 y 300 µl/pocillo. Las células fueron cosechadas mecánicamente en frío. Se centrifugó a 3.000 x g durante 10 minutos para eliminar residuos. Para los siguientes análisis se utilizó el sobrenadante.

## **20. Obtención de fracción mitocondrial (fraccionamiento subcelular)**

El aislamiento de las mitocondrias para el posterior análisis de las proteínas fue realizado mediante centrifugación diferencial. Brevemente, las células fueron lavadas con PBS y cosechadas en una solución buffer TSE: Tris-HCl 10 mM pH 7,4, sacarosa 250 mM, EDTA 0,1 mM. Luego fueron homogeneizadas con un homogeneizador manual (Pellet pestle motor homogeniser, Kontes) y centrifugadas a 1.000 x g durante 15 minutos, a fin de remover los núcleos y restos de células. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 16.000 x g durante 15 minutos para obtener la fracción mitocondrial (sedimento). La fracción mitocondrial fue lavada por única vez con solución amortiguadora TSE, centrifugada a 16.000 x g durante 15 minutos y luego resuspendida en la misma solución amortiguadora.

## 21. Análisis de proteínas

### - Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas totales fue determinada por el método de Bradford <sup>247</sup> usando BSA como estándar (NATOCOR).

### - Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas provenientes de lisados celulares totales o fracciones mitocondriales (20 µg) fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) conforme a la técnica descrita por Laemmli <sup>248</sup>. Se realizaron geles planos de poliacrilamida entre placas de vidrio, utilizando el sistema MiniProtean III System de BioRad. El gel separador se preparó con acrilamida 10% ó 12%, bisacrilamida 0,22% en Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 conteniendo SDS 0,1%. La composición del gel concentrador fue acrilamida 5% y bisacrilamida 0,136% en Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 conteniendo SDS 0,1%. Las muestras a sembrar en los geles fueron preparadas en solución de siembra conteniendo Tris- HCl pH 6,8 62 mM, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,1% como indicador del frente de la corrida electroforética y luego, fueron hervidas durante 5 minutos. La electroforesis fue llevada a cabo a temperatura ambiente en solución buffer Tris-HCl 0,025 M pH 8,3, glicina 0,19 M y SDS 0,1%, aplicando voltaje constante de 80 V para el gel concentrador y 120 V para el separador. En todas las corridas se incluyeron mezclas de estándares de peso molecular: miosina, 200 kDa; β-galactosidasa 116 kDa; fosforilasa b 97 kDa; BSA 66 kDa; Ovoalbúmina 45 kDa; anhidrasa carbónica 29 kDa.

### - Western blot

En esta técnica, las proteínas resueltas en el gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de PVDF como soporte inerte, la cual interacciona de forma no covalente con las proteínas. Luego, la proteína de interés fue detectada mediante el uso de anticuerpos que interaccionaron de manera específica con la misma.

Brevemente, luego de finalizada la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF en una solución amortiguadora conteniendo Tris-HCl pH 8,3 25 mM, glicina 192 mM, y metanol 20%, a un voltaje constante de 2,4

mA/cm<sup>2</sup> durante 90 minutos. Finalizada la transferencia y para evaluar la eficiencia de la misma, se tiñó el gel para detectar las proteínas no transferidas con azul de Coomassie 0,1% disuelto en una solución acuosa conteniendo etanol 25% y ácido acético 10%. La decoloración se realizó por sucesivos pasajes en una solución conteniendo etanol 25% y ácido acético 10%. La visualización de las proteínas transferidas a las membranas se realizó sumergiendo las mismas en una solución de Ponceau S (Ponceau S 0,2% en ácido acético 1%) durante 10 minutos removiendo luego el colorante no unido a proteínas por sucesivos lavados con metanol.

Las membranas fueron luego incubadas en TTBS y leche en polvo libre de grasas al 5% o BSA al 1% (solución de bloqueo) durante 120 minutos a temperatura ambiente con agitación suave para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos. Luego de este procedimiento, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con las diluciones apropiadas del anticuerpo primario en su correspondiente solución de bloqueo: anticuerpo policlonal anti-ACSL4 obtenido en conejo, 1/1.000 en leche al 5%; anticuerpo monoclonal anti-β-tubulina, 1/4.000 en BSA al 1%; anticuerpo monoclonal anti-subunidad 2 del complejo III de la cadena respiratoria, 1/10.000 en BSA al 1%; anticuerpo monoclonal anti-GAPDH, 1/4.000 en BSA al 1%. Los anticuerpos específicos utilizados se indican en cada figura de los resultados. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 minutos cada vez en TTBS. Luego las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, anti-IgG de conejo obtenido en cabra conjugado con peroxidasa (1/5.000 en TTBS) para los anticuerpos primarios policlonales o anti-IgG de ratón obtenido en cabra conjugado con peroxidasa (1/5.000 en TTBS) para los anticuerpos primarios monoclonales. Luego de la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y un último lavado de 10 minutos con TBS. Finalmente, la señal fue detectada por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham Pharmacia) y autorradiografía.

#### - **Co- Inmunoprecipitación**

Para la co-inmunoprecipitación de las proteínas ACSL4 y Parkina exógenas, las células HEK293 se co-transfectaron con los vectores FLAG-ACSL4 y HA-Parkina. Pasadas 48 horas post- transfección, las células se recogieron y se lisaron en 500 µl de solución tampón (NaCl 0,15 M, Tris- HCl 0,025 M, EDTA 0,001 M, NP-40 1%, Glicerol 5%), cocktail de inhibidores 1X con 100 mM de iodoacetamida con el objetivo de evitar la ruptura de los puentes disulfuro de las inmunoglobulinas. Las muestras se

centrifugaron 12 min a 12000 rpm a 4°C. Se procedió a recuperar el sobrenadante del cual se tomaron 40 µl para realizar WB (input). Al sobrenadante recuperado se le agregó 1,5 µl de anticuerpo anti-FLAG (anti-DDK) en hielo y se incubaron las muestras antígeno- anticuerpo con agitación en cámara fría durante 2 h. Para la inmunoprecipitación se utilizaron perlas de agarosa anti-FLAG (Sigma), las cuales fueron previamente lavadas y resuspendidas en PBS 1X. Se colocaron 12 µl de perla de agarosa a las muestras de antígeno- anticuerpo pasadas a las 2 h de incubación, y se incubaron 1 hora y media en cámara fría con agitación lenta. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 5 min. Por último, se realizaron 5 lavados con solución tampón del inicio. Los inmunoprecipitados obtenidos se sometieron a ensayos de western blot con los anticuerpos anti-FLAG, anti- ACSL4 y anti- Parkina.

#### - **Inmunocitoquímica de fluorescencia**

Se analizó el marcador mitocondrial TOM20 así también como se verificó la transfección estable mediante el análisis de expresión de la etiqueta FLAG a través de inmunocitoquímica de fluorescencia. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos sobre *coverslips* tratados previamente con Poli-L-lisina. Una vez alcanzado aproximadamente un 80 % de confluencia, se retiraron los *coverslips* y se lavaron las células con buffer PBS. A continuación, las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído 4 % y sacarosa 5 % pH 7,3 durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y luego, se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Las muestras se permeabilizaron por 10 minutos a TA con solución de permeabilización de PBS con Tritón X-100 0,1%. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, los *coverslips* fueron incubados con solución de bloqueo (BSA 0,05% en PBS1X) durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente y luego, fueron incubados toda la noche en cámara húmeda a 4 °C con las diluciones apropiadas de los anticuerpos primarios monoclonales, anti FLAG (1/100) y anti-TOM20 (1/200) obtenidos en ratón, todos diluidos en solución de bloqueo. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente con PBS 1X, seguidos por incubación durante 1,5 h en cámara húmeda y oscuridad con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón obtenido en cabra conjugado con Cy2, fluoróforo que emite en verde. Luego de 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X a temperatura ambiente, los preparados fueron incubados con el colorante de núcleos DAPI (1/7000) por 10 minutos en oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X, se lavaron los *coverslips* con agua destilada y se montaron sobre un portaobjetos con

medio de montaje para fluorescencia (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Los preparados fueron analizados al microscopio Nikon E200 de epifluorescencia. En todos los ensayos se incluyeron controles omitiendo el anticuerpo primario. Las imágenes fueron tomadas a iguales tiempos de exposición.

## 22. Ensayo de actividad mitocondrial

La actividad mitocondrial se evaluó a través de microscopía de fluorescencia utilizando el colorante Mitotracker Red 580 (MitoTracker®, Invitrogen). Este compuesto se acumula en las mitocondrias con una activa respiración, lo cual depende también del potencial de membrana mitocondrial. Este tinte fluorescente presenta una excitación a una longitud de onda de 581 nm y una emisión en rojo a 644 nm.

Para este ensayo, células MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4 así como células MDA-MB-231 shACSL4 y su respectivo control (shControl) fueron sembradas en placas de 24 pocillos conteniendo los *coverslips* previamente tratados con poli-L-lisina para facilitar la adherencia de las células, a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en medio completo durante 24 horas. Luego, las células fueron incubadas en medio sin suero con Mitotracker red en una concentración final de 150 nM durante 45 minutos a 37°C en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación el medio con el tinte fue retirado de cada pocillo y se realizó 1 lavado con PBS 1X. Luego las células fueron fijadas con solución de PFA 4% y sacarosa 5% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el periodo de incubación se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X a temperatura ambiente y finalmente los preparados fueron incubados con el colorante de núcleos DAPI (1/7000) por 10 minutos en oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X, se lavaron los *coverslips* con agua destilada y se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Los preparados fueron analizados al microscopio de epifluorescencia Nikon E200 con un aumento de 40X, antes de ser observados por microscopía confocal.

## 23. Análisis de masa mitocondrial

Se evaluó la masa mitocondrial por citometría de flujo post incubación con Mitotracker Green FM (MTG) de Invitrogen. El MTG es una tinción verde fluorescente mitocondrial independiente del potencial de membrana mitocondrial, lo que lo hace un marcador directo de masa mitocondrial. El MTG no se conserva bien después de la

fijación mediante aldehído por lo tanto se utiliza en suspensión. Este tinte mitocondrial presenta excitación a una longitud de onda de 490 nm y una emisión en verde a 516 nm.

Para este estudio, células MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4 así como células MDA-MB-231 shACSL4 y su respectivo control (shControl) fueron sembradas en frascos T25 (25 mm) hasta alcanzar confluencia en medio completo. Luego fueron levantadas con tripsina 1X y resuspendidas en medio sin suero. Se separó una alícuota para el conteo de células mediante el contador automático Countes II FL (Life Technologies). Las células en suspensión fueron incubadas con MTG (10  $\mu$ M) durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Luego fueron centrifugadas a 5000xg durante 5 minutos y lavadas 2 veces con PBS 1X. Se resuspendieron y separaron  $1 \times 10^6$  células por tubo eppendorf en PBS 1X. Estas células fueron analizadas por citometría de flujo para medir el nivel de MTG incorporado. El citómetro de flujo utilizado para estos estudios fue el FACS Aria II (INIGEM-Hospital de Clínicas “José de San Martín” Facultad de Medicina, UBA). Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software Cyflogic v.1.2.1

## 24. Análisis de imágenes de fluorescencia

Las imágenes de la inmunocitoquímica y/o ensayos que involucran fluorescencia fueron obtenidas en el IFIBIO de la Facultad de Medicina, UBA con un microscopio confocal Olympus FV1000 y fueron analizadas posteriormente con el software FIJI (Fiji is just for Image J) de la plataforma Image J <sup>249</sup>.

## 25. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico (ADNg) de las células MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4 se realizó utilizando el Quick Genomic DNA Extraction Kit (Dongsheng Bioteoh, DSBIO, Corea del Sur). Por lo tanto, siguiendo el protocolo del fabricante, las células fueron levantadas en PBS 1X, luego se añadieron 200  $\mu$ l de solución DS y se mezcló por inversión. Para eliminar el ARN contaminante, se agregaron 4  $\mu$ l de ARNasa A (100 mg / ml) y luego se dejó reposar 5 min a T°ambiente. Se añadieron 20  $\mu$ l de Proteinasa K, y se agitó en vórtex brevemente. Luego se procedió a incubar a 55 ° C hasta obtener una solución homogénea durante 1 a 2 horas. Una vez obtenida la solución homogénea, se añadieron 220  $\mu$ l de solución MS y se mezcló bien con un vórtex. La muestra se incubó luego a 65 ° C durante 10 min (invirtiendo varias veces

para obtener una solución homogénea). Posteriormente se añadió 220 µl de etanol (96–100%) al lisado y se mezcló bien mediante un vórtex. A continuación, se pasó la mezcla obtenida a la columna de centrifugado provista por el fabricante la cual se colocó en un tubo de recolección de 2 ml. La columna se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min. El ADN genómico se adsorbió en la membrana de sílice de la columna en este paso, el eluido fue desechado. Luego se añadieron 500 µl de solución tampón de lavado PS y se centrifugó durante 1 min a 12.000 rpm, nuevamente se desechó el eluido. Luego, se añadieron 500 µl de la solución tampón de lavado PE y se centrifugó durante 1 min a 12.000 rpm desechando el eluido. Por último, se centrifugó la columna durante 3 min a 12.000 rpm para secar la membrana de la columna. La columna de centrifugado se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml y se pipetearon 50 µl de agua estéril libre de nucleasas previamente calentada a 65°C. La columna con el eppendorf se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto a T° ambiente, el eluido contiene el ADN genómico que fue almacenado a -20° C para su posterior uso.

## **26. Cuantificación de ADN mitocondrial y ADN nuclear**

Se realizó la extracción de ADN genómico como se mencionó anteriormente. Luego utilizando cebadores específicos para ADN mitocondrial y ADN nuclear se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real. Los cebadores se correspondieron a RNA de transferencia (tRNA) para la amplificación de ADN mitocondrial y a la β2-microglobulina para la amplificación de ADN nuclear (ver tabla 3).

## **27. PCR cuantitativa en tiempo real**

La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando el equipo Mic qPCR cycler de Bio Molecular Systems. Previamente se obtuvo el ADNg de las muestras a analizar tal como se explicó previamente.

Cada reacción se realizó en 20 µl de solución que contenían 0,1 µg de ADNg, cebadores directos y reversos 10 µM y 10 µl de SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. Las condiciones generales de la reacción fueron:

Desnaturalización inicial	95°C – 2 min	
Desnaturalización	95°C - 15 seg	} 40 ciclos
Apareamiento	55°C/ 60° - 15 seg	
Elongación	72°C - 1 min	
Finalización	95°C – 15 seg	

Para calcular los resultados se calculó un promedio de los dCt de cada parámetro y se calculó la relación ADNmt/ ADNn en función al promedio de dCt.

La secuencia y Tm de los cebadores utilizados en la qPCR tanto para el ADNn como para el ADNmt se detallan en la tabla 3.

## 28. Estudio de bioenergética mitocondrial

Se sembraron 24 mil células en 8 pocillos de una microplaca de cultivo celular XFe24 V7 (Seahorse Bioscience) previamente recubierta con polietilenimina en medio DMEN suplementado con 10% SFB y 1% Penicilin/Streptomicina. El día del ensayo el medio se reemplazó con 600 µL de medio de incubación (KCl 3,5 mM, NaCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, D-glucosa 15 mM con o sin piruvato 10 mM, 4 mg/ml BSA, pH 7,4). Las placas se mantuvieron a 37°C durante 20 min y se cargaron en el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los experimentos se realizaron a 37°C. Las mediciones de la línea base de TCO y se realizaron al comienzo del ensayo, y estas fueron seguidas por la adición secuencial de un inhibidor de ATP sintasa (oligomicina), un desacoplante de fosforilación oxidativa (FCCP) y un inhibidor del Complejo III (antimicina). Por lo general, se midieron 3 medidas de referencia y tres tasas de respuesta (después de la adición de un compuesto) y se utilizó el promedio de estas tasas para el análisis de datos. Las células se titularon primero con distintas concentraciones de FCCP. La concentración de 0,5 µM el FCCP proporcionó la tasa máxima de consumo de oxígeno por lo que esta concentración se utilizó para los experimentos. La tasa de consumo de oxígeno no mitocondrial se determinó después de la adición de 0,5 µM de antimicina/rotenona y se restó de todos los demás valores antes del cálculo de los parámetros respiratorios basado en la descripción de estudios



previos <sup>250</sup>. Las concentraciones de oligomocina y rotenona/antimicina A utilizadas son recomendadas por el protocolo del test.

La TCO se midió como picomol de O<sub>2</sub> por minuto (pmol/min) y se relativizó en función del último punto medido de respiración basal (100%) generando un porcentaje de TCO (TCO%). Los parámetros respiratorios se calcularon como indica el protocolo del fabricante y utilizando el software Wave provisto por el fabricante.

([https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Cell\\_Mito\\_Stress\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf))

## 29. Análisis *in silico*

Para identificar las funciones biológicas estadísticamente significativas y las vías de señalización afectadas por los genes expresados diferencialmente en nuestras comparaciones, realizamos un nuevo análisis utilizando Ingenuity Pathways Analysis (IPA; Ingenuity Systems, Inc) como describimos previamente <sup>152</sup>. IPA es la base de datos cruda y el sistema de análisis más grande para comprender las rutas metabólicas y de señalización, las redes moleculares y los procesos biológicos que se modifican de manera más significativa en un conjunto de datos de interés. Esta base de datos se va actualizando continuamente. La clasificación y la importancia de las biofunciones y las vías canónicas se probaron mediante el valor p. Además, las vías canónicas se ordenaron por la proporción (número de genes del conjunto de datos de entrada que se asignan a la vía dividido por el número total de moléculas que existen en la vía canónica).

Se utilizó, además Metascape (<https://metascape.org/>)<sup>251</sup>, para el análisis y visualización de los genes mitocondriales afectados por la expresión de ACSL4 en el RNA-seq. Metascape es un portal web diseñado para proporcionar un recurso completo de anotación y análisis de listas de genes. Metascape combina el enriquecimiento funcional, el análisis de interactomas, y la anotación de genes para aprovechar más de 40 bases de conocimiento independientes dentro de un portal integrado.

## 30. Análisis estadístico

Los resultados se mostraron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística fue evaluada utilizando ANOVA, seguida del test de Tukey, o test de student de 2 vías, a menos que se indique algo diferente en algún

ensayo en particular. En todos los análisis estadísticos se consideró significativo,  $p < 0,05$ . Se determinó \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism.

# *Resultados*

## **A. Evaluación de la estabilidad y regulación post-traducciona** **de ACSL4 en líneas celulares de cáncer de mama.**

### **A.1. Análisis y comparación de la estabilidad de ACSL4 en líneas celulares de cáncer de mama**

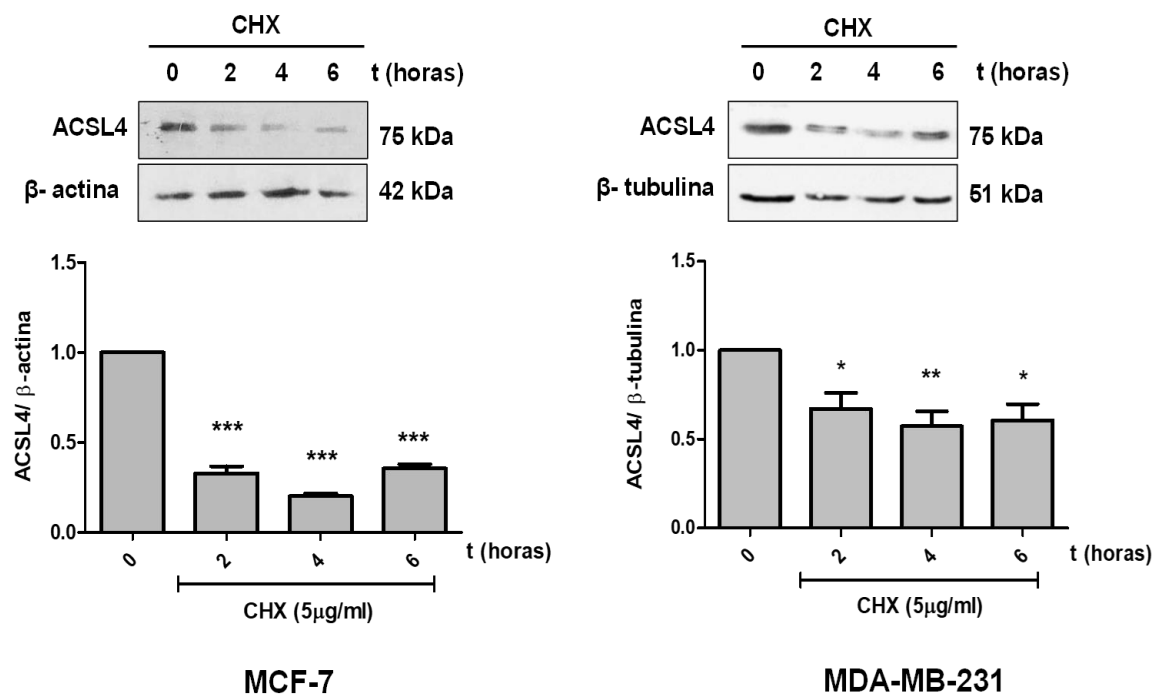
En algunos tipos de cáncer se observa una expresión alterada de ACSL4 y se ha demostrado que esta enzima tiene un rol en el desarrollo de un fenotipo agresivo en las células tumorales. En cáncer de mama y próstata se encuentra una correlación negativa entre la expresión de ACSL4 y la expresión del receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y de andrógenos respectivamente. Se demostró que en estos tipos de cáncer la expresión de ACSL4 correlaciona con tumores en los que hay ausencia de receptores hormonales <sup>88,98,148</sup>.

Existen resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo* que demuestran que la sobreexpresión de ACSL4 modula la expresión tanto del ER y PR<sup>127</sup>. Esta observación concuerda con el hecho de que en muestras de tumores humanos la sobreexpresión de ACSL4 correlaciona con una disminución en la expresión de dichos receptores <sup>88,148</sup>.

En líneas tumorales de cáncer de mama los niveles de expresión de ACSL4 correlacionan significativamente con la agresividad tumoral <sup>22</sup>. En particular, los niveles de esta enzima se encuentran elevados en líneas tumorales de mama altamente agresivas de fenotipo triple negativo (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2/neu<sup>-</sup>), tales como las líneas celulares MDA-MB-231 y HS578T y se encuentra disminuido en líneas menos agresivas tal como la línea MCF-7 (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2/neu<sup>-</sup>)<sup>22</sup>. Por lo tanto, es fundamental profundizar en el conocimiento de la regulación de los niveles de expresión de esta enzima en células de cáncer de mama.

Debido a esto, para abordar esta cuestión y respondiendo al estudio de la regulación post-traducciona de ACSL4, como parte de los objetivos de esta tesis doctoral, se procedió a la evaluación y comparación de la estabilidad de ACSL4 en distintas líneas tumorales de mama de variada agresividad. Para comenzar con los estudios mencionados utilizamos como modelo la línea MCF-7 (menos agresiva) y la línea MDA-MB-231 (más agresiva). Para esto, en ambas líneas celulares, realizamos una curva en función del tiempo para los niveles de expresión de ACSL4 utilizando cicloheximida (CHX) como inhibidor de la síntesis proteica. Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos en medio completo durante 48 horas e incubadas en presencia o ausencia de CHX (5 $\mu$ g/ml) a diferentes tiempos en ausencia de suero

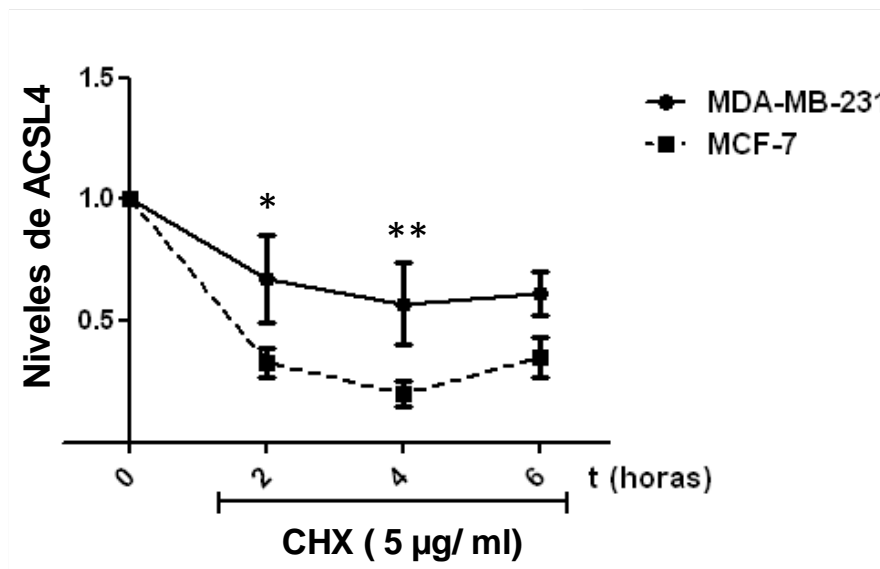
(control= 0, 2, 4 y 6 horas). Por último, se obtuvieron los lisados celulares totales y se evaluó la expresión de ACSL4 mediante western blot (Figura 21).



**Figura 21. Análisis de la expresión de ACSL4 en líneas de cáncer de mama de distinta agresividad incubadas con cicloheximida a diferentes tiempos.** Células de la línea MCF-7 y la línea MDA-MB-231 fueron incubadas con CHX (5µg/ml) a distintos tiempos (0, 2, 4 y 6 h). Se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron los niveles de expresión de ACSL4 por western blot. Los resultados se expresan como los niveles densitométricos de ACSL4 respecto de su control de carga respectivo, expresados como veces de cambio respecto del control (0h) ANOVA \*p<0,05, \*\* p< 0,01, \*\*\* p< 0,001.

Los resultados observados demostraron que el tratamiento con CHX generó una disminución en los niveles de ACSL4. Luego de 4 horas de tratamiento la disminución en los niveles de ACSL4 fue máxima en ambas líneas. A las 4 horas post tratamiento, los niveles de expresión de ACSL4 disminuyeron aproximadamente en un 40 % en la línea MDA-MB-231 respecto del control (sin tratar), mientras que en la línea MCF-7 la disminución fue de aproximadamente un 70 % respecto del control. Estos resultados sugieren que, los niveles de ACSL4 en la línea de mayor agresividad MDA-MB-231 son más estables en el tiempo que en la línea MCF-7 de menor agresividad, lo que avala el mayor nivel de ACSL4 reportado en células tumorales más agresivas.

Para comparar las diferencias observadas en la estabilidad de ACSL4, realizamos una curva de decaimiento de la expresión de la enzima para ambas líneas tumorales. Esta curva nos permitió comparar el decaimiento en los niveles de expresión de dicha enzima, entre ambas líneas tumorales en estudio (Figura 22).

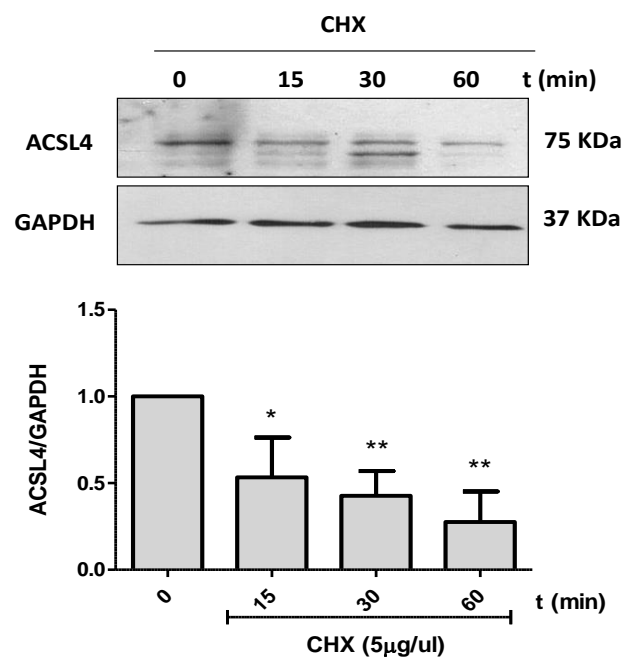


**Figura 22. Curva de decaimiento de los niveles de ACSL4 en presencia de cicloheximida en líneas tumorales de cáncer de mama de distinta agresividad.** Las barras representan los niveles densitométricos de ACSL4 relativizados al control de carga respectivo expresados como veces de cambio (unidades relativas) respecto del control (sin CHX) ANOVA de 2 vías \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

El análisis estadístico que se muestra en la figura 22 demostró que la disminución de la expresión de ACSL4 resulta significativa a las 2 horas de tratamiento con CHX (\*  $p < 0.05$ ) alcanzando la mayor significancia a las 4 horas (\*\* $p < 0.01$ ), tiempo en donde podemos observar una caída más pronunciada de los niveles proteicos de esta enzima en la línea MCF-7 respecto de la línea MDA-MB- 231. Estos resultados sugieren que ACSL4 posee una menor estabilidad en líneas de menor agresividad, lo que coincide con los niveles basales encontrados de esta enzima en líneas de distinta agresividad tumoral.

## A.2. Determinación de la estabilidad de ACSL4 a tiempos cortos en la línea MCF-7

Dado que en la línea MCF-7 ya se observa una disminución importante de los niveles de ACSL4 a las 2 horas del tratamiento con CHX, realizamos una curva de CHX (5  $\mu\text{g/ml}$ ) en función de tiempos más cortos para la expresión de ACSL4. Los tiempos de incubación fueron de un rango con máximo de 1 hora dividida en intervalos de 15 minutos (Figura 23).



**Figura 23. Evaluación de los niveles de ACSL4 en la línea MCF-7 de cáncer de mama en presencia de CHX en tiempos cortos.** Células MCF-7 fueron incubadas con CHX (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 minutos). Se obtuvieron los lisados celulares y se determinó la expresión de ACSL4 por western blot. Los resultados se expresan como los niveles densitométricos de ACSL4/GAPDH expresados como veces de cambio respecto del control (0 h.). ANOVA seguido del Test de Dunnet, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Se pudo observar una disminución significativa en los niveles de ACSL4 en la línea de cáncer de mama MCF-7 a los 15 minutos de incubación con CHX. Por lo tanto, demostramos que dicha enzima posee muy poca estabilidad en esta línea de baja agresividad, contrario a lo que sucede en la línea MDA-MB-231 de mayor nivel de agresividad, en donde ACSL4 demostró ser más estable. Los resultados observados, en conjunto, indican que ACSL4 presenta una expresión diferencial en células de cáncer

de mama de distinto nivel de agresividad, siendo su expresión más estable en el tiempo en células de mayor agresividad tumoral, como lo son las MDA- MB-231.

### A.3. Efecto de la inhibición del proteasoma en los niveles de ACSL4 en células tumorales mamarias

Se ha demostrado, en células hepáticas, que ACSL4 sufre degradación a través de la vía proteasomal<sup>164</sup>. Debido a esto, con el objetivo de profundizar el estudio sobre la estabilidad de ACSL4 decidimos evaluar la participación del proteasoma como principal protagonista en la degradación de ACSL4. Para llevar a cabo este ensayo utilizamos un reconocido inhibidor proteasomal, el MG-132, en las líneas celulares en estudio.

Para esto, las células fueron sembradas en medio completo durante 48 horas, y pasado este tiempo se realizaron los siguientes tratamientos durante 4 horas en medio sin suero: Control, CHX (5  $\mu\text{g/ml}$ ), MG-132 (20  $\mu\text{M}$ ) y CHX + MG-132. Finalizado el tratamiento correspondiente, se obtuvieron los lisados celulares y se determinaron los niveles de ACSL4 por western blot (Figura 24).

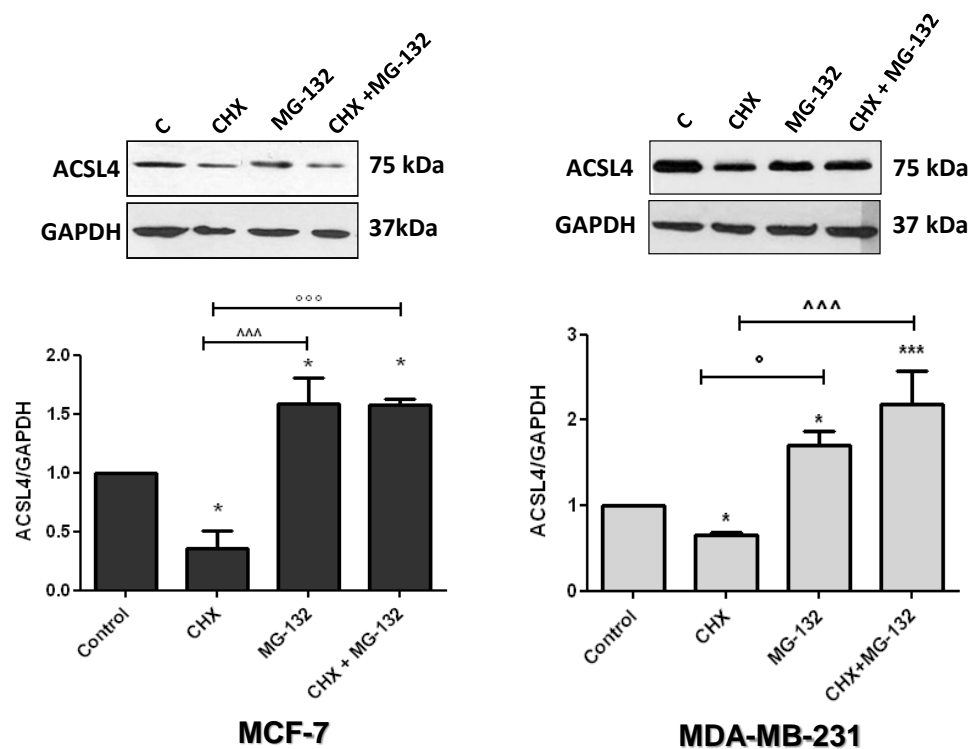


Figura 24. Determinación del rol del proteasoma en la estabilidad de ACSL4 en líneas tumorales de mama. Células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron incubadas durante 4 h con CHX (5



µg/ml), MG-132 (µM), CHX + MG, o sin tratamiento (control). Pasadas las 4 h se obtuvieron los lisados celulares y se midieron los niveles de ACSL4 por western blot. Los resultados se expresan como los niveles densitométricos de ACSL4/GAPDH expresados como veces de cambio respecto del control. ANOVA seguido de test a posteriori de Tukey, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En los resultados obtenidos observamos un aumento significativo en los niveles de ACSL4 luego del tratamiento con MG-132 respecto del control y respecto del tratamiento con CHX en ambas líneas tumorales. Estos resultados demuestran que el proteasoma estaría involucrado en la vía de degradación de ACSL4.

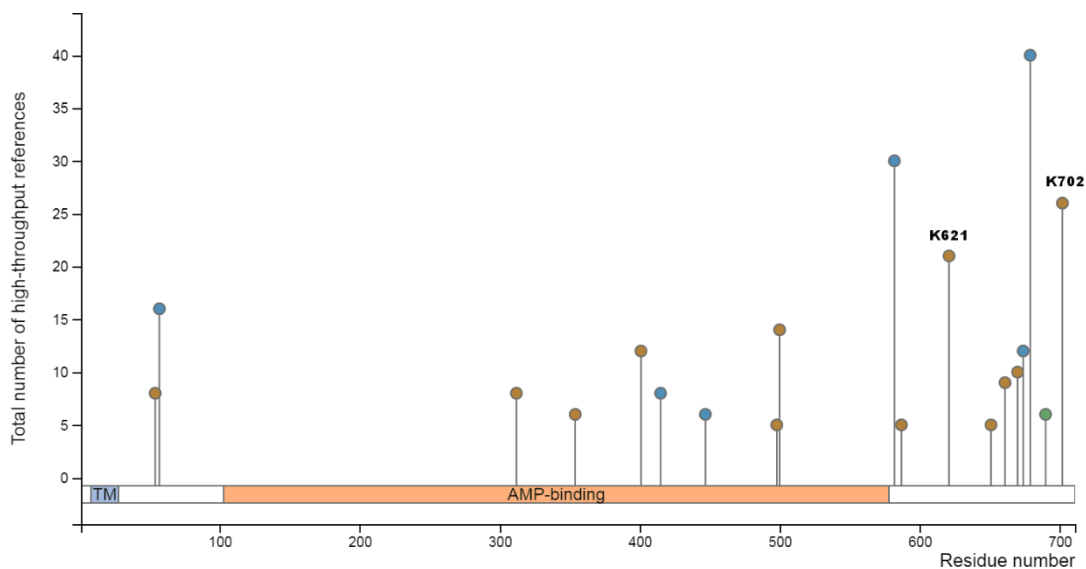
#### **A.4. Estudio de modificaciones post-traduccionales de ACSL4**

Dado los resultados obtenidos, que indican que ACSL4 se ubiquitina y que previamente ya se ha descrito su ubiquitinación en células de tumor hepatocelular<sup>164</sup>, con el objetivo de profundizar el rol del proteasoma en la degradación de ACSL4 estudiamos el mecanismo de ubiquitinación como posible modificación post-traduccionales de esta enzima en células de cáncer de mama. Para ello, decidimos mapear los aminoácidos blanco de dicha modificación a través de la realización de mutaciones sitio dirigidas sobre ACSL4. Por lo tanto, con el fin de determinar los posibles sitios a mutar, utilizamos la base de datos Phosphosite (<http://www.phosphosite.org>). Esta base de datos provee información sobre estudios ya realizados de proteómica por espectrometría de masas permitiendo obtener diferentes sitios de ACSL4 que serían blanco de modificaciones post-traduccionales con una alta probabilidad, basándose en los registros existentes.

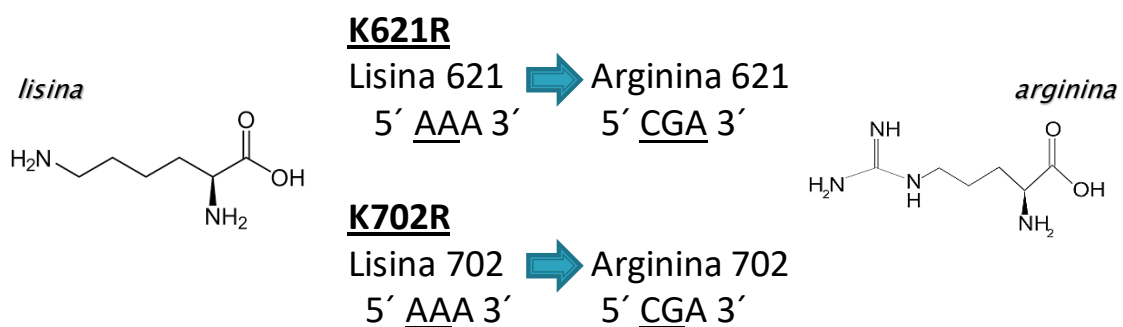
La búsqueda de sitios de ubiquitinación en la base de datos Phosphosite arrojó como posibles aminoácidos blanco la lisina 621 (K621) y la lisina 702 (K702) (Figura 25). Dichos aminoácidos fueron seleccionados para realizar las mutaciones sitio dirigidas que nos permitieron estudiar si la degradación proteasomal está involucrada en la estabilidad de ACSL4.

El siguiente paso fue la elección del aminoácido que reemplazaría a las lisinas. Esta elección se realizó en base a la lectura de extensa bibliografía<sup>252,253</sup> donde encontramos que, en general, cuando se realizan mutaciones sitio dirigidas, se sustituye al aminoácido lisina (K) por el aminoácido arginina (R) debido a la similitud de ambos aminoácidos y sus características. Por ende, las mutaciones que realizamos en ACSL4

fueron el cambio de aminoácidos de lisina 702 a arginina 702 (K702R) y de lisina 621 a arginina 621 (K621R). Para realizar estos cambios se analizaron los codones blanco a modificar en la secuencia nucleotídica de ACSL4 y, por lo tanto, las bases a mutar (Figura 26). Dichas mutaciones nos permitieron luego evaluar la estabilidad de la proteína.



**Figura 25. Modificaciones postraduccionales de ACSL4.** La imagen presentada fue obtenida del sitio phosphosite.org y muestra las modificaciones postraduccionales que podrían suceder sobre ACSL4 con una alta probabilidad. Estas modificaciones están representadas como círculos azules (sitios de fosforilación), círculos verdes (sitios de acetilación) y círculos amarillos (sitios de ubiquitinación). Los datos representan el número de registros reportados (mayor a 5) en los que se asignó este sitio de modificación utilizando espectrometría de masas de alto rendimiento.



**Figura 26. Mutaciones sitio dirigidas a realizar sobre ACSL4.** Imagen representativa donde se muestra las mutaciones puntuales que se realizaron sobre ACSL4.

### **A.5. Obtención de mutaciones sitio dirigidas en las lisinas de ACSL4 posibles blancos de ubiquitinación**

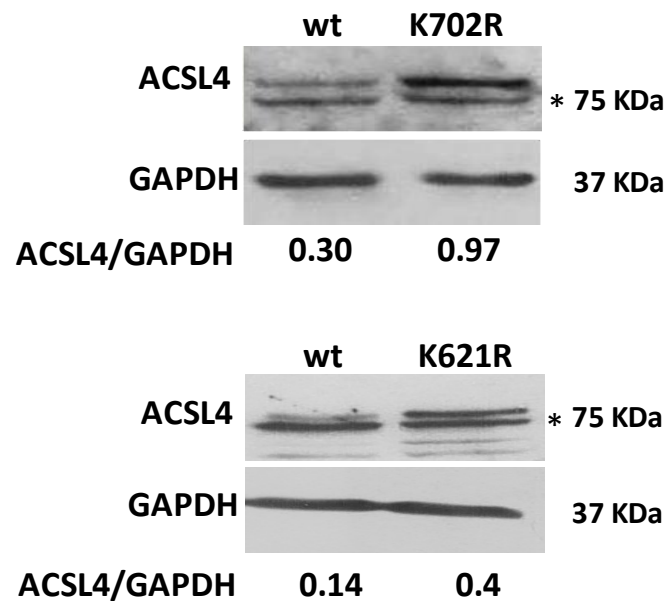
Para llevar a cabo las mutaciones sitio dirigidas sobre ACSL4 utilizamos el vector pCMV6-Entry que contiene clonada la construcción DDK (FLAG)–ACSL4 (FACL4 (ACSL4) Human Tagged ORF Clone (como se describe en Mat. y Met). Este vector fue seleccionado en particular debido a que al poseer en la construcción un FLAG como etiqueta nos permitió detectar a la proteína en todos los experimentos donde utilizamos las respectivas construcciones. A continuación, se diseñaron cebadores específicos utilizando las indicaciones del kit Quick Change II Site- Directed Mutagenesis (ver Tabla 4). Los cebadores diseñados fueron utilizados en combinación con cebadores externos (VP 1.5 y XL39) complementarios a la secuencia del vector y una modificación con tres PCRs de la técnica de Megaprimers.

Para verificar si los cambios de los nucleótidos introducidos estaban presentes las construcciones obtenidas para ambas mutaciones fueron secuenciadas mediante el servicio *Macrogen Online Sequencing Order System* (Seul, Corea del Sur). Todas las mutaciones fueron incorporadas exitosamente. Todos los procedimientos se explican en detalle en materiales y métodos.

### **A.6. Efecto de las mutaciones sitio dirigidas en las lisinas 702 y 621 de ACSL4 sobre los niveles de expresión de la proteína en células de cáncer de mama**

Para corroborar si las mutaciones obtenidas en las lisinas sugeridas como sitios de ubiquitinación K702R y K621R afectan la estabilidad de ACSL4 realizamos transfecciones transitorias de dichas construcciones y de ACSL4 *wild type* (wt) en la línea celular MCF-7. Utilizamos esta línea celular dado que ya hemos demostrado que ACSL4 posee menor estabilidad en comparación con la línea MDA-MB-231 y que, a su vez, posee una menor expresión basal de ACSL4.

Para esto, las células MCF-7 fueron sembradas en placas de 24 pocillos y fueron transfectadas durante 6 horas con los vectores FLAG-ACSL4 wt, FLAG-K702R y FLAG-K621R respectivamente utilizando Lipofectamina 2000 (como se describe en Mat. y Met.). Luego de 6 horas de transfección, las células fueron cultivadas en medio completo durante 48 horas, posteriormente se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron para la expresión de ACSL4 por western blot (Figura 27).



**Figura 27. Efectos de la mutación sitio dirigida de las lisinas 621 y 702 en los niveles de expresión de ACSL4.** Las lisinas 621 y 702 correspondientes a la secuencia de ACSL4 fueron mutadas al aminoácido arginina. Las mutantes fueron denominadas K621R y K702R respectivamente. Células de la línea MCF-7 fueron transfectadas con los vectores FLAG-ACSL4 wild type (wt), FLAG-K621R o FLAG-K702R respectivamente. Los lisados totales fueron analizados por WB con el anticuerpo policlonal anti-ACSL4. Los resultados se expresan como la relación ACSL4/GAPDH de las bandas correspondientes a FLAG-K702R y FLAG-K621R. Los asteriscos (\*) indican los niveles de ACSL4 endógena de las células.

Observamos un aumento en los niveles de expresión de ACSL4 con la incorporación de las mutaciones en los residuos de lisinas, tanto en la 621 como en la 702. En ambos casos se observó una mayor señal por western blot con respecto de ACSL4 wt, en las células de la línea MCF-7. La mutación de la lisina 621 provoca un aumento de la señal de ACSL4 de 3 veces y la de la lisina en 702, un aumento de 2,6 veces aproximadamente, sugiriendo un importante rol de estos aminoácidos en la estabilidad de la proteína.

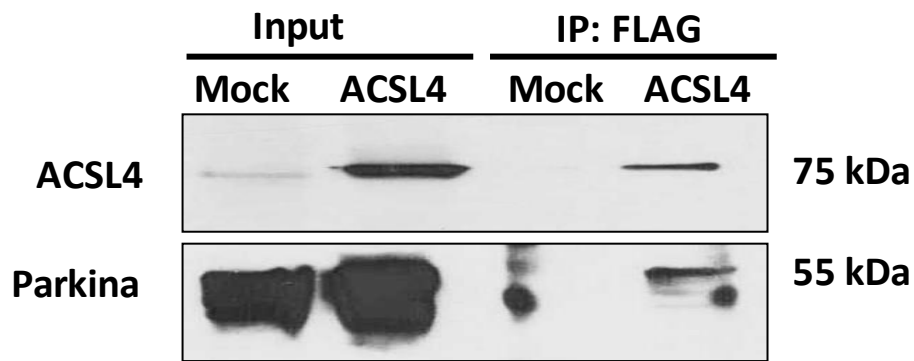
## **A.7. Estudio de la interacción de ACSL4 con la E3-RBR- ubiquitina ligasa Parkina**

En el año 2013, Sarraf y colaboradores<sup>177</sup> demostraron a través de estudios de proteómica de interacción complementaria, que ACSL4 podría ser un potencial sustrato de ubiquitinación de la E3-ubiquitin ligasa Parkina en células HeLa de cáncer cervicouterino y en la línea SH-SY5Y de neuroblastoma, sugiriendo, por lo tanto, una posible interacción entre Parkina y ACSL4 en distintos tipos de cáncer<sup>177</sup>.

Parkina es una E3-RBR- ubiquitina ligasa codificada por el gen PARK2 y se encuentra alterada en muchos tipos de tumores humanos. Esta enzima juega un papel importante en la regulación de la homeostasis mitocondrial y la mitofagia. En condiciones donde se rompe la homeostasis mitocondrial tras un evento de despolarización, Parkina, que se encuentra inactiva en el citosol, viaja a la mitocondria en donde se activa y ubiquitina sustratos en la membrana externa mitocondrial lo que desencadena posteriormente el mecanismo de la mitofagia<sup>170,177</sup>.

Por lo tanto, en base a los antecedentes mencionados y los resultados obtenidos, decidimos evaluar si existe una interacción entre ACSL4 y Parkina. Para esto, utilizamos las células HEK293 ya que las mismas muestran una alta eficiencia de transfección y son de fácil manipulación, lo que hace que sean utilizadas mayormente para identificar interacción entre proteínas. Las células fueron co-transfectadas con las construcciones FLAG-ACSL4 wt y HA-Parkina (sobrexpresión de Parkina con la etiqueta HA) o con el vector vacío solo con FLAG (Mock) utilizando Lipofectamina 2000 durante 6h. Luego de 48 h post- transfección se recolectaron las células y se realizó una inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo anti-FLAG.

La muestra obtenida por IP fue analizada por western blot y revelada con anti-ACSL4 y con anti-Parkina respectivamente para observar la existencia o no de interacción entre ambas proteínas (Figura 28).



**Figura 28.** La E3- RBR- ubiquitina ligasa Parkina interacciona con ACSL4 y estaría involucrada en su ubiquitinación en células HEK293. Células de la línea HEK293 fueron co-transfectadas con los vectores HA-Parkina y FLAG-ACSL4 o con el vector conteniendo el FLAG únicamente utilizado como control (Mock). Se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpo anti-FLAG. Se obtuvo el lisado total (input) y la fracción inmunoprecipitada (IP) y se analizó por western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-ACSL4 o monoclonal anti-Parkina respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran que, efectivamente, existe una interacción entre Parkina y ACSL4. Debido a esto, resulta de nuestro interés poder profundizar, a futuro, en el estudio de esta interacción en modelos de cáncer de mama de agresividad diferencial.

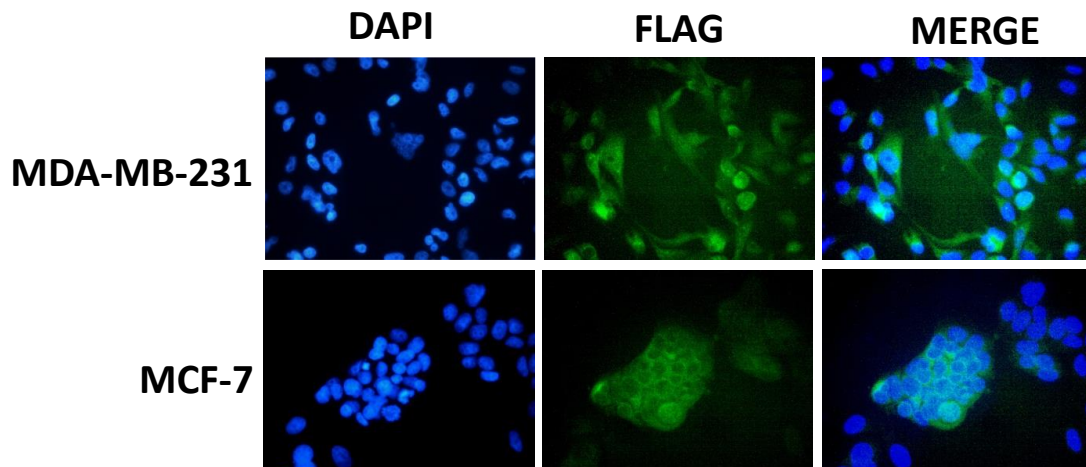
#### **A.8. Construcción de líneas estables de cáncer de mama para FLAG-ACSL4**

La generación de líneas estables para la construcción FLAG-ACSL4 en líneas de cáncer de mama de diferente agresividad se realizó con el fin de estudiar en profundidad, y con un sistema de más fácil manipulación, las posibles modificaciones post-traduccionales de ACSL4 así como también la interacción de ACSL4 con otras proteínas que podrían o no afectar su estabilidad.

Para realizar la transfección estable, las células de la línea MCF-7 y MDA-MB-231 fueron sembradas y crecidas en medio completo durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 95%. Luego, las células fueron transfectadas como se detalla en la sección de materiales y métodos. Tras 48 horas post- transfección, las células fueron seleccionadas durante un mes con el antibiótico G-418. Pasado el período de selección, se continuó el cultivo en medio completo sin G-418. La expresión de FLAG- ACSL4 fue

corroborada tanto en la línea MDA-MB-231 como en la línea MCF-7 inmunocitoquímica de fluorescencia (Figura 29) utilizando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

Se pudieron obtener de manera eficiente líneas estables de cáncer de mama para la expresión de ACSL4 tal como se muestra en la figura 29.



**Figura 29. Transfección estable con la construcción FLAG- ACSL4 en las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.** Las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 fueron transfectadas con el vector conteniendo la secuencia de la enzima ACSL4 etiquetada con FLAG (líneas estables) Luego de 6 horas de transfección las células fueron pasadas a medio completo durante 48 horas. Posteriormente, las células fueron seleccionadas para generar líneas estables con el antibiótico G-418 durante un mes. La expresión de FLAG se midió por inmunocitoquímica de fluorescencia utilizando el anticuerpo anti-FLAG monoclonal de Origine.

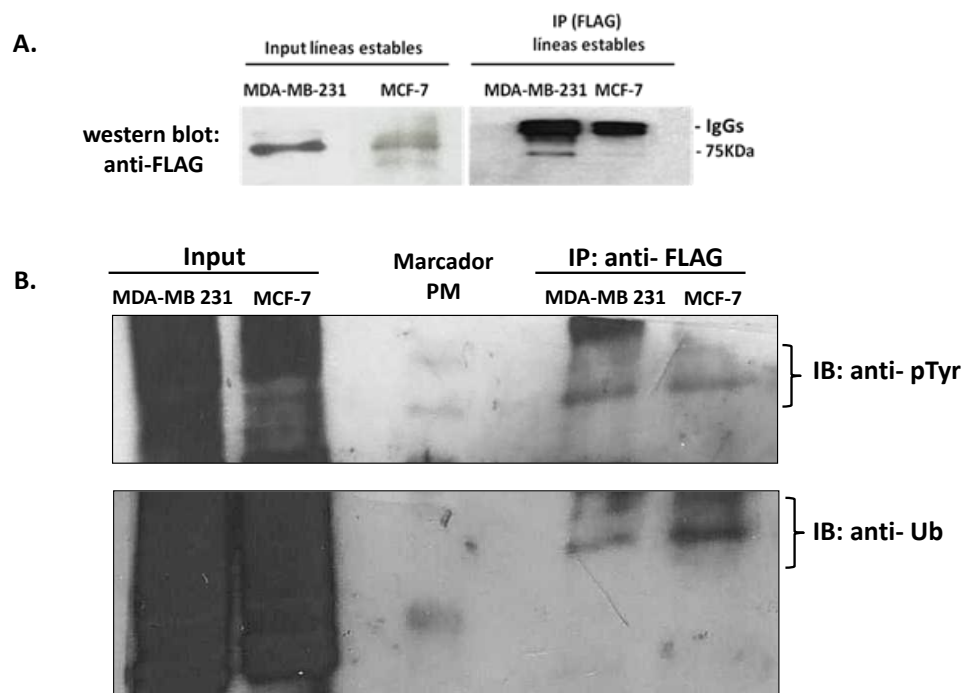
### **A.9. Análisis de fosforilación en tirosina y de ubiquitinación de ACSL4 en líneas de cáncer de mama**

En función a la información obtenida en la base de datos Phosphosite para analizar las posibles modificaciones post-traduccionales de ACSL4, pudimos observar que, además de ser ubiquitinada, ACSL4 podía ser blanco de fosforilación. Los aminoácidos blanco de fosforilación son distintas serinas y tirosinas presentes en la proteína, y entre ellas como fue mencionado más arriba, la Tyr 582.

El siguiente objetivo fue comprobar si efectivamente existe fosforilación en tirosina de ACSL4 y comprobar también la ubiquitinación de dicha proteína utilizando las líneas estables de cáncer de mama construidas previamente. Nuestro objetivo consistió en mapear a través de un análisis de espectrometría de masas del tipo

MALDITOF MS/MS los sitios modificados post-traduccionalmente en la enzima. En los experimento de mapeo de sitios, la proteína purificada se digiere con una proteasa que corta en sitios definidos para producir péptidos pequeños. La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) mide masas de péptidos intactos y fragmentos de masas de iones. Los algoritmos informáticos luego identifican los péptidos al hacer coincidir estos datos experimentales con los espectros teóricos derivados de las bases de datos de secuencias.

Para cumplir con este objetivo, se puso a punto la inmunoprecipitación (IP) con anti-FLAG en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 estables para la expresión de FLAG-ACSL4 (Figura 30, panel A). El objetivo de esta IP fue lograr obtener la proteína FLAG-ACSL4 purificada para luego poder analizar esta muestra a través de MALDITOF MS/MS. Una vez realizada la IP se analizó el material inmunoprecipitado por western blot para detectar la presencia de FLAG-ACSL4 (Figura 30, panel A). Además, analizamos la muestra inmunoprecipitada con anticuerpos anti-Ubiquitina y anti-fosfotirosina (pTyr) en ambas líneas celulares, utilizando como control la señal de anti-FLAG obtenida (Figura 30, panel B).



**Figura 30. Estudio de la fosforilación y ubiquitinación de ACSL4 en células de cáncer de mama.** Se realizó una IP con anti-FLAG a células MCF-7 y MDA-MB- 231 estables para la expresión de FLAG-ACSL4. Seguido a la IP se realizó un western blot (A) con anti- FLAG (control) y con anti- pTyr y anti- Ub (B). Todos los resultados fueron enfrentados al lisado total (input).



A través del análisis por western blot se pudo observar que en ambas líneas celulares se pudo inmunoprecipitar a la proteína FLAG-ACSL4, observando mayor señal en la línea MDA-MB-231. Observamos también, a la misma altura de FLAG-ACSL4, una banda en ambas líneas celulares cuando se analizó la muestra con el anticuerpo anti-ubiquitina o anti-fosfotirosina indicando que la enzima sería modificada post-traduccionalmente. La señal de quimioluminiscencia observada fue más fuerte en la línea MCF-7, lo que nos podría indicar que ACSL4 posee una mayor ubiquitinación en esta línea celular, lo que iría en línea con su menor estabilidad en estas células en comparación a la línea MDA-MB-231 de mayor agresividad. A su vez pudimos confirmar que ACSL4 se fosforilaría en tirosina en ambas líneas de cáncer de mama.

Para confirmar estos resultados la muestra obtenida fue analizada mediante MALDITOF MS/MS en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, IQIBICEN-CONICET ([www.qb.fcen.uba.ar/cequibiem](http://www.qb.fcen.uba.ar/cequibiem)). El resultado de este análisis corroboró la presencia de la proteína FLAG-ACSL4, al detectar péptidos de la enzima presentes en la muestra. Lamentablemente, no se pudieron obtener resultados que nos permitieran analizar los sitios de fosforilación o ubiquitinación. Para completar el mapeo de estos sitios se necesitan más estudios a futuro, mejorando la obtención de la muestra a analizar. Para esto se deberá enriquecer la muestra en la proteína FLAG-ACSL4 partiendo, por ejemplo, de un número mayor de células, realizando un enriquecimiento en la proteína fosforilada a través de una segunda inmunoprecipitación con anti- fosfotirosina, o tratando a las células con MG- 132 para enriquecer la muestra en la proteína ubiquitinada.

## **B. Análisis del rol de ACSL4 sobre el metabolismo mitocondrial: estudio de mitofagia y bioenergética mitocondrial**

Las mitocondrias son organelas dinámicas que responden al estrés celular a través de cambios en la masa global, la interconexión y la localización subcelular <sup>254</sup>. Actualmente, está claro que las mitocondrias juegan un papel clave en la oncogénesis <sup>211</sup>. En particular, se demostró que, en cáncer de mama, estas organelas pueden reprogramarse para modular el progreso y agresividad del tumor <sup>211,254</sup>. Por lo tanto, es fundamental profundizar en el conocimiento de la regulación de los niveles de expresión

de esta enzima en células de cáncer de mama y su rol en el metabolismo y bioenergética mitocondrial.

En esta parte del trabajo, se procedió a estudiar si distintos procesos celulares usualmente alterados en tumores, tales como la función y la bioenergética mitocondrial, están regulados por la actividad y/o expresión de ACSL4 en células de cáncer de mama.

Para la realización de estos estudios se utilizaron las siguientes líneas de cáncer de mama: MCF-7 tet-off/ACSL4 y MCF-7 tet-off control, línea estable diseñada en nuestro laboratorio en las cuales ACSL4 está sobreexpresada constitutivamente (como se indica en Mat. y Met.) y las líneas de cáncer de mama MDA-MB- 231 con expresión constitutiva de un shRNA anti-ACSL4 (shACSL4) y su respectivo control (shControl) (según se indica en Mat. y Met.).

### **B.1. Análisis *in silico* del rol de ACSL4 en el metabolismo mitocondrial**

Unos años antes del desarrollo de esta tesis, en nuestro laboratorio fue realizado un estudio de RNA-Seq de las células MCF-7 tet-off/ACSL4 y MCF-7 tet-off control<sup>152</sup>. Utilizando los datos obtenidos del RNA-Seq analizamos las vías y proteínas involucradas en las funciones mitocondriales, que potencialmente podrían estar reguladas por ACSL4, través de un nuevo análisis utilizando el sistema IPA. A través de este análisis pudimos observar las principales vías canónicas que serían reguladas por ACSL4 entre las cuales se observan funciones relacionadas con procesos mitocondriales tales como la fosforilación oxidativa y la disfunción mitocondrial (Tabla 5). A partir de este análisis logramos también encontrar ARN mensajeros (ARNm) claves relacionados con el metabolismo mitocondrial que están involucrados en estas vías canónicas y cuya expresión es afectada por el aumento en los niveles de ACSL4, de los cuales algunos fueron seleccionados para ser estudiados en esta tesis doctoral.

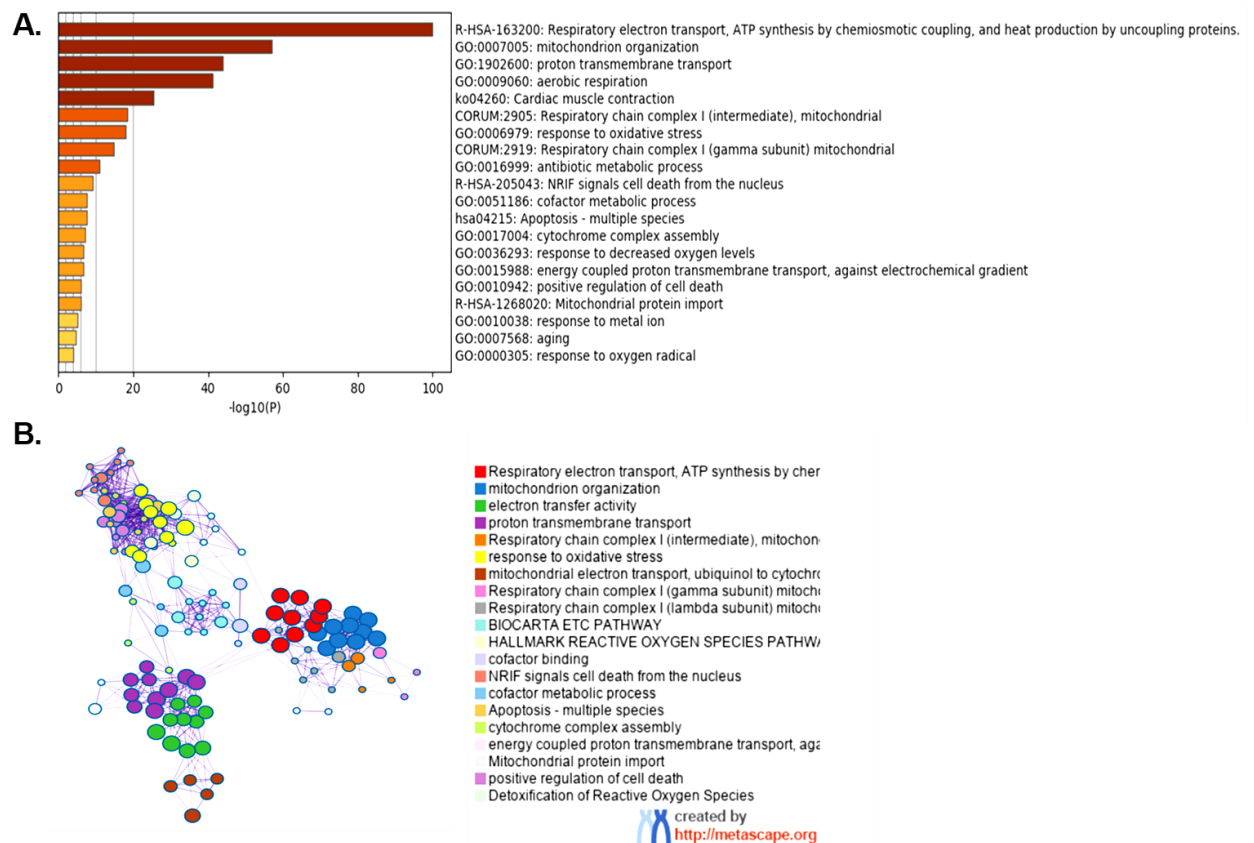
Ingenuity Canonical Pathways	-log (valor p)	Genes afectados
<b>Vía de señalización de EIF2</b>	4,55E+01	AGO2,AKT1,AKT2,ATF4,ATF5,CDK11A,EIF1,EIF1AX,EIF2B1,EIF2B2,EIF2B4,EIF2S1,EIF2S3,EIF3A,EIF3D,EIF3E,EIF3F,EIF3G,EIF3H,EIF3I,EIF3J,EIF3L,EIF3M,EIF4A1,EIF4A2,EIF4A3,EIF4G3,EIF5,EIF5B,GRB2,GSK3B,HNRNPA1,HRAS,HSPA5,MAPK1,MYC,PABPC1,PAIP1,PIK3C2A,PIK3R2,PPP1CB,PPP1CC,PTBP1,RALB,RAP1B,RASD1,RPL10,RPL10A,RPL11,RPL12,RPL13,RPL13A,RPL14,RPL15,RPL17,RPL18,RPL18A,RPL19,RPL21,RPL22,RPL22L1,RPL23,RPL23A,RPL24,RPL26,RPL26L1,RPL27,RPL27A,RPL28,RPL29,RPL3,RPL30,RPL31,RPL32,RPL34,RPL35,RPL35A,RPL36,RPL36AL,RPL37,RPL37A,RPL38,RPL39,RPL4,RPL41,RPL5,RPL6,RPL7,RPL7A,RPL8,RPL9,RPLP0,RPLP1,RPLP2,RPS10,RPS11,RPS12,RPS14,RPS15,RPS16,RPS17,RPS18,RPS19,RPS2,RPS20,RPS21,RPS23,RPS24,RPS25,RPS26,RPS27,RPS27A,RPS28,RPS3,RPS3A,RPS4X,RPS5,RPS6,RPS7,RPS8,RPS9,RPSA,SREBF1,TRIB3,VEGFA,XIAP
<b>Vía de ubiquitinación de proteínas</b>	2,41E+01	ANAPC11,ANAPC2,ANAPC5,B2M,BAG1,BAP1,CDC23,CDC34,CUL1,CUL2,DNAJA1,DNAJB1,DNAJB11,DNAJB2,DNAJB6,DNAJC1,DNAJC11,DNAJC15,DNAJC19,DNAJC2,DNAJC21,DNAJC22,DNAJC25,DNAJC30,DNAJC5,DNAJC7,DNAJC9,HLA-B,HLA-E,HSP90AA1,HSP90AB1,HSP90B1,HSPA1A/HSPA1B,HSPA4,HSPA5,HSPA8,HSPA9,HSPB1,HSPB11,HSPB8,HSPD1,HSPE1,HSPH1,PSMA3,PSMA4,PSMA5,PSMA7,PSMB1,PSMB10,PSMB2,PSMB3,PSMB4,PSMB5,PSMB6,PSMB7,PSMC1,PSMC2,PSMC3,PSMC5,PSMC6,PSMD1,PSMD10,PSMD12,PSMD13,PSMD3,PSMD4,PSMD5,PSMD6,PSMD9,PSME1,PSME2,RBX1,RPS27A,SUGT1,THOP1,UBA1,UBB,UBE2A,UBE2B,UBE2C,UBE2D1,UBE2D2,UBE2D3,UBE2E1,UBE2E3,UBE2G1,UBE2H,UBE2J1,UBE2J2,UBE2K,UBE2L3,UBE2L6,UBE2N,UBE2Q1,UBE2Q2,UBE2T,UBE2Z,UBE3A,USP1,USP11,USP14,USP15,USP22,USP32,USP34,USP39,USP48,USP5,USP8,VHL,XIAP
<b>Vía de señalización de Sirtuina</b>	2,31E+01	ACLY,AGTRAP,AKT1,APEX1,ATG101,ATG12,ATG13,ATG16L1,ATG3,ATG7,ATP5F1A,ATP5F1B,ATP5F1C,ATP5F1D,ATP5F1E,ATP5MC1,ATP5PB,ATP5PF,BECN1,CDH1,CRTC2,CYC1,E2F1,GABARAP,GOT2,GSK3B,GTF3C2,H1-10,H1-2,H3-3A/H33B,H4C11,HSF1,IDH2,JUN,KAT2A,MAP1LC3B,MAPK1,MT-CYB,MT-ND1,MT-ND2,MT-ND3,MT-ND4,MTND5,MYC,NBN,NDUFA1,NDUFA2,NDUFA4,NDUFA5,NDUFA6,NDUFA7,NDUFA8,NDUFB11,NDUFB3,NDUFB4,NDUFB6,NDUFB7,NDUFB8,NDUFB9,NDUFS2,NDUFS5,NDUFS6,NDUFS7,NDUFV2,NFKB2,NR1H2,OGG1,PARP1,PDHA1,PFKFB3,PGAM1,PGK1,POLR1B,POLR1D,POLR1E,POLR2F,PPID,PIIF,PRKAA1,PRKDC,RRP9,SDHA,SDHB,SDHC,SF3A1,SIRT7,SLC25A4,SLC25A5,SLC25A6,SLC2A1,SMARCA5,SOD1,SP1,SREBF1,STAT3,STK11,TIMM10,TIMM17B,TIMM44,TIMM8A,TOMM20,TOMM7,TOMM70,TP53,TRIM28,TSPO,TUBA1A,TUBA1B,TUBA1C,UCP2,VDAC1,VDAC3,XRCC5,XRCC6
<b>Fosforilación Oxidativa (OXPHOS)</b>	2,31E+01	ATP5F1A,ATP5F1B,ATP5F1C,ATP5F1D,ATP5F1E,ATP5MC1,ATP5MC2,ATP5MC3,ATP5MF,ATP5PB,ATP5PD,ATP5PF,ATPAF1,COX11,COX15,COX17,COX4I1,COX5A,COX5B,COX6A1,COX7A2L,COX7B,COX7B2,COX7C,CYC1,MT-CO1,MT-CO2,MT-CYB,MT-ND1,MT-ND2,MT-ND3,MT-ND4,MTND5,NDUFA1,NDUFA2,NDUFA4,NDUFA5,NDUFA6,NDUFA7,NDUFA8,NDUFB11,NDUFB3,NDUFB4,NDUFB6,NDUFB7,NDUFB8,NDUFB9,NDUFS2,NDUFS5,NDUFS6,NDUFS7,NDUFV2,SDHA,SDHB,SURF1,UQCR10,UQCR11,UQCRB,UQCRC1,UQCRH,UQCRQ
<b>Disfunción mitocondrial</b>	2,28E+01	ACO2,AIFM1,APH1A,ATP5F1A,ATP5F1B,ATP5F1C,ATP5F1D,ATP5F1E,ATP5MC1,ATP5MC2,ATP5MC3,ATP5MF,ATP5PB,ATP5PD,ATP5PF,ATPAF1,COX11,COX15,COX17,COX4I1,COX5A,COX5B,COX6A1,COX7A2L,COX7B,COX7B2,COX7C,CYB5R3,CYC1,FURIN,GLRX2,GPX4,HSD17B10,HTRA2,MAPK8,MT-CO1,MT-CO2,MT-CYB,MT-ND1,MT-ND2,MT-ND3,MT-ND4,MT-ND5,NCSTN,NDUFA1,NDUFA2,NDUFA4,NDUFA5,NDUFA6,NDUFA7,NDUFA8,NDUFB11,NDUFB3,NDUFB4,NDUFB6,NDUFB7,NDUFB8,NDUFB9,NDUFS2,NDUFS5,NDUFS6,NDUFS7,NDUFV2,PARK7,PDHA1,PRDX3,PSEN1,SDHA,SDHB,SDHC,SURF1,TXN2,UCP2,UQCR10,UQCR11,UQCRB,UQCRC1,UQCRH,UQCRCQ,VDAC1,VDAC3
<b>Regulación de eIF4 Vía de p70SK6</b>	1,83E+01	AGO2,AKT1,AKT2,EIF1,EIF1AX,EIF2B1,EIF2B2,EIF2B4,EIF2S1,EIF2S3,EIF3A,EIF3D,EIF3E,EIF3F,EIF3G,EIF3H,EIF3I,EIF3J,EIF3L,EIF3M,EIF4A1,EIF4A2,EIF4A3,EIF4EBP1,EIF4EBP2,EIF4G3,GRB2,HRAS,IRS1,ITGA3,ITGB4,ITGB5,MAPK1,MKNK1,PABPC1,PAIP1,PAIP2,PIK3C2A,PIK3R2,PPP2R2A,PTPA,RALB,RAP1B,RASD1,RPS10,RPS11,RPS12,RPS14,RPS15,RPS16,RPS17,RPS18,RPS19,RPS2,RPS20,RPS21,RPS23,RPS24,RPS25,RPS26,RPS27,RPS27A,RPS28,RPS3,RPS3A,RPS4X,RPS5,RPS6,RPS6KB1,RPS7,RPS8,RPS9

<b>Vía de mTOR</b>	1,56E+01	AKT1,AKT1S1,AKT2,ARHGAP8/PRR5,ARHGAP8,ATG13,CDC42,DDIT4,DGKZ,EIF3A,EIF3D,EIF3E,EIF3F,EIF3G,EIF3H,EIF3I,EIF3J,EIF3L,EIF3M,EIF4A1,EIF4A2,EIF4A3,EIF4B,EIF4EBP1,EIF4G3,FKBP1A,HRAS,IRS1,MAPK1,MAPKAP1,PIK3C2A,PIK3R2,PPP2R2A,PRKA A1,PRKAB1,PRKCD,PTPA,RAC3,RALB,RAP1B,RASD1,RHEB,RHOA,RHOB,RHOF,RHOQ,RND1,RPS10,RPS11,RPS12,RPS14,RPS15,RPS16,RPS17,RPS18,RPS19,RPS2,RPS20,RPS21,RPS23,RPS24,RPS25,RPS26,RPS27,RPS27A,RPS28,RPS3,RPS3A,RPS4X,RPS5,RPS6,RPS6KA1,RPS6KB1,RPS7,RPS8,RPS9,RPSA,STK11,TSC2,ULK1,VEGF
<b>Señalización por hipoxia en el sistema cardiovascular</b>	1,33E+01	AKT1,ARNT,ATF4,CDC34,COP55,CREB3,CREB3L4,CSNK1D,HSP90AA1,HSP90AB1,HSP90B1,JUN,NFKBIA,P4HB,PTEN,SUMO1,TP53,UBE2A,UBE2B,UBE2C,UBE2D1,UBE2D2,UBE2D3,UBE2E1,UBE2E3,UBE2G1,UBE2H,UBE2J1,UBE2J2,UBE2K,UBE2L3,UBE2L6,UBE2N,UBE2Q1,UBE2Q2,UBE2T,UBE2Z,VEGFA,VHL
<b>Vía de NER</b>	1,28E+01	CCNH,CETN2,CHAF1B,COPS3,COPS5,COPS6,COPS7A,COPS8,CUL4A,DDB1,ERCC1,ERC3,GPS1,GTF2H1,GTF2H4,H3-3A/H33B,H4C11,H4C14,H4C15,LIG1,PCNA,POLD1,POLD2,POLD3,POLE,POLE3,POLE4,POLR2A,POLR2B,POLR2D,POLR2E,POLR2F,POLR2J,POLR2K,POLR2L,RAD23B,RBX1,RFC1,RFC2,RFC3,RFC5,RPA1,RPA2,SLC19A1,TOP2B,UBE2N,XRCC1
<b>Vía de HER-2 en cáncer de mama</b>	1,04E+01	AKT1,AKT1S1,AKT2,ARAF,AREG,ARF1,ARF4,ARF5,ARF6,BIRC5,CASP6,CCNE2,CDC42,CDK4,CDKN1A,CDKN1B,CHUK,COP56,COX11,COX15,COX17,COX4I1,COX5A,COX5B,COX6A1,COX7A2L,COX7B,COX7B2,COX7C,ELF1,ELK1,ERBB2,ERBB3,GRB2,GSK3B,HRAS,IKBKG,ITGB4,ITGB5,JUN,KPNB1,MAPK1,MT-CO1,MT-CO2,MYC,NFKB2,NFKBIA,PARD6B,PIK3C2A,PIK3R2,PLCG1,PRKCD,PTEN,RALB,RAP1B,RASD1,RHEB,RPS6,RPS6KB1,SMAD3,SP1,STAT3,SURF1,TP53,TSC2,XIAP

**Tabla 5. Vías canónicas de señalización afectadas por la sobreexpresión de ACSL4 en células de cáncer de mama.** El análisis del RNA-seq en células que sobreexpresan ACSL4 mediante el análisis de IPA arrojó como resultado distintas vías canónicas celulares afectadas por la sobreexpresión de ACSL4. Se observa que ACSL4 ejerce una regulación en vías relacionadas a la ubiquitinación, la fosforilación oxidativa y la disfunción mitocondrial entre otras. Este análisis nos permitió encontrar transcritos relacionados al metabolismo y función mitocondrial afectados por ACSL4.

Utilizamos el programa Metascape <sup>251</sup> para visualizar las vías canónicas y funciones en las cuales participan los genes mitocondriales afectados por la expresión de ACSL4. A través de este análisis, se identificaron los términos enriquecidos estadísticamente (pueden ser términos GO / KEGG, vías canónicas, conjuntos de genes de marca distintiva, etc.). Se calcularon los valores p hipergeométricos acumulativos y los factores de enriquecimiento y se utilizaron para el análisis. Los términos significativos se agruparon jerárquicamente en un árbol según las similitudes estadísticas de kappa entre sus miembros genéticos (similar a lo que se usa en el sitio NCI DAVID).

Luego, se aplicó una puntuación de 0,3 kappa como umbral para convertir el árbol en grupos de términos. A continuación, se seleccionó un subconjunto de términos representativos de este grupo y se construyó un diseño de red. La red se visualizó con el software Cytoscape v3.1.2 (Figura 30).



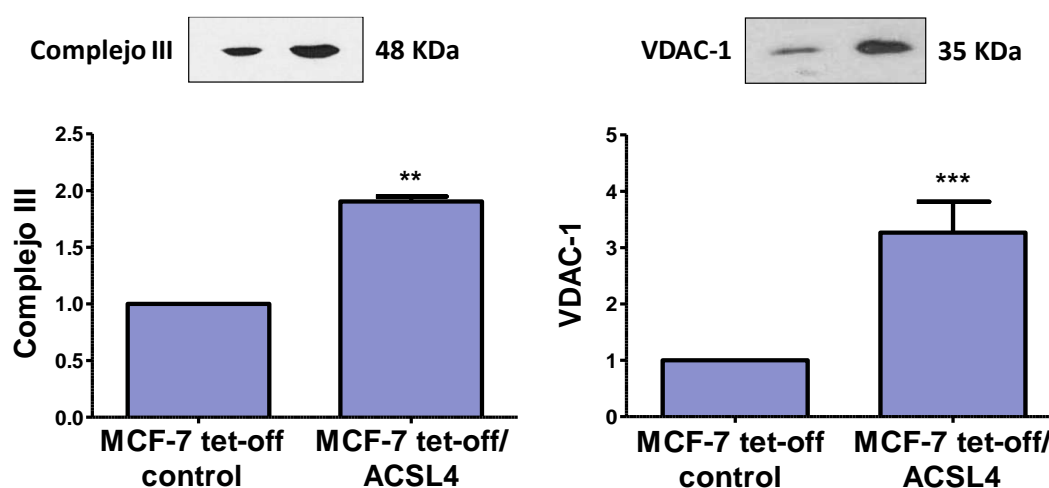
**Figura 30. Clústeres de ontología enriquecidos.** (A.) Gráfico de barras de términos enriquecidos en la lista de genes RNA-seq mitocondrial, coloreados por valores p. (B.) Visualización de resultados en forma de red. Cada término está representado por un nodo circular, donde su tamaño es proporcional al número de genes de entrada que caen en ese término, y su color representa su identidad de grupo (es decir, los nodos del mismo color pertenecen al mismo grupo). Los términos con una puntuación de similitud > 0,3 están vinculados por un borde (el grosor del borde representa la puntuación de similitud).

## B.2. Evaluación de los niveles de marcadores clásicos mitocondriales en la fracción mitocondrial de células tumorales mamarias

En base a los datos observados en el análisis por IPA decidimos estudiar la expresión por western blot de algunos de los marcadores cuyos ARNm se encontraban aumentados al sobreexpresar ACSL4 en células MCF-7 (Tabla 6). Entre los marcadores seleccionados para estudiar en la fracción mitocondrial de células de cáncer de mama se evaluó la expresión del Complejo III (CIII) de la cadena de transporte de electrones y del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC-1). Se observó un aumento significativo en la expresión proteica del Complejo III y VDAC-1 en células que sobreexpresan ACSL4 (Figura 31).

Nombre del gen	Símbolo proteína	Veces de cambio (ACSL4 respecto del control)
Ubiquinol Citocromo c Reductasa (UQCRC2)/Complejo III mitocondrial	CIII	1.2
Canal aniónico selectivo dependiente de voltaje 1	VDAC-1	2

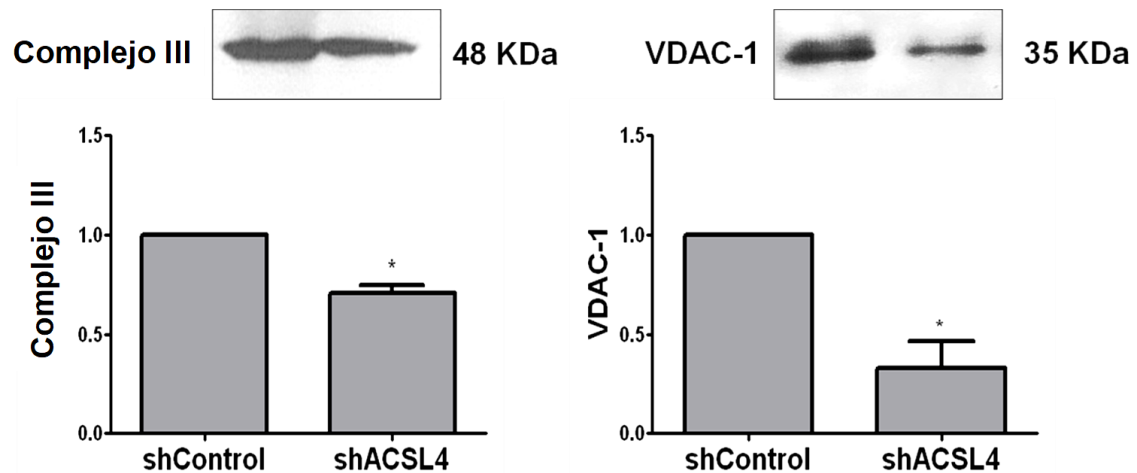
**Tabla 6.** Datos provenientes de estudios previos de RNA-Seq analizados por IPA *in silico* en células MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4. Identificación de ARNm significativamente aumentados por la sobreexpresión de ACSL4 en la línea tumoral mamaria MCF-7.



**Figura 31.** ACSL4 aumenta los niveles de expresión del Complejo III y VDAC-1 en células MCF-7 tet-off/ ACSL4. Se evaluó la expresión de marcadores mitocondriales en la fracción mitocondrial de células MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4 por western blot. Las barras representan los niveles de Complejo III y VDAC-1 respectivamente como veces de cambio respecto del control. (\*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001). Nota: se utilizó como control de carga la cantidad de proteína mitocondrial sembrada, se observó a través de tinción con rojo Ponceau.

Con el objetivo de profundizar el estudio de los marcadores mitocondriales y corroborar los resultados obtenidos; analizamos los niveles de expresión de CIII y VDAC-1 en la línea MDA-MB-231 silenciada para ACSL4 (shACSL4) y su respectivo

control (shControl). Para este estudio, se obtuvo la fracción mitocondrial de las células mencionadas y se analizaron por western blot (Figura 32).



**Figura 32. El silenciamiento de ACSL4 en células MDA-MB-231 disminuye los niveles de expresión del Complejo III y VDAC-1 en la fracción mitocondrial.** Se evaluó mediante western blot la expresión de marcadores mitocondriales en la fracción mitocondrial de células MDA-MB-231 silenciadas para ACSL4 (shACSL4) y su respectivo control de silenciamiento (shControl). Las barras representan los niveles de Complejo III y VDAC-1 respectivamente como veces de cambio respecto del control. (\* $p < 0,05$ ). Nota: se utilizó como control de carga la cantidad de proteína mitocondrial sembrada, dicha cantidad se corroboró a través de tinción con rojo Ponceau.

Pudimos observar, que, coincidiendo con los resultados obtenidos hasta el momento, la disminución de la expresión de ACSL4 a través del silenciamiento de ACSL4 con un shRNA, en células triple negativas y de mayor agresividad como lo son las MDA-MB-231, disminuye de manera significativa la expresión del Complejo III y VDAC-1 en la fracción mitocondrial.

### B.3. Análisis del Factor Respiratorio Nuclear (NRF-1) en extracto nuclear de células MCF-7 tet- off/ACSL4

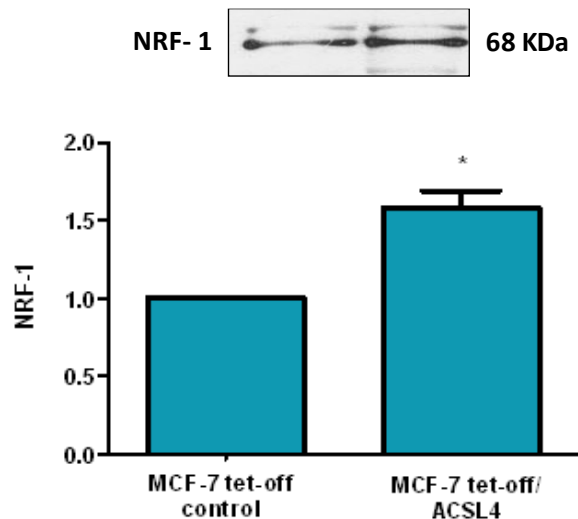
El análisis por RNA- seq realizado a células MCF-7 tet-off/ACSL4 reveló que la expresión de ACSL4 induce un aumento en el transcrito perteneciente al Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF-1) factor clave del metabolismo mitocondrial. Dentro de las funciones conocidas de NRF-1, se sabe que es un factor de transcripción capaz de activar genes clave para la respiración mitocondrial, la transcripción y la replicación del ADNmt; al mismo tiempo pudimos establecer ARNm blancos de NRF-1 e involucrados también en el metabolismo y dinámica mitocondrial que podrían ser posibles blancos de estudio a futuro. (Tabla 7).

Factor de transcripción	NRF1
Veces de Cambio	1.550
Función molecular	transcription regulator
Estado de activación predicho	Activated
Moléculas blanco en base de datos	ALAS1,CD47,COX4I1,COX5A,COX5B,COX7B,COX7C,FMR1,GCLCID,IL8,MOGS,NQO1,PPRC1,PVR,SDHA,SURF1,TFAM,TFB1M,TFB2M,TOMM20,TP53,VDAC1
z-score	3.054

**Tabla 7. Niveles de expresión de genes blanco de NRF-1 regulados por la sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7.** La tabla muestra ARNm regulados positivamente por ACSL4 y blancos del factor de transcripción NRF-1 estudiados mediante análisis IPA *in silico*. Se muestra el z- score, el cual se utiliza para inferir estados de activación probables de distintas funciones biológicas en función de la comparación con un modelo que asigna vías de regulación aleatorias.

En función de estos datos, se procedió con el estudio de los niveles de expresión de dicho factor en células MCF-7 tet-off/ACSL4 y MCF-7 tet-off control. A través de fraccionamiento subcelular se obtuvo el extracto nuclear y se analizaron los niveles de NRF-1 por western blot (Figura 33).





**Figura 33. ACSL4 induce la expresión de NRF1 en células de cáncer de mama MCF-7.** Se extrajo por fraccionamiento celular el extracto nuclear de células MCF-7 tet-off/ACSL4 el cual fue analizado por western blot para la expresión de NRF-1. Los resultados se expresan como veces de cambio respecto del control. \*  $p < 0,05$ . Nota: se utilizó como control de carga la cantidad de proteína nuclear sembrada, dicha cantidad se corroboró a través de tinción con rojo Ponceau.

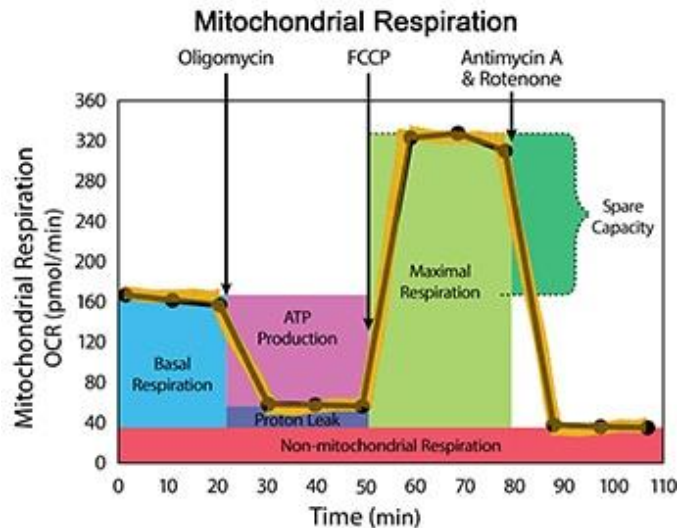
Estos resultados demuestran que ACSL4 induce un aumento en los niveles de expresión de NRF-1 en células de cáncer de mama. Como mencionamos anteriormente, este factor de transcripción activa genes claves requeridos para la respiración, transcripción de ADN y replicación mitocondrial lo que nos llevó a realizar estudios sobre esos parámetros y procesos mitocondriales.

#### **B.4. Análisis del metabolismo mitocondrial en células tumorales mamarias**

En función de los estudios conocidos donde existe una relación entre el cáncer y cambios en el metabolismo mitocondrial de las células tumorales y basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, procedimos al estudio de la bioenergética mitocondrial en las líneas celulares de cáncer de mama.

Para el estudio de metabolismo mitocondrial, utilizamos células MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4. Por lo tanto, realizamos el *XF Cell Mito Stress Test* utilizando el equipo *XF Extracellular Flux Analyzer Quotation Seahorse* (SeahorseBioscience, Massachusetts, USA) servicio brindado por la Fundación Instituto Leloir (FIL). A través de este análisis pudimos medir la Tasa de Consumo de Oxígeno

(TCO) la cual nos permitió calcular distintos parámetros respiratorios de las células, entre ellos la respiración basal, la respiración máxima, la respiración no mitocondrial, la producción de ATP, la eficiencia de acoplamiento, la fuga de protones (*proton leak*) y la capacidad de reserva respiratoria (Figura 34).

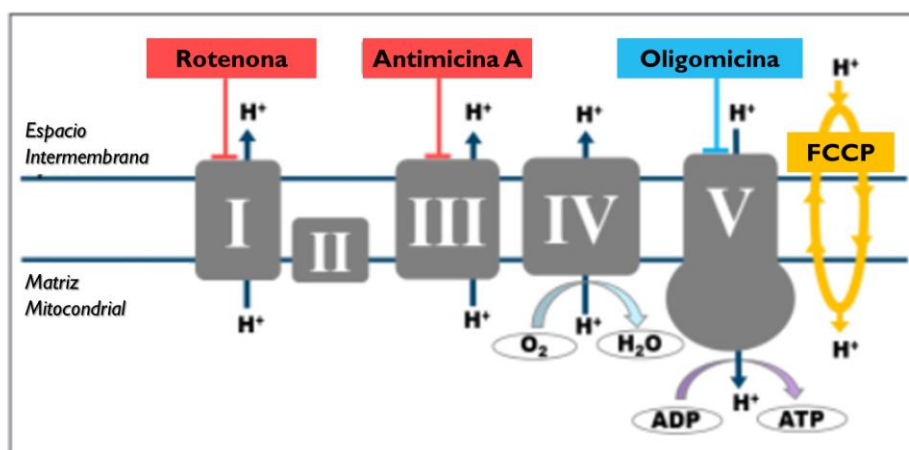


**Figura 34. Parámetros claves de función mitocondrial.** Esquema representativo de la tasa de consumo de oxígeno (TCO) y parámetros respiratorios medidos con el Agilent XF Extracellular Flux Analyzer Quotation Seahorse.

Este ensayo utiliza unos puertos de inyección incorporados en cartuchos donde actúa un sensor XF para agregar moduladores de la respiración celular en el pocillo con las células ya sembradas y determinar los parámetros clave de la función mitocondrial. Los moduladores que se incluyen en este kit de ensayo son: oligomicina, carbonil cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), rotenona y antimicina A.

La oligomicina inhibe la ATP sintasa (complejo V) y se inyecta primero en el ensayo después de las mediciones basales. Este inhibidor del complejo V mitocondrial disminuye el flujo de electrones a través de CTE, lo que resulta en una reducción en la respiración mitocondrial a la cual está vinculada a la producción celular de ATP. La segunda inyección del ensayo es de FCCP el cual es un agente desacoplante que interrumpe el potencial de membrana mitocondrial. Como resultado, el flujo de electrones a través de la CTE no está inhibido y el consumo de oxígeno llega a su máximo en el complejo IV. La TCO estimulada por FCCP entonces se puede usar para calcular la capacidad de reserva respiratoria, definida como la diferencia entre la respiración máxima y la respiración basal. La capacidad de reserva respiratoria es una

medida de la capacidad de la célula para responder a una mayor demanda de energía bajo una situación de estrés. Por último, la tercera inyección es una mezcla de rotenona, un inhibidor del complejo I y/o antimicina A, un inhibidor del complejo III. Esta combinación apaga la respiración mitocondrial y permite el cálculo de la respiración no mitocondrial conducida por procesos fuera de las mitocondrias (Figura 35).



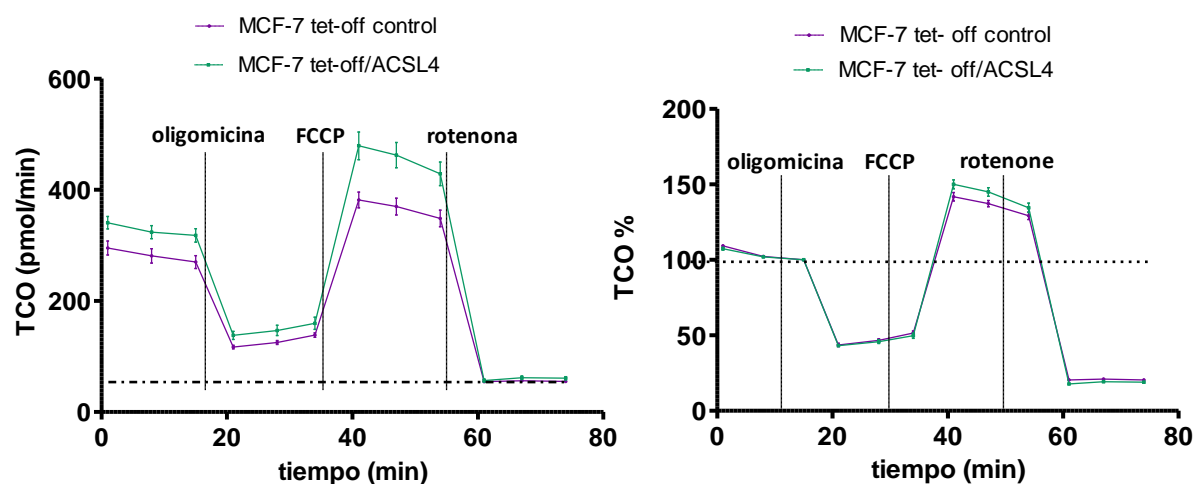
**Figura 35.** Esquema representativo donde se muestran los moduladores de la cadena de transporte de electrones utilizados en el test de estrés mitocondrial de Agilent Seahorse.

Para llevar a cabo este ensayo, previamente, realizamos la titulación del FCCP con el fin de determinar la concentración correcta a utilizar. La titulación se realizó días antes del estudio utilizando células MCF-7 tet off/ ACSL4 y control, las cuales fueron sembradas 24 horas antes de la medición en placas poli-lisinadas que son específicas para el equipo en cuestión. Las células fueron sembradas en tres placas distintas utilizando distinta cantidad inicial, con el objetivo de poner a punto el número de células a plaquear para la realización del estudio. La cantidad de células que se sembró en cada placa fueron las siguientes: 8.000, 12.000 y 24.000 en cada placa basándonos en estudios donde utilizan números de células en estos rangos <sup>255</sup>. El número de células seleccionado finalmente fue de 24.000 células a plaquear 24 h. Finalmente, una vez seleccionado el número de células se realizó la titulación del FCCP, la cual dio como resultado que la concentración a utilizar del mismo en el ensayo es de 0,5  $\mu$ M.

Para la medición de la TCO en la línea tumoral de mama estable MCF-7 tet off/ACSL4 y en la línea control sembramos 24 mil células/pocillo en medio completo en las placas correspondientes 24 horas previas al ensayo. El día del estudio, el medio fue reemplazado por un medio especial para la realización del Mito Stress Test. Durante el

ensayo se realizaron los distintos tratamientos anteriormente mencionados: oligomicina (2,5  $\mu\text{M}$ ), FCCP (0,5  $\mu\text{M}$ ) y Rotenona/Antimicina A (0,5  $\mu\text{M}$ ). Las concentraciones de oligomicina y rotenona/ antimicina A utilizadas son recomendadas por el protocolo del test.

La TCO se midió como picomoles de  $\text{O}_2$  por minuto (pmol/min) y se relativizó en función del último punto medido de respiración basal (100%) generando un porcentaje de TCO (TCO%) (Figura 36).



**Figura 36. Tasa de consumo de oxígeno en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4.** Utilizando el Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test se midió la tasa de consumo de oxígeno (TCO) en las células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 comparándose contra el control. (Izq.) Tasa de consumo de oxígeno en picomoles de  $\text{O}_2$  consumido por minuto. (Der.) La tasa de respiración basal fue normalizada a la TCO: TCO %.

Pudimos observar que no existen diferencias significativas en el consumo de oxígeno entre las células que sobreexpresan ACSL4 respecto del control. A pesar de que observamos una leve tendencia a un mayor consumo de oxígeno por parte de las células MCF-7 tet-off/ ACSL4 (Figura 36, Izq); dicha tendencia desapareció cuando normalizamos el consumo de oxígeno en función a la tasa de respiración basal (Figura 36, Der.)

La medición de la TCO nos permitió luego poder calcular los parámetros respiratorios tal como lo explicamos anteriormente y como se muestra en la figura 34.

### B.5. Estudio de los parámetros respiratorios en células tumorales mamarias basados en la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial

Con el fin de profundizar el estudio del metabolismo y función mitocondrial, a partir de la medición de la TCO pudimos calcular los distintos parámetros respiratorios mencionados con anterioridad. Como resultado observamos que no existen diferencias significativas en la respiración basal, la respiración no mitocondrial, la producción de ATP y la eficiencia de acoplamiento entre las células MCF-7 tet-off/ ACSL4 y las células control (Tabla 8). Sin embargo, observamos diferencias significativas en parámetros tales como la respiración máxima, la capacidad de reserva respiratoria y la fuga de protones o *proton leak* (Figura 37).

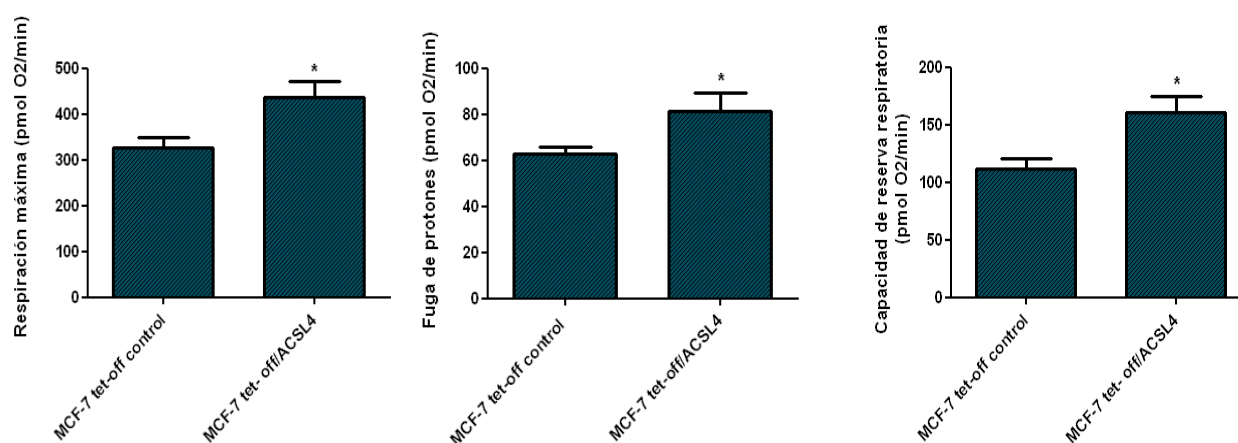
Parámetros Respiratorios	MCF-7 tet-off control (media ± ES)	MCF-7 tet-off/ACSL4 (media ± ES)
Respiración Basal (pmol O <sub>2</sub> /min)	215.9 ± 19.2	261.2 ± 15
Respiración no mitocondrial (pmol O <sub>2</sub> /min)	54.1 ± 1.6	56.6 ± 4.2
Producción de ATP (pmol O <sub>2</sub> /min)	153 ± 17.2	180 ± 7
Eficiencia de acoplamiento (%)	70.7 ± 1.8	69.3 ± 1.3

**Tabla 8. Parámetros respiratorios no modificados por la sobreexpresión de ACSL4 en células de cáncer de mama.** El cálculo de los parámetros respiratorios se realizó según lo presentado en la figura 34. El análisis estadístico demostró que la respiración basal, la no mitocondrial, la producción de ATP y la eficiencia de acoplamiento entre las células que sobreexpresan ACSL4 y las células control. Los resultados se presentan como la media ± ES.

Observamos que la sobreexpresión de ACSL4 no altera todos los parámetros respiratorios calculados. Como muestra la Tabla 7, la respiración basal si bien mostró una leve tendencia al aumento en células MCF-7 tet-off/ACSL4, dicho aumento no resultó significativo, lo que coincide con lo ya observado en los gráficos de la TCO.

Siguiendo con el análisis de los resultados observados y analizando aquellos que sí mostraron diferencias significativas (Figura 37) podemos decir que el aumento en la respiración máxima observado estaría relacionado con la inducción de los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE), entre ellos, el Complejo III, coincidiendo con los resultados vistos en el western blot de la fracción mitocondrial, en donde dicho

complejo se ve aumentado en las células MCF-7 tet-off/ACSL4 respecto del control. La fuga de protones o *proton leak* correlaciona con un aumento en los niveles de expresión de los mensajeros de la proteína desacoplante mitocondrial 2 (UCP2) y del miembro de la familia transportadora de nucleótidos de adenina (ANT1), un resultado previamente observado en un RNA-seq realizado en las células MCF-7 tet-off /ACSL4 y MCF-7 tet-off control (Tabla 9); dichos aumentos estarían relacionados con el control de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las mitocondrias y el correcto acoplamiento de la CTE y la OXPHOS. Por último, la capacidad de reserva respiratoria nos indica que las células que sobreexpresan ACSL4 tendrían una mayor capacidad para responder a una mayor demanda de energía en cualquier situación que lo requiera, tal como sería una mayor tasa proliferativa.



**Figura 37. ACSL4 induce un aumento significativo en distintos parámetros respiratorios en células MCF-7 tet-off/ ACSL4 respecto del control en células de cáncer de mama.** El cálculo de los parámetros respiratorios se realizó según lo presentado en la figura 34. El análisis estadístico demostró un aumento significativo en la respiración máxima, la capacidad de reserva respiratoria y la fuga de protones en células de cáncer de mama que sobreexpresan ACSL4. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  ES. (t, student \* $p < 0,05$ ).

Transcripto	Símbolo	Veces de Cambio
Solute Carrier Family Member 4 (ANT1)	SLC25A4	2,1
Proteína desacoplante mitocondrial 2	UCP2	1,7

**Tabla 9. La sobreexpresión de ACSL4 aumenta los niveles de mensajero de ANT1 y UCP2 en células MCF-7.** En nuestro laboratorio se realizó previamente un RNA-seq de las células

MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4 cuyos resultados fueron procesados por el análisis de IPA. Se observó que proteínas relacionadas al control de ROS en las mitocondrias (ANT1 y UCP2) se encuentran aumentadas cuando se sobreexpresa ACSL4.

Los resultados observados demuestran que ACSL4 es capaz de alterar de manera significativa algunos parámetros respiratorios mitocondriales, lo que nos llevó a preguntarnos aún más sobre el metabolismo mitocondrial en las líneas celulares de cáncer de mama en estudio.

## **B.6 Efecto de la expresión de ACSL4 sobre la actividad mitocondrial en células tumorales mamarias**

Se ha visto que la biología mitocondrial que contribuye a la tumorigénesis incluye variaciones en biogénesis mitocondrial, dinámica de fusión- fisión, muerte celular, estrés oxidativo, metabolismo y bioenergética mitocondrial, señalización y ADN mitocondrial <sup>210</sup>. Teniendo esto en cuenta y basándonos en los resultados del metabolismo mitocondrial obtenidos hasta el momento decidimos evaluar en las líneas celulares de cáncer de mama en estudio la actividad mitocondrial a través de microscopía de fluorescencia utilizando el colorante Mitotracker Red (MitoTrackerDeep Red FM<sup>®</sup>, Invitrogen), compuesto que se acumula en las mitocondrias con una respiración activa que presentan un aumento en el potencial de membrana mitocondrial. Los resultados obtenidos fueron analizados en un microscopio de epifluorescencia Nikon E200 Microscope y las imágenes fueron cuantificadas a través del software Image J.

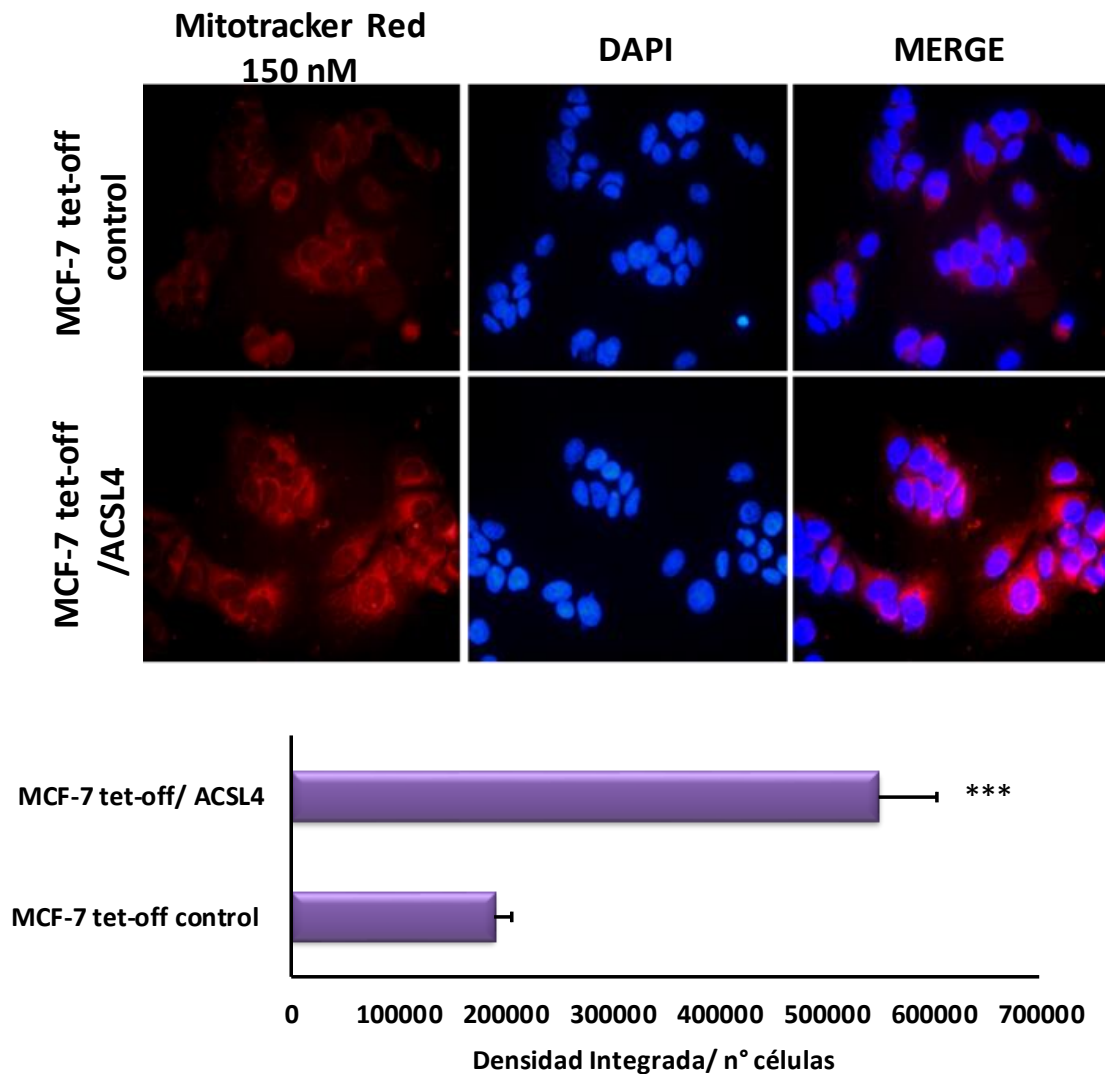
Por lo tanto, para la realización del ensayo de actividad mitocondrial, utilizamos en primer lugar, las células pertenecientes a la línea en estudio MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4. En esta línea celular observamos que las células que sobreexpresan ACSL4 tienen mayor actividad mitocondrial respecto del control; dicha actividad se encuentra reflejada por una mayor intensidad en la señal de Mitotracker Red (Figura 38).

Finalmente, con el objetivo de analizar el efecto de ACSL4 sobre la actividad mitocondrial en células de cáncer de mama triple negativas (TNBC), utilizamos la línea celular MDA- MB- 231 en las cuales se ha silenciado la expresión de ACSL4 (shACSL4) y su respectivo control sin silenciar (shControl). Procedimos nuevamente a la tinción con Mitotracker Red para medir la actividad mitocondrial. Los resultados obtenidos

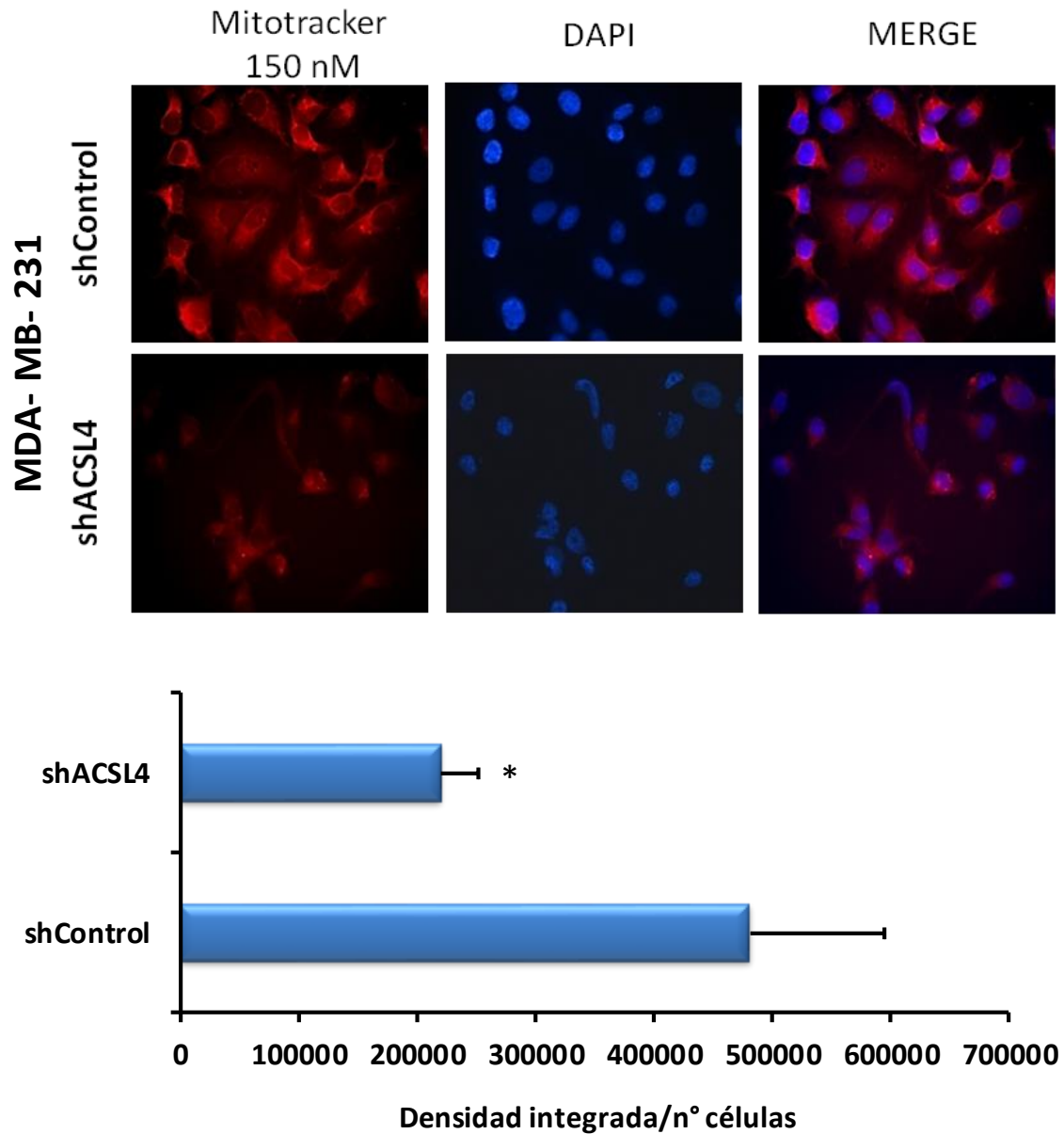
demonstraron que la disminución en la expresión de ACSL4 correlaciona con una disminución en la actividad mitocondrial. (Figura 39).

Estos resultados coinciden y confirman lo obtenido en las células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 donde se observa un aumento en la actividad de las mitocondrias. A su vez, en conjunto, estos resultados sugieren que ACSL4 posee un efecto sobre la actividad de las mitocondrias en células tumorales mamarias cuya respuesta difiere según el nivel de agresividad tumoral.





**Figura 38. La sobreexpresión de ACSL4 aumenta la actividad mitocondrial en las células de la línea MCF-7.** La actividad mitocondrial fue evaluada en las células MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4. La tinción mitocondrial fue llevada a cabo por una hora a 37°C con 150 nM de Mitotracker Red (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (dilución 1:7000). Aumento: 40X. La densidad integrada de la señal del Mitotracker fue analizada a través del software Image J como referencia de la cantidad de mitocondrias activas. Las barras representan la señal de densidad integrada relativo al número de células en un área determinada. \*\*\*  $p < 0,0001$ , test t-student.



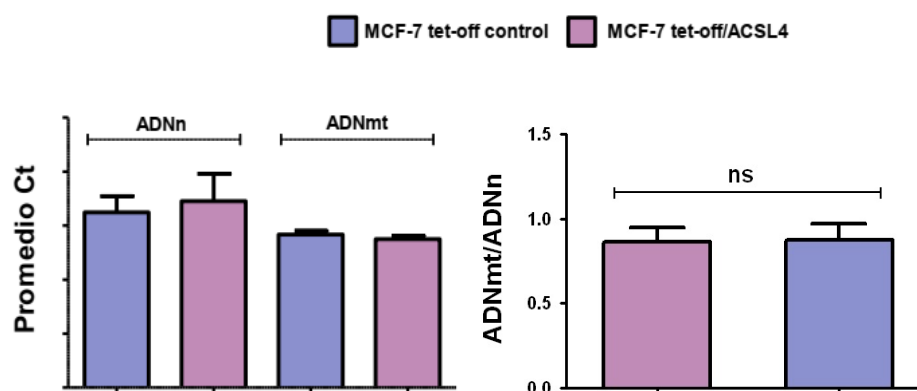
**Figura 39. El silenciamiento de la expresión de ACSL4 disminuye significativamente la actividad mitocondrial en células de cáncer de mama de la línea MDA-MB -231.** La actividad mitocondrial fue evaluada en la línea celular MDA-MB-231 que expresan en forma estable un *short hairpin* RNA para ACSL4 (shACSL4) y en la línea control (shControl). La tinción mitocondrial fue llevada a cabo por una hora a 37°C con 150nM de Mitotracker Red (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Aumento: 40X. La densidad integrada de la señal del Mitotracker fue analizada a través del software Image J como referencia de la actividad mitocondrial. Las barras representan la señal de densidad integrada relativa al número de células en un área determinada. \*  $p < 0,05$ , test t- student.

### **B.7. Estudio cuantitativo del ADN mitocondrial (ADNmt) en función del ADN nuclear (ADNn) en células tumorales mamarias**

Recientemente se ha reconocido que las alteraciones del ADN mitocondrial (ADNmt) desempeñan un papel importante en la patogénesis de las llamadas enfermedades comunes como la insuficiencia cardíaca, la diabetes y el cáncer <sup>256</sup>. La evidencia epidemiológica acumulada indica que los cambios cuantitativos en el número de copias del ADN mitocondrial humano (ADNmt) podrían afectar la susceptibilidad genética de las neoplasias malignas de una manera específica del tumor, pero los resultados aún son difíciles de alcanzar <sup>257</sup>. Estudios de meta-análisis realizados de cambios estructurales en el ADNmt y su asociación con enfermedades humanas señaló que las duplicaciones de ADNmt no se reportan en tumores, aunque aún no está claro si es que son menos frecuente que en otras enfermedades o simplemente, no son evaluadas con frecuencia <sup>258</sup>.

En función de lo anteriormente expresado, decidimos evaluar el efecto de la expresión de ACSL4 sobre el ADN mitocondrial. Para llevar a cabo este ensayo, realizamos la extracción de ADN genómico (ADNg) de células MCF-7 tet-off/ACSL4 y células MCF-7 tet-off control, utilizando el Quick Genomic DNA Extraction Kit (Dongsheng Biotech, DSBIO, Korea) y mediante la utilización de cebadores específicos (ver en materiales y métodos) tanto para ADN mitocondrial (ADNmt) y ADN nuclear (ADNn) realizamos una PCR en Tiempo Real (qPCR) que nos permitió calcular la relación ADNmt/ADNn (Figura 40).

Los resultados obtenidos mostraron que no existen cambios significativos en el contenido de ADNmt respecto del contenido de ADNn en aquellas células que sobreexpresan ACSL4. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el contenido de ADNmt no correlaciona con el nivel de agresividad tumoral mediado por ACSL4.



**Figura 40. La sobreexpresión de ACSL4 no modifica el contenido de ADN mitocondrial en células de cáncer de mama.** Células MCF-7 tet-off/ACSL4 fueron comparadas respecto de su control, MCF-7 tet-off control respecto de su contenido de ADN mitocondrial. Se extrajo ADN genómico. Se realizó una qPCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para ADN mt y ADNn. Izquierda: Los gráficos muestran la media del Ct tanto para el ADN mt como para el ADNn respectivamente Derecha: Se calculó la relación ADNmt/ADNn y se graficó de manera separada como una medida del contenido de ADN mt. El análisis estadístico se realizó mediante t-student, ns: no significativo.

### B.8. Análisis de la masa mitocondrial en células de cáncer de mama por citometría de flujo

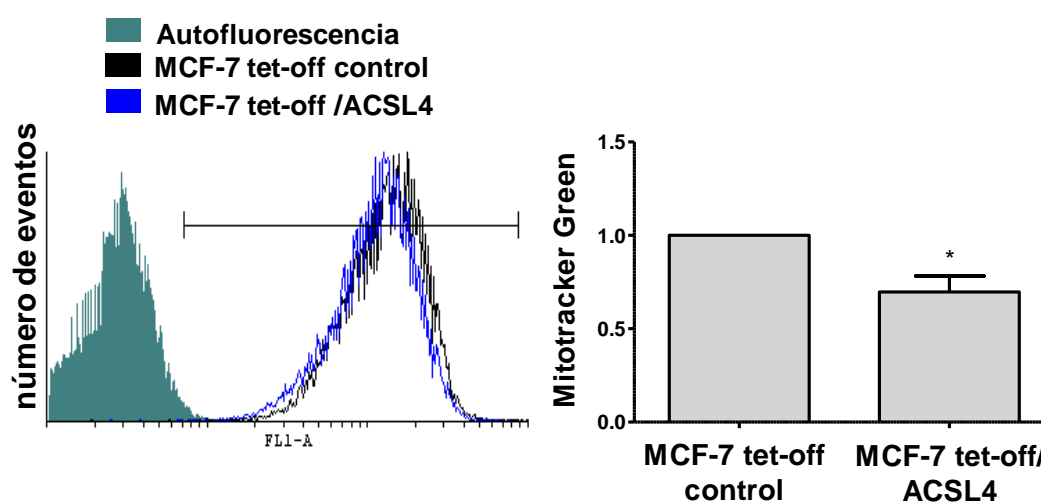
En la actualidad es sabido que el cambio en la masa mitocondrial general refleja un equilibrio entre la biogénesis mitocondrial y las tasas de mitofagia (degradación de las mitocondrias en el autofagosoma)<sup>209</sup>. Las mitocondrias también son dinámicas en términos su localización en la célula con el aumento de su distribución en la región perinuclear en condiciones de hipoxia en comparación con la normoxia, y el movimiento a lo largo de los microtúbulos hacia lisosomas en condiciones que promueven mitofagia. Existen evidencias de una desregulación en la dinámica mitocondrial, en la masa mitocondrial y la organización espacial subcelular en cáncer <sup>210,259,260</sup>.

Decidimos, por lo tanto, llevar a cabo la medición de la masa mitocondrial de las líneas celulares de cáncer de mama que poseíamos bajo estudio. Para el análisis de la masa mitocondrial utilizamos el colorante Mitotracker Green FM (Invitrogen ®) y lo medimos por citometría de flujo. El MitoTracker Green FM (MTG) es un tinte mitocondrial de fluorescencia verde que marca las mitocondrias de forma independiente del potencial de membrana mitocondrial tiñendo únicamente células vivas, lo que lo hace un marcador directo de la masa mitocondrial. Este colorante no se conserva bien luego de fijación

con formaldehído y es por esto que no se analiza por microscopía si no por citometría de flujo con células en solución.

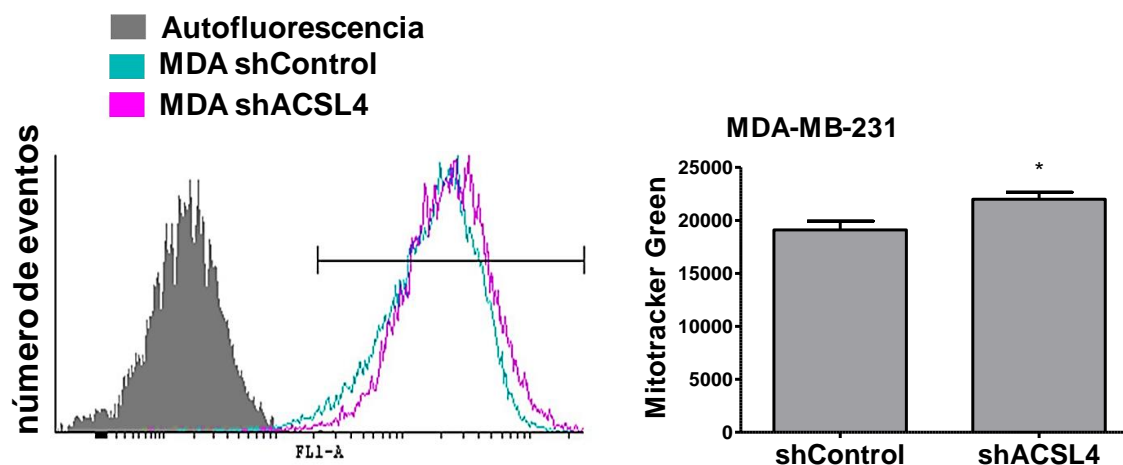
Con el objetivo de poder entonces evaluar la masa mitocondrial, realizamos en primer lugar el ensayo con MTG en la línea MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off ACSL4, para ver el efecto de la sobreexpresión de ACSL4 sobre este parámetro. Para esto, las células MCF-7 tet-off/ACSL4 y MCF-7 tet-off control fueron incubadas con MTG (ex: 490, em: 516 nm) durante 30 minutos en oscuridad. En todos los ensayos se realizó un control con ioduro de propidio para eliminar el contenido apoptótico de la muestra en el momento de su análisis y a su vez comprobar que el colorante no afecte la viabilidad celular. Pasada la incubación, las células fueron procesadas para su análisis por citometría de flujo (FACS Aria II, INIGEM, Hospital de Clínicas, UBA).

Los resultados obtenidos de este ensayo demostraron que la sobreexpresión de ACSL4 en células de la línea MCF-7 disminuye la señal emitida por el MTG respecto del control. Este resultado sugiere que, por lo tanto, la sobreexpresión de ACSL4 estaría disminuyendo la masa mitocondrial en esta línea celular (Figura 41).



**Figura 41. La sobreexpresión de ACSL4 en la línea tumoral de mama MCF-7 disminuye significativamente la masa mitocondrial.** Se analizó la masa mitocondrial en células MCF-7 tet-off/ACSL4 y MCF-7 tet-off control. Se utilizó el colorante MTG (150nM) el cual fue incubado 30 minutos a 37 °C. Finalmente se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las diferencias en la señal de fluorescencia se expresan como veces de cambio respecto del control. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student \* p < 0.05.

Por último, con el fin de analizar el efecto de ACSL4 sobre la masa mitocondrial en células TNBC, utilizamos la línea celular MDA- MB- 231 shACSL4 y su respectivo control (shControl). Procedimos nuevamente a la tinción con MTG y su análisis por citometría de flujo para evaluar la masa mitocondrial (Figura 42).



**Figura 42. El silenciamiento en la expresión de ACSL4 en células de la línea MDA-MB-231 induce un aumento significativo en la masa mitocondrial.** Se analizó la masa mitocondrial en células MCF-7 tet-off/ACSL4 y MCF-7 tet-off control. Se utilizó el colorante MTG (150nM) el cual fue incubado 30 minutos a 37 °C. Finalmente se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Las barras representan la intensidad de fluorescencia medidas por el citómetro de flujo. El análisis estadístico se realizó mediante t-student, \*  $p < 0,05$ .

En este caso, la disminución de los niveles de ACSL4 lleva a un aumento leve pero significativo de la masa mitocondrial. Los resultados obtenidos demuestran que ACSL4 juega un rol en el mantenimiento de la masa mitocondrial en células de cáncer de mama de distinto nivel de agresividad.

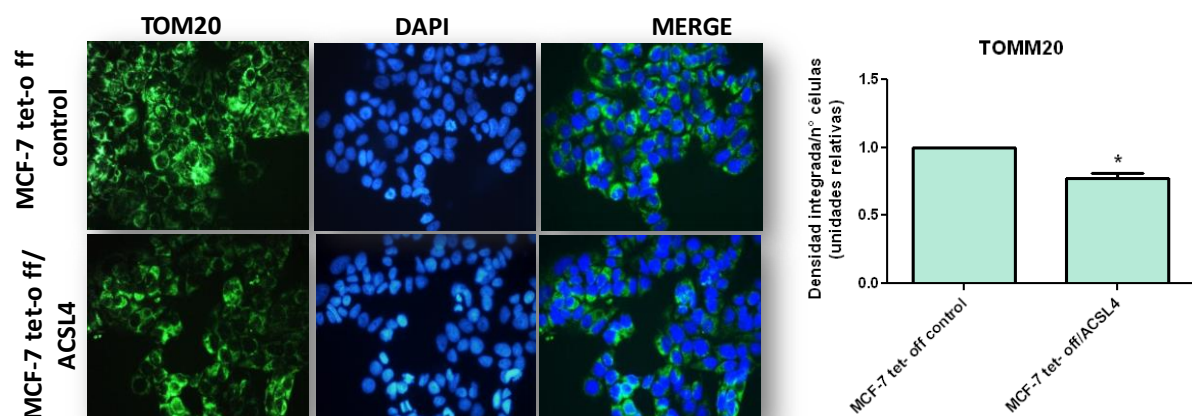
### **B.9. Efecto de la sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7 en los niveles de expresión de TOM20**

La subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM20 (TOM20) es un componente central del complejo receptor de TOM (translocasa de la membrana externa) responsable del reconocimiento y translocación de pre-proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol. Esta proteína, junto con TOM22, funciona como

el receptor de péptido de tránsito en la superficie de la membrana externa de la mitocondria y facilita el movimiento de pre- proteínas hacia el poro de translocación de TOM40.

A menudo TOM20 es utilizado como un marcador de la masa mitocondrial <sup>261</sup> debido a su expresión constitutiva en la membrana externa mitocondrial. También ha sido reportado como un marcador de mitofagia. Se ha visto que su disminución indica la activación de dicho mecanismo autofágico ya que la misma sucede previo al inicio de la mitofagia<sup>175,262</sup>. La desaparición de la señal fluorescente para proteínas individuales, como TOM20, citocromo c, HtrA2 / Omi o proteínas fluorescentes dirigidas a las mitocondrias, se utilizan con frecuencia como ensayos para evaluar la existencia del mecanismo de mitofagia <sup>263</sup>. Se ha observado, en mitocondrias de células HeLA, una pérdida de señal de TOM20 dependiente de que Parkina se encuentre activa <sup>262</sup>. En cuanto a la expresión de Parkina, se ha demostrado que está presente en niveles significativos en la línea MCF-7 mientras que no tiene expresión o su expresión es de niveles indetectables en la línea MDA-MB-231 <sup>170</sup>.

En relación a lo anteriormente mencionado, se evaluó por inmunofluorescencia la expresión de TOM20 como un marcador de la masa mitocondrial e indicador de mitofagia. Pudimos observar una disminución significativa en los niveles de TOM20 en las células MCF-7 tet-off/ACSL4 respecto de las células control (Figura 43). Dicho resultado correlaciona con lo demostrado por citometría de flujo anteriormente (Figura 41).



**Figura 43. TOM20 disminuye en células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 respecto de células control.** Se realizó una inmunofluorescencia para TOM20 usando un anticuerpo monoclonal anti-TOM20 (1:200) como marcador de masa mitocondrial y mitofagia. El segundo

anticuerpo conjugado con el colorante Cy2, se detecta en verde (columna izquierda). Los núcleos se marcaron con DAPI (1:7000) y se observaron en azul (columna central). En la columna derecha (Merge) se muestra la superposición de imágenes en los dos canales de color. Los resultados graficados representan la expresión relativa de la densidad de señal integrada por número de células. (t-student, \*  $p < 0,05$ ) (Derecha)

Por otro lado, la disminución en los niveles de expresión de TOM20 en células que sobreexpresan ACSL4, nos sugeriría que la disminución observada en la masa mitocondrial podría deberse a un aumento en la mitofagia. Sin embargo, esta suposición deberá ser comprobada en el futuro próximo con ensayos de mitofagia utilizando otros marcadores de este proceso, para completar los estudios.



*Discusión*

En este trabajo de tesis doctoral pudimos demostrar aspectos de relevancia en relación con la regulación de ACSL4 y el rol de dicha enzima en el metabolismo mitocondrial en células tumorales de mama de distinto nivel de agresividad.

A través de los estudios realizados para dilucidar los mecanismos post-traduccionales que regulan los niveles de ACSL4 pudimos demostrar que el proteasoma estaría involucrado en la degradación de ACSL4 y que, por lo tanto, esta enzima sería susceptible de ubiquitinación. Este mecanismo de regulación sería el responsable de la menor estabilidad de ACSL4 en células de menor agresividad como las MCF-7 mientras que lo contrario sucedería en células de mayor agresividad como lo son las MDA-MB-231 donde observamos que la estabilidad de la enzima es mayor. La determinación, por primera vez, de sitios de ubiquitinación de esta enzima que estarían involucrados en su degradación proteasomal en células de cáncer de mama, contribuye a comprender y ampliar el conocimiento de los mecanismos de regulación de la actividad de ACSL4.

Por otro lado, el estudio del rol de ACSL4 en la función y bioenergética mitocondrial de células de cáncer de mama nos permitieron conocer aún más el rol y la importancia de la mitocondria en las líneas celulares utilizadas y su posible relevancia en la agresividad tumoral. El metabolismo mitocondrial y la participación de ACSL4 en el mismo, no había sido previamente estudiado hasta el momento. Por lo tanto, estos hallazgos nos permiten conocer aún más como ACSL4 podría afectar las mitocondrias en el cáncer de mama dando lugar a un nuevo tema de estudio en el que aún falta profundizar mucho más.

Por lo tanto, en función a los resultados obtenidos, a continuación, discutiremos en detalle los dos grandes objetivos de este trabajo de tesis doctoral.

## 1. Estudio de los mecanismos involucrados en la regulación post-traducciona de ACSL4

Como mencionamos anteriormente en la introducción de este trabajo de tesis doctoral, entre las proteínas de la familia ACSL, la enzima ACSL4 tiene una fuerte preferencia por los ácidos grasos poliinsaturados, en particular por el AA <sup>8,11,12,264</sup>. Se han reportado diversas funciones de ACSL4 en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos. Se ha visto una expresión alterada de ACSL4 en algunos tipos de cáncer y se ha demostrado que esta enzima posee un rol clave en el desarrollo de un fenotipo altamente agresivo en las células tumorales <sup>86,87,97,148</sup>. Todos estos antecedentes han hecho de ACSL4 un blanco de estudio en distintos procesos fisiológicos y patológicos y ha sido de gran interés el poder dilucidar los mecanismos que regulan la expresión de esta proteína en tales procesos.

Se sabe que los niveles de expresión de esta enzima pueden ser regulados hormonalmente, a nivel transcripcional, post-transcripcional, traducciona y post-traducciona <sup>6,152,160,164,237</sup>.

En relación a la regulación hormonal de ACSL4, se sabe que esta enzima es regulada por acción hormonal tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la esteroidogénesis <sup>160,178,185</sup>. Como mencionamos, existen altos niveles de ACSL4 en células esteroidogénicas, especialmente en células de la zona fasciculata y reticularis de la glándula adrenal, células de Leydig testiculares y células luteales del ovario, así como también en cerebro. En el año 2000, Cho y colaboradores demostraron in vivo que la expresión de ACSL4 es inducida por ACTH y suprimida por glucocorticoides. Además observaron en células adrenales que tanto el mRNA como los niveles proteicos de ACSL4 son estimulados por ACTH <sup>179</sup>. Sin embargo, en la actualidad, no se conocen completamente los mecanismos involucrados en su expresión en algunos tejidos, en su regulación y en el aumento de los niveles de expresión de esta enzima en células tumorales.

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha publicado un manuscrito en donde se demostró la existencia de distintos mecanismos transcripcionales involucrados en la expresión diferencial de ACSL4 en líneas tumorales de cáncer de mama de diferente nivel de agresividad. En ese trabajo se demostró por primera vez la existencia de un sitio consenso para el factor de transcripción ERR $\alpha$  en el promotor de ACSL4 que estaría asociado a una mayor actividad del promotor y una mayor expresión de ACSL4 en las

líneas de mayor agresividad <sup>237</sup>. Sin embargo, existen otros mecanismos regulatorios que podrían afectar los niveles de expresión de ACSL4 y que aún no han sido del todo establecidos.

Muchos estudios han reportado una relación entre el cáncer y enzimas ligadas a modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación <sup>265,266</sup>. Aun así, hasta el momento, no se conocen las enzimas que participan de esta regulación y qué efecto tienen las mismas en la actividad, localización y función de ACSL4. Además, no se conoce completamente los mecanismos involucrados en la regulación de su expresión en algunos tejidos, ni tampoco todos los mecanismos que generan un aumento de su expresión en células tumorales. Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo consistió en que distintas modificaciones postraduccionales, tales como la ubiquitinación y/o fosforilación participan como mecanismos de regulación de la expresión y actividad de ACSL4, pudiendo impactar en el rol de esta enzima en la agresividad tumoral y en la tumorigénesis en células de cáncer de mama.

Debido a lo anteriormente mencionado, en este trabajo buscamos profundizar en el conocimiento de la regulación post- traduccional de ACSL4 y en los niveles de expresión de esta enzima en este tipo celular. Para abordar esta cuestión, como parte de los objetivos de esta tesis doctoral, se procedió a la evaluación y comparación de la estabilidad de ACSL4 en distintas líneas tumorales de mama con diferente nivel de agresividad. Los resultados obtenidos sugieren que, los niveles de expresión de ACSL4 en la línea de mayor agresividad MDA-MB-231 son más estables en el tiempo que en la línea MCF-7 de menor agresividad, dicho resultado se puede observar en la curva de decaimiento de los niveles de ACSL4 presentada en resultados (Figura 22). Estos resultados podrían explicar, junto a los estudios realizados previamente a nivel transcripcional, el mayor nivel de la proteína ACSL4 observado en células tumorales más agresivas <sup>97,152,267</sup>. Por lo tanto, continuando con nuestro objetivo y en función de los resultados obtenidos en el análisis de la estabilidad de ACSL4, a través del uso de MG-132 como inhibidor proteasomal, logramos demostrar que el proteasoma está involucrado en la degradación de ACSL4 en las líneas celulares de cáncer de mama en estudio, afectando de esta manera su estabilidad. Estos resultados sugieren un rol clave del proteasoma en la expresión diferencial de ACSL4 en las líneas de cáncer de mama de distinta agresividad.

Los resultados obtenidos en relación a la estabilidad de ACSL4 y el rol del proteasoma en células de cáncer de mama van en concordancia con los resultados

obtenidos en hepatocitos por Kan y colaboradores<sup>164</sup> donde demuestran que ACSL4 es blanco de ubiquitinación y degradación proteasomal a través de una regulación negativa ejercida por el AA en ese modelo celular. Estos autores recientemente utilizaron análisis proteómicos acoplados con LC-MS/MS e identificaron a la proteína de tráfico vesicular general intracelular (p115) como la proteína que interactúa con ACSL4 en las células HepG2. La proteína p115 es crucial para el tráfico de ER-Golgi y la biogénesis de Golgi. Estos estudios mostraron que la interacción de estas proteínas se ve favorecida por el AA y demostraron una regulación positiva significativa de la proteína p115 en el hígado de ratones alimentados con una dieta alta en grasas que, según se había informado anteriormente, induce la regulación negativa de la expresión de la proteína ACSL4. Este nuevo hallazgo ha revelado una nueva correlación inversa entre las proteínas ACSL4 y p115 en el hígado, implicando que esta interacción también tendría un rol regulatorio sobre la enzima y su estabilidad<sup>268</sup>.

Además, durante el desarrollo de esta tesis doctoral, el grupo de Belkaid y colaboradores analizó el rol del 17 beta estradiol sobre la regulación de ACSL4 en células MCF-7 de cáncer de mama. En este trabajo se logró demostrar que el 17 $\beta$ -estradiol (E2) prolonga la vida media de ACSL4, haciéndola más estable, a través de una disminución en la degradación proteasomal de la enzima. Este aumento en la estabilidad de la enzima es requerido para una mejor captación celular de PUFAs y para la inducción de un fenotipo celular más agresivo en este tipo celular<sup>269</sup>. En ese trabajo observaron que el proteasoma participa en la degradación de ACSL4, en concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral.

Por lo tanto, en conjunto, nuestros resultados, a la par de trabajos de otros grupos, demuestran que, efectivamente, ACSL4 es un posible blanco de ubiquitinación y en consecuencia, los niveles de esta proteína serían regulados, en parte, a través de la degradación por el proteasoma. Este mecanismo, en última instancia, afectaría la estabilidad de la enzima.

En función a los resultados obtenidos y a los antecedentes mencionados<sup>164,269</sup>, con el objetivo de profundizar el rol de la degradación proteasomal en la estabilidad de ACSL4, decidimos estudiar el mecanismo de ubiquitinación como posible modificación post- traduccional de esta enzima en células de cáncer de mama.

En función a los resultados obtenidos y a los antecedentes mencionados<sup>164,269</sup>, con el objetivo de profundizar el rol de la degradación por la vía proteasomal en la

estabilidad de ACSL4, decidimos estudiar el mecanismo de ubiquitinación como posible modificación post-traducciona l de esta enzima en células de cáncer de mama. Para profundizar aún más nuestros estudios, a través del análisis de distintas bases de datos bioinformáticas pudimos encontrar que ACSL4 presenta en su secuencia al menos dos lisinas, en las posiciones 621 y 702 con un rol clave en la ubiquitinación de la enzima y por consiguiente, en su estabilidad. Por ende, con el objetivo de estudiar estas lisinas como posibles blancos de ubiquitinación realizamos mutaciones sitio dirigidas a las mismas.

Una vez obtenidas las mutaciones, mediante transfecciones transitorias en la línea MCF-7 observamos por western blot un aumento en los niveles de expresión de ACSL4 en aquellas células transfectadas con las respectivas mutaciones en comparación con las células transfectadas con ACSL4 wt (control). La mutación de la lisina 621 provocó un aumento de la señal de ACSL4 de 3 veces y la de la lisina en 702 un aumento de 2,6 veces aproximadamente respecto del control. Estos resultados nos sugieren un rol clave de estos aminoácidos en la estabilidad de la proteína y dados los antecedentes implicarían que estos sitios participan en el mecanismo de ubiquitinación y consecuente degradación de ACSL4. A través de ensayos de inmunoprecipitación pudimos observar que ACSL4 sería reconocida por el anticuerpo anti-ubiquitina y observamos que esta señal es mayor en las células MCF-7 que en las células MDA-MB-231, esto indicaría que ACSL4 es ubiquitinada en ambas líneas celulares en estudio. Mas estudios a futuro son necesarios para poder identificar y caracterizar los sitios de ubiquitinación.

La ubiquitinación consiste en la unión covalente de la ubiquitina a proteínas blanco a través de una cascada de reacciones enzimáticas que incluye a tres enzimas principales: la enzima de activación (E1), la enzima de conjugación (E2) y la enzima de ligación (E3)<sup>270</sup>. El proceso de ubiquitinación ha sido ampliamente estudiado y descrito en múltiples trabajos<sup>161,266,270,271</sup>. Es sabido que la adición y eliminación de las cadenas de ubiquitina son un proceso biológico fundamental en todas las células eucariotas. En la actualidad se ha demostrado que las enzimas involucradas en el mecanismo de ubiquitinación ocupan muchas veces un lugar destacado como oncogenes o supresores de tumores en una variedad de cánceres y muchas vías de señalización y regulación relevantes para esta patología<sup>272</sup>. La evidencia acumulada sugiere que las E3 ligasas de ubiquitina poseen un papel importante en el desarrollo del cáncer<sup>273</sup>. Por lo tanto, profundizando nuestro estudio, con el fin de dilucidar que enzimas podrían ser responsables de la ubiquitinación de ACSL4, realizamos una búsqueda en bibliografía

y distintas bases de datos tratando de encontrar cuales serían las enzimas que estarían involucradas en este mecanismo de ubiquitinación. Dicha búsqueda nos reveló a Parkina, una RING- between- RING E3 ligasa de ubiquitina (RBR- E3 ligasa) codificada por el gen PARK2<sup>172</sup> como posible candidata para ligar la ubiquitina a ACSL4 <sup>177</sup> . El sistema PINK1-Parkina es un sistema que se activa frente a una disrupción del potencial de membrana mitocondrial, hecho muy común en distintos tipos de cánceres. Por lo tanto, en base a la bibliografía encontrada, utilizando como modelo la línea celular HEK293, la cual seleccionamos debido a su alta eficiencia de transfección, mediante una co- inmunoprecipitación de ACSL4 y Parkina, demostramos que, efectivamente, existe una interacción entre ambas proteínas. Este resultado sugiere que ACSL4 podría, por lo tanto, ser sustrato de ubiquitinación de dicha E3- ligasa.

En un estudio bioinformático realizado por Juan Liu y colaboradores en 2017 <sup>170</sup>, demostraron que una baja expresión del ARNm de Parkina se asocia a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Lo que confirma un rol de esta proteína en este tipo de cáncer. Sin embargo, en este mismo trabajo, se muestra mediante western blot que la expresión a nivel de proteína de Parkina, si bien es notoria en células MCF-7, es notablemente menor en la línea MDA-MB-231. Por lo tanto, esto podría sugerir que Parkina podría ser responsable de la ubiquitinación de ACSL4 en mayor medida en la línea MCF-7 que en la línea MDA-MB-231, explicando, en parte, la diferencia de estabilidad de la proteína. En relación a esto último, existen estudios que mencionan a otras enzimas del tipo E3 ligasas que actúan en la línea MDA- MB-231 y que podrían tener un rol en el cáncer de mama. Por ejemplo, la E3-ligasa RNF126 ha sido reportada como responsable de la inducción del ciclo celular en cáncer de mama y próstata mediante su acción sobre el supresor tumoral p21<sup>274</sup>. Se ha investigado también el rol de las E3 ligasas Smurf1 y Smurf2, ambas E3 ligasas del tipo HECT, en cáncer de mama<sup>273,275</sup>. Se sabe que a través de la interacción con proteínas Smads, con receptores para el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ )<sup>276</sup> y con la proteína morfogénica de hueso (BMP), Smurf1 y Smurf2 atenúan la vía de señalización de la familia TGF- $\beta$ . Un estudio previo a esta tesis doctoral ha demostrado que la eliminación de Smurf 2, en células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano, dio como resultado aumentos en los niveles de la proteína Smurf1, lo que llevó a un aumento en la migración celular in vitro. En este trabajo mencionado, se demostró la existencia de una regulación postraduccional a través de Smurf1 por Smurf2 que conllevan a diferencias funcionales entre Smurf1 y Smurf2 en la progresión de las células del cáncer de mama <sup>273</sup>.

Por lo tanto, en función a los antecedentes existentes y en base a los resultados obtenidos, a futuro, deberíamos poder determinar si otras enzimas participan en la ubiquitinación de ACSL4 y cómo este mecanismo funciona para regular su expresión y actividad. En este sentido, recientemente, se realizó un trabajo donde se analizó el interactoma de E3- ubiquitina ligasas ubicadas en el retículo endoplásmico e identificó a ACSL4 como una de las proteínas que interactúan con RNF 185, una E3-ligasa de ubiquitina que regula la autofagia mitocondrial selectiva y actúa en la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD), vía que dirige a las proteínas mal plegadas que se acumulan en esta organela para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma <sup>277</sup>.

En la búsqueda bioinformática realizada para encontrar de modificaciones post-traduccionales de ACSL4 hallamos también posibles aminoácidos susceptibles de fosforilación en ACSL4. Si bien, no realizamos mutaciones sitio dirigidas de los mismos, quisimos comprobar si efectivamente ACSL4 podría fosforilarse. Existen estudios previos que sugieren a ACSL4 como una fosfoproteína, la cual es sustrato tanto de PKA como de PKC y demuestran que la fosforilación de la enzima por estas quinasas regulan su actividad <sup>160</sup>. Por lo tanto, decidimos evaluar en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama si este mecanismo de regulación post-traducciona l podría suceder.

Nuestros resultados iniciales mostraron que en ambas líneas existiría una fosforilación de tirosinas, la cual fue observada por inmunoprecipitación y western blot, con una leve tendencia a ser mayor en la línea más agresiva. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser confirmados a través de MALDI-TOF MS/MS en el transcurso del desarrollo de este trabajo de tesis. Futuros estudios son necesarios para profundizar en el rol de esta modificación post-traducciona l en estas líneas en relación a la regulación de la actividad de ACSL4.

En conclusión, en conjunto estos resultados comprueban la existencia de una regulación post-traducciona l de ACSL4 en células de cáncer de mama donde el proteasoma tendría un rol crucial. Esta regulación traería aparejada una estabilidad diferencial en células de menor o mayor agresividad tumora l respectivamente.



## 2. Estudio del rol de ACSL4 en el metabolismo y función mitocondrial en células de cáncer de mama

En células eucariotas sanas y con capacidad replicativa, las mitocondrias regulan procesos celulares de importancia tales como, proliferación y muerte celular, adaptación metabólica, y la homeostasis del calcio, entre otros. Sin embargo, la importancia del rol de las mitocondrias en cáncer fue ignorada por muchos años. Aun así, debido al gran número de funciones que estas organelas poseen y el descubrimiento del “Efecto Warbug” aproximadamente hace 100 años en donde Warbug plantea que el cáncer podría surgir a partir de mitocondrias dañadas, luego de muchos años de estudios, se ha demostrado que la desregulación de la función mitocondrial resulta esencial en la tumorigénesis, el desarrollo del tumor y los procesos de metástasis <sup>210,259</sup>. En la actualidad, por tanto, es sabido que las mitocondrias juegan un papel clave en la oncogénesis ya q además de ejercer funciones bioenergéticas centrales, estas organelas, son potenciales blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas drogas antitumorales <sup>211</sup>.

En nuestro laboratorio, con el objeto de dilucidar cómo ACSL4 afecta la agresividad tumoral y entender cuáles son los caminos involucrados en este proceso, se ha estudiado con anterioridad a este trabajo de tesis, mediante RNA-seq, el transcriptoma de las células de MCF-7 tet-off/ACSL4 y su respectivo control <sup>152</sup>. El análisis bioinformático de los resultados mediante el programa IPA, demostró diferentes procesos celulares que se ven afectados por ACSL4, entre los que se encuentran procesos relacionados con cáncer, como proliferación, migración e invasión <sup>97</sup>. Además, este análisis reveló que ACSL4 afecta la expresión de genes relacionados al metabolismo y función mitocondrial, tales como el Complejo III de la CTE entre otros. Al mismo tiempo, se realizó un estudio de proteómica funcional en donde se logró identificar a ACSL4 como un regulador de la vía de mTOR en células de cáncer de mama, lo cual se encuentra íntimamente relacionado con un aumento en el crecimiento y la progresión tumoral <sup>97</sup>. Es sabido y ha sido ampliamente reportado que mTOR  $\frac{1}{2}$  regula procesos celulares clave, incluidos: la traducción del ARNm, la biogénesis ribosomal, los mecanismos de autofagia y el metabolismo celular <sup>97,278–280</sup>.

Las mitocondrias son organelas citoplasmáticas que se heredan por vía materna y que fueron originadas a partir de bacterias simbióticas <sup>259</sup>. Estas organelas son importantes y críticas en relación a funciones bioenergéticas y biosintéticas claves para el funcionamiento normal de las células y la salud humana. Las enfermedades mitocondriales en los seres humanos pueden ser devastadoras y afectar a muchos

tejidos, incluido el sistema nervioso, el corazón y los músculos entre otros <sup>211,281</sup>. Las mitocondrias juegan un papel importante en el cáncer a través de la síntesis macromolecular y la producción de energía <sup>282</sup>.

El análisis de las consecuencias fisiopatológicas de las mutaciones de los genes mitocondriales proporciona nuevos conocimientos sobre la importancia y complejidad de las alteraciones mitocondriales en el cáncer <sup>283</sup>. Existen evidencias de una desregulación en la dinámica mitocondrial, en la masa mitocondrial y la organización espacial subcelular en cáncer <sup>210,259,260</sup>. Por lo tanto, nuestra segunda hipótesis en este trabajo consistió en que los cambios en la expresión de ACSL4 podrían impactar en el metabolismo energético y la función mitocondrial en células tumorales de mama.

Realizamos análisis *in silico* con los datos obtenidos del RNA-seq previamente realizado en nuestro laboratorio, tomando los genes que participan en las funciones mitocondriales. Estos análisis junto con los de IPA, muestran que los niveles de ACSL4 podrían afectar entre otras funciones la bioenergética mitocondrial. Más específicamente, en nuestros resultados, observamos que las células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4, poseen un aumento en los niveles de ARNm en marcadores mitocondriales tales como VDAC-1, NRF-1 y el Complejo III mitocondrial respecto de las células control. Por ende, con el objetivo de confirmar la hipótesis planteada y en base a los resultados obtenidos decidimos estudiar la expresión proteica de dichos marcadores mitocondriales por western blot.

Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de manera estable de ACSL4 en las células MCF-7 induce de manera significativa un aumento en la expresión proteica de NRF-1, VDAC-1 y Complejo III, todos genes relacionados con el metabolismo y función mitocondrial.

NRF-1 es un factor de transcripción clave en el metabolismo mitocondrial el cual regula la expresión de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y en la cadena de transporte de electrones. Distintos estudios demuestran que NRF-1 interactúa con un amplio espectro de factores de transcripción y que su sitio único de reconocimiento de unión al ADN es uno de los siete sitios de unión a factores de transcripción que se encuentran con mayor frecuencia en los promotores proximales de genes ubicuos <sup>284</sup>. NRF-1 se une a elementos de ADN ricos en GC en los promotores de muchos genes nucleares necesarios para la biogénesis mitocondrial y la función respiratoria <sup>285</sup>. Estudios recientes indican que NRF-1 actúa como una oncoproteína que impulsa la carcinogénesis mamaria inducida por estrógenos <sup>286</sup>. Se ha demostrado que, en neuronas corticales primarias, NRF-1 co-regula todas las subunidades del citocromo c

oxidasa (COX). En el músculo, se ha demostrado que NRF-1 es un blanco directo de PGC-1 $\alpha$ , el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial, cuya disfunción se ha implicado en varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson. Es interesante mencionar que, en células de cáncer de mama de fenotipo más agresivo, resistentes a tamoxifeno, se ha detectado un mayor nivel de expresión de NRF-1 <sup>287</sup> en coincidencia con lo observado en nuestros resultados en las células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4, también de fenotipo más agresivo que las MCF-7 control. Sin embargo, conocer el papel que desempeña NRF-1 en el cáncer de mama requiere todavía de más investigación.

Por otro lado, un estudio reciente demostró que existen numerosos sitios de unión de NRF-1 en el promotor del gen VDAC-1 induciendo un aumento de la expresión proteica de este gen luego de la depleción de nutrientes o en situaciones de hipoxia, ambas situaciones compatibles con un ambiente tumoral <sup>288</sup>.

La familia de proteínas VDAC es una familia de proteínas formadoras de poros ubicada en la membrana mitocondrial externada y codificada por genes nucleares. Está formada por tres isoformas: VDAC-1, VDAC-2 y VDAC-3 <sup>289</sup>. Su propiedad de canal asegura el intercambio de metabolitos entre las mitocondrias y el resto de la célula, lo que resulta en la regulación del metabolismo, la bioenergética, y la muerte celular. Dentro de esta familia, VDAC-1 es la isoforma mejor caracterizada y más abundante, y está involucrada en muchas patologías, como cáncer o enfermedades neurodegenerativas <sup>288</sup>. Más aun, es sabido que VDAC es blanco de erastina, proteína inductora del proceso de ferroptosis, el cual es sabido involucra la acción de ACSL4<sup>91,290</sup>. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo de tesis avalan esta posible relación entre ACSL4 y los niveles de VDAC-1 ya que en células de cáncer de mama con alta expresión de ACSL4 se observa un marcado y significativo aumento en los niveles de NRF-1 y de VDAC-1. Estos resultados sugieren que, en situaciones de mayor agresividad tumoral, compatibles con una mayor expresión de ACSL4, el aumento de NRF-1 conllevaría a un aumento en la expresión de VDAC-1. Este aumento de expresión de NRF-1 y VDAC-1, en células de cáncer de mama que sobreexpresan ACSL4 de manera estable, va en línea con lo ya descrito en bibliografía donde se observa un aumento de estas proteínas en distintos tipos tumorales. A su vez, estos resultados resultan de interés y dan base para el trabajo de mi investigación postdoctoral donde estudiaremos la relación entre ACSL4 y ferroptosis, en células de Leydig donde aún no ha sido investigada.

Con respecto al Complejo III mitocondrial, el aumento observado podría también ser inducido por el aumento en la expresión de NRF-1, ya que dicho factor de transcripción puede estimular de manera directa o indirecta la transcripción de los complejos que conforman la CTE mitocondrial <sup>291,292</sup>.

En función a todos los resultados observados en las líneas MCF-7 que sobreexpresan de manera estable a ACSL4 y su respectivo control, decidimos corroborar estos resultados utilizando la línea de cáncer de mama de mayor agresividad MDA-MB-231. En esta línea celular el silenciamiento de la expresión de ACSL4 produjo una disminución significativa de la expresión del Complejo III y la proteína VDAC-1. En conjunto, los resultados observados nos demuestran que efectivamente, ACSL4 está involucrada en cambios en los niveles de expresión de marcadores clásicos mitocondriales en células de cáncer de mama. Los cambios en la expresión de dichos marcadores podrían generar alteraciones en la función y bioenergética mitocondrial.

Debido a esto y en función a los distintos estudios existentes donde se demuestra una relación entre alteraciones en la bioenergética y el metabolismo mitocondrial en células tumorales, procedimos al estudio de la bioenergética en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4 respectivamente. Se realizó un análisis del metabolismo mitocondrial donde medimos TCO en las células la cual nos permitió calcular distintos parámetros respiratorios, entre ellos la respiración basal, la respiración máxima, la respiración no mitocondrial, la producción de ATP, la eficiencia de acoplamiento, la fuga de protones (*proton leak*) y la capacidad de reserva respiratoria. En nuestros resultados, observamos que no existen diferencias significativas en la TCO en aquellas células que sobreexpresan ACSL4 respecto del control, los que nos sugiere que, en condiciones basales, sin la necesidad de requerimientos energéticos, el consumo de oxígeno sería similar.

A continuación, se analizaron distintos parámetros respiratorios. Este análisis no mostró diferencias significativas en la respiración basal, la respiración no mitocondrial, la producción de ATP y la eficiencia de acoplamiento entre las células MCF-7 tet-off/ACSL4 y las células control. Sin embargo, observamos diferencias significativas en parámetros tales como la respiración máxima, la capacidad de reserva respiratoria y el *proton leak*.

La tasa de respiración basal (o también denominada respiración endógena) está formada mayormente por 2 procesos: la respiración necesaria para la síntesis de ATP y aquella asociada a la fuga de protones. Esta respiración basal es calculada luego de remover la contribución de la respiración no mitocondrial al sistema. La proporción de la

respiración basal que es utilizada para la síntesis de ATP es estimada luego de la adición de inhibidor de la ATP sintasa, oligomicina. La magnitud de la respiración insensible a la oligomicina es mayormente generada por la fuga de protones. Por lo tanto, la tasa de respiración basal puede ser alterada y/o modificada en función a la tasa de utilización de ATP, la disponibilidad de sustrato y su respectiva oxidación así también como por la fuga de protones. En nuestros resultados podemos observar que el aumento de ACSL4 no provocó cambios significativos en la producción de ATP ni en la respiración no mitocondrial sostenida por oxidasas citoplasmáticas, tampoco se observaron cambios en la eficiencia de acoplamiento, el cual es un parámetro respiratorio que representa la fracción del consumo mitocondrial de oxígeno utilizada para la síntesis de ATP <sup>293</sup> lo cual correlaciona con que tampoco se observen cambios en la producción de ATP. Si bien la tasa de respiración basal no se modificó por la expresión de ACSL4, sí se afectó la fuga de protones. La OXPHOS es un proceso que no está completamente acoplado, debido a esto, algunos protones se pueden fugar a través de la MMI, independientemente de la ATP sintasa mitocondrial. Esta fuga de protones puede regular varios procesos fisiológicos. Por lo tanto, la fuga de protones o proton leak consiste en la respiración basal restante que no se encuentra acoplada a la producción de ATP. La fuga de protones basal corresponde a la actividad del canal de transporte de nucleótidos (ANT) y de proteínas desacoplantes (UCPs). Es interesante remarcar que mediante estudios bioinformáticos de ARN-seq <sup>152</sup> determinamos que la expresión de ACSL4 provoca el aumento de los ARNm del transportador ANT1 y de la proteína desacoplante UCP2; dos proteínas posiblemente involucradas en el aumento de la fuga de protones en células MCF-7 tet-off/ ACSL4. El incremento significativo, pero moderado, en la fuga de protones en células MCF-7 tet-off /ACSL4 podría deberse al desacople parcial de las mitocondrias con alguna alteración en la disponibilidad de sustrato <sup>293</sup> eventos mediados por ACSL4. Se ha descrito que en células de cáncer de mama de fenotipo agresivo, la fuga de protones está aumentada con respecto a las MCF-7 <sup>287</sup>, células de menor agresividad, lo cual coincide con nuestros resultados en células que sobreexpresan ACSL4.

En relación con los parámetros respiratorios que muestran diferencias significativas, podemos decir que, la respiración máxima consiste en la tasa máxima de consumo de oxígeno obtenida al agregar un desacoplante, en nuestro caso FCCP. El FCCP imita una "demanda de energía" fisiológica al estimular la cadena respiratoria para que funcione a su máxima capacidad, lo que provoca una rápida oxidación de los sustratos (azúcares, grasas y aminoácidos) para hacer frente a este desafío metabólico. Por lo tanto, la respiración máxima nos muestra la máxima tasa de respiración que la

célula puede alcanzar. Es muy importante titular correctamente el desacoplante, para poder conseguir una respiración máxima controlada sin provocar una caída drástica del potencial de membrana mitocondrial. Esta tasa de respiración máxima depende en mayor medida de la disponibilidad de sustrato y su respectiva oxidación. Luego de la adición del FCCP observamos una mayor respiración máxima en células MCF-7 tet-off/ACSL4 respecto de las células control. Estos resultados indican que, ante un aumento en la demanda de energía, las células con mayor nivel de expresión de ACSL4, están mejor preparadas para utilizar y oxidar más cantidad de sustrato y aumentar la tasa de respiración máxima. Una mayor expresión de ACSL4 proporciona a las células un fenotipo más agresivo, como ya hemos discutido, por lo tanto, la respiración máxima aumentada permitiría sostener los requerimientos energéticos de las células de mayor agresividad con altas tasas de proliferación, invasión y migración. Este hecho correlaciona con nuestra observación en la inducción del Complejo III de la cadena de transporte de electrones mediada por la expresión de ACSL4 y con el hecho de que varios complejos de la CTE están siendo actualmente estudiados como nuevos blancos de las terapias contra el cáncer <sup>294</sup>. Los resultados observados, por lo tanto, indican que la presencia de ACSL4 provoca un aumento moderado y significativo en la fuga de protones y la máxima capacidad respiratoria, y que estos cambios no llegan a afectar la tasa de respiración basal ni la síntesis de ATP. Esta situación ya ha sido reportada en la literatura, dado que la respiración basal depende de las demandas de ATP, pero no depende de pequeños cambios en la fuga de protones o en la máxima capacidad respiratoria <sup>293</sup>.

Durante condiciones normales (sin estrés), la célula funciona con una fracción de su capacidad bioenergética mitocondrial, donde la diferencia entre la respiración basal y la respiración en su nivel máximo o tasa de respiración máxima constituye la reserva mitocondrial también denominada capacidad de reserva respiratoria o de repuesto (CRR). Conceptualmente, la CRR provee la ventaja de indicar cuán cerca de su límite bioenergético se encuentran las células, frente a determinadas condiciones en su medio ambiente. Se ha observado, por ejemplo, que los hepatocitos solo usan aproximadamente el 30% de su capacidad respiratoria máxima para mantener la respiración basal <sup>295</sup>. En el caso de que la demanda de energía exceda la oferta, la CRR tiene el potencial de aumentar la oferta, evitando así una "crisis de ATP" <sup>296</sup>. Por lo tanto, el aumento observado en la capacidad de reserva respiratoria nos sugiere que las células que sobreexpresan ACSL4 poseen una mayor capacidad de responder ante una demanda energética durante una situación de estrés, cuando aumenta la demanda de ATP y la oxidación de los sustratos oxidables se vuelve limitante. El hecho de que

ACSL4 promueva el aumento en la expresión de NRF-1, VDAC-1 y del Complejo III, podría facilitar la oxidación de los sustratos de la CTE y de forma de aumentar la capacidad de respuesta ante un incremento en la demanda energética.

La CRR es regulada por diversos mecanismos, entre los cuales la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR es uno de los principales. Se ha demostrado en los hepatocitos, que la incubación con IGF-1 a través de la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR provoca un aumento significativo de la CRR, así como una regulación positiva de la glucólisis. A su vez, la eliminación de PTEN, un regulador negativo de la vía PI3K/AKT, provoca un incremento en la CRR y en la glucólisis, comparado con las células controles, con expresión de PTEN <sup>297</sup>. La activación de la cascada de señalización de PI3K/AKT tras la incubación con factores de crecimiento como PDGF, 51 G-CSF52 o IGF-153 también da como resultado un aumento, dependiente de la dosis, en los niveles de CRR. La inhibición farmacológica de la vía PI3K/AKT/mTOR provoca la reducción significativa de la CRR, en las neuronas corticales <sup>297</sup>. Existen varias explicaciones posibles para el aumento en los niveles de CRR dependiente de PI3K/AKT/mTOR. La activación de PI3K/AKT/mTOR puede potenciar (i) la masa mitocondrial y/o la expresión de proteínas específicas de la CTE; por ejemplo, se ha demostrado que mTOR regula positivamente los reguladores transcripcionales de la biogénesis mitocondrial, incluyendo PGC1- $\alpha$ 55 y la expresión de componentes codificados por el núcleo del complejo I; (ii) la actividad de enzimas críticas (Complejo I, III, IV) de la cadena de transporte de electrones o (iii) la utilización de piruvato. Dado que resultados de nuestro laboratorio han demostrado que ACSL4 produce un aumento en la vía mTOR en células de cáncer de mama <sup>97</sup>, es lógico pensar que el aumento en la CRR en células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 esté mediado, al menos en parte, por la activación de la vía de mTOR.

Existe evidencia reciente que muestra que la CRR también podría desempeñar un papel importante en el metabolismo de las células cancerosas. De hecho, se ha establecido que la glucólisis no es el fenotipo metabólico único de las células cancerosas y que el metabolismo mitocondrial puede proporcionar la energía y las necesidades anabólicas para la oncogénesis, el desarrollo metastásico y la aparición de resistencia a los medicamentos contra el cáncer. Mas aun, durante la progresión neoplásica, las células cancerosas muestran un aumento progresivo en los niveles de CRR que refleja un metabolismo más oxidativo potencialmente necesario para responder a la creciente demanda de energía. Por ejemplo, la invasión tumoral se asocia con un aumento de CRR en el cáncer de ovario debido a la mejora del metabolismo del piruvato. De este modo, nuestros resultados amplían los conocimientos sobre los mecanismos por los que

ACSL4 promueve la agresividad tumoral, promoviendo en este caso características bioenergéticas de las células tumorales que favorecen su sostenimiento y plasticidad. Además, niveles bajos de CRR son vistos como signos de debilidad metabólica en células tumorales, lo que refleja, en parte, la falta de capacidad de adaptar el metabolismo mitocondrial a condiciones de estrés.<sup>298</sup>.

Por lo tanto, los resultados en relación a la bioenergética mitocondrial de células de cáncer de mama MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4 sugieren, en su conjunto, que las células con mayor expresión de ACSL4 responden con mayor eficiencia a demandas energéticas y/o situaciones de estrés celular, lo que correlaciona con su mayor nivel de agresividad asociado a una mayor tasa de proliferación, migración e invasión.

Con el objetivo de terminar de definir el rol de ACSL4 en la función y metabolismo mitocondrial seguimos realizando ensayos que nos ayuden a comprender mejor este proceso.

La glicólisis se ha considerado durante mucho tiempo como el principal proceso metabólico para la producción de energía y el crecimiento anabólico en las células cancerosas. Hace décadas, tras el descubrimiento del efecto Warburg, distintos estudios realizados demostraron y sugirieron que los defectos en la respiración mitocondrial pueden ser la causa subyacente del cáncer. Además de ejercer funciones bioenergéticas centrales, las mitocondrias proporcionan las bases para el anabolismo tumoral, controlan la homeostasis redox y del metabolismo de calcio, participan en la regulación transcripcional y gobiernan la muerte celular. Debido a esto, en base a los resultados obtenidos en los marcadores mitocondriales y en el estudio de bioenergética, utilizando nuevamente las células MCF-7 tet-off control y MCF-7 tet-off/ACSL4 decidimos evaluar si la actividad mitocondrial se encontraba afectada. Logramos demostrar, mediante el uso de MitoTracker Red, que la sobreexpresión de ACSL4 aumenta de manera significativa la actividad mitocondrial en estas células de cáncer de mama. La acumulación intramitocondrial de este colorante, depende del potencial de membrana mitocondrial, el cual observamos que se encuentra aumentado en células con mayores niveles de ACSL4. Por otro lado, con el objetivo de corroborar estos resultados, utilizamos la línea de mayor agresividad MDA-MB-231 y de expresión basal mayor de ACSL4. En esta línea, el silenciamiento de la expresión de la enzima indujo una disminución en la actividad mitocondrial. Estos resultados corroboran, por tanto, lo observado en las MCF-7 tet-off/ACSL4. Se ha demostrado que las mitocondrias contribuyen a la tumorigénesis a través de variaciones en biogénesis mitocondrial,



dinámica de fusión- fisión, muerte celular, estrés oxidativo, metabolismo y bioenergética mitocondrial, señalización y ADN mitocondrial <sup>210</sup>. En muchos tumores, como ya fue mencionado antes, la principal fuente de ATP es la glucólisis y la contribución mitocondrial de ATP es limitada, aunque no inexistente. Como resultado, el potencial de membrana mitocondrial en tumores es mayor que en las células normales <sup>299</sup>. Nuestros resultados correlacionan con lo observado por otros grupos ya que demuestran que el potencial de membrana mitocondrial es mayor en células con altos niveles de expresión de ACSL4, lo que coincide con una mayor agresividad tumoral.

El genoma mitocondrial contiene ADN circular no metilado de 16.6 kb bicatenario y, a diferencia del genoma nuclear, que contiene solo dos copias por célula, contiene múltiples copias por célula, según el tipo y el origen del celular <sup>300</sup>. El ADNmt es altamente susceptible al estrés oxidativo, que puede conducir a una disfunción mitocondrial, caracterizada por una pérdida de eficiencia en la CTE y una reducción en la producción de energía <sup>300</sup>. En línea con estos conocimientos, analizamos parámetros mitocondriales tales como el ADNmt y la masa mitocondrial como índice de biogénesis o mitofagia. Con respecto a la masa total de mitocondrias de las células MCF-7, observamos que ACSL4 provoca una disminución en su cantidad sin afectar el nivel de ADNmt total, lo cual indicaría que las mitocondrias pueden incrementar el número de copias de ADN por mitocondria. Además, pudimos comprobar que en la línea MDA- MB-231, el silenciamiento de ACSL4 genera un aumento de la masa mitocondrial. Este resultado corrobora lo obtenido en las células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4.

Por ende, estos resultados nos sugieren que ACSL4 posee un rol en el mantenimiento de la masa mitocondrial en las células de cáncer de mama en estudio; y que, a su vez, dicho rol difiere según la agresividad celular.

Dado que los cambios en la masa mitocondrial corresponden a un balance entre la biogénesis mitocondrial, con un aumento en el número de mitocondrias, y el mecanismo de mitofagia que lleva a una disminución el número de mitocondrias, decidimos profundizar nuestros estudios. Para esto, utilizando las células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 y su control, evaluamos mediante la técnica de inmunofluorescencia al marcador mitocondrial TOM20. Nuestros resultados demuestran que ACSL4 induce una disminución en los niveles de expresión de TOM20. Esta proteína mitocondrial ha sido previamente reportada como un marcador de mitofagia por varios grupos de estudio. Se sabe que previo al inicio de la mitofagia TOM20 disminuye su nivel de expresión <sup>262,301</sup>, por tal motivo también puede ser utilizado como un marcador de masa mitocondrial. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que

ACSL4 podría estar estimulando el mecanismo de mitofagia, en coincidencia con nuestros resultados de ACSL4 y su rol sobre la masa mitocondrial. Sin embargo, para corroborar efectivamente si el descenso en el número de mitocondrias es debido a este mecanismo, debemos continuar y profundizar aún más nuestros estudios, utilizando otros marcadores de mitofagia clásicos.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta segunda parte de este trabajo de tesis doctoral, podemos decir que ACSL4 juega un rol en el balance entre la mitofagia y la biogénesis mitocondrial, favoreciendo la mitofagia, probablemente en mitocondrias que ya estaban destinadas a ser eliminadas, pero provocando que otro *pool* de mitocondrias aumente la velocidad de la CTE, con mayor capacidad de respuesta a la demanda energética en la célula. Es decir que, en células de cáncer de mama, ACSL4 estimula un mayor recambio mitocondrial el cual estaría asociado y sería necesario para una mayor agresividad tumoral y una mejor respuesta metabólica ante situaciones de estrés.

*Conclusiones*

## *Conclusiones*

El trabajo de tesis doctoral presentado se dividió en 2 objetivos específicos. En cuanto a los mismos las conclusiones obtenidas son:

### *Del objetivo específico N°1*

En función a los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo de tesis doctoral podemos concluir que:

- ✚ La proteína ACSL4 es menos estable en líneas tumorales mamarias ER+ (MCF-7) que en líneas TNBC (MDA-MB-231).
- ✚ El mecanismo de ubiquitinación seguido de degradación proteica en el proteasoma está involucrado y juega un rol fundamental en los niveles proteicos de ACSL4 y por consiguiente en su estabilidad.
- ✚ ACSL4 presenta en su secuencia al menos dos lisinas, en las posiciones 621 y 702 con un rol clave en la ubiquitinación de la enzima y su estabilidad.
- ✚ Existe una interacción entre ACSL4 y la E3- ubiquitina ligasa Parkina, sugiriendo que ACSL4 podría ser sustrato de ubiquitinación por dicha ligasa.
- ✚ En la línea MDA-MB-231, ACSL4 sería ubiquitinada por otra E3- ligasa distinta de Parkina la cual debe ser estudiada en un futuro, debido a la baja expresión reportada en otros estudios de esta ligasa en este modelo celular.
- ✚ ACSL4 se ubiquitina tanto en la línea MDA-MB-231 (TNBC) y MCF-7 (ER+), sin embargo, la ubiquitinación parecería ser mayor en la línea ER+ donde ACSL4 posee una menor estabilidad, sin embargo, se deben profundizar estos estudios a futuro.
- ✚ ACSL4 sería fosforilada en tirosinas. LA fosforilación fue observada en ambas líneas tumorales de distinta agresividad. Sin embargo, la relevancia de esta

modificación post-traducciona así como la descripción de los sitios de fosforilación de la enzima requiere más estudio.

En conjunto estos resultados comprueban la existencia de una regulación post-traducciona diferencial de ACSL4 en células de cáncer de mama de distinta agresividad, donde el proteasoma tendría un rol crucial.

### *Del objetivo específico N°2*

En relación con el rol de ACSL4 y el metabolismo mitocondria, podemos concluir que:

- ✚ ACSL4 induce directa e indirectamente un aumento en los niveles de expresión de marcadores clásicos relacionados a funciones mitocondriales tales como: NRF-1, VDAC-1, y Complejo III de la Cadena Respiratoria.
- ✚ La inducción por ACSL4 de la expresión de NRF-1, factor de transcripción clave en el metabolismo y biogénesis mitocondria, sería responsable de la estimulación de los marcadores mitocondriales mencionados, como el Complejo III y VDAC-1 en la línea MCF-7. Estos resultados avalan en el modelo de células, el aumento del ARNm observado a través del estudio del RNA-seq, realizado previamente en el laboratorio.
- ✚ En células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4, esta enzima no genera cambios significativos en la Tasa de Consumo de Oxígeno respecto de las células control.
- ✚ La sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7 no afecta la respiración basal, la síntesis de ATP y la respiración mitocondria, respecto de las células control que no sobreexpresan la enzima.
- ✚ La sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7 induce un aumento significativo de la respiración máxima, la capacidad de reserva respiratoria y la fuga de protones, respecto de células control.

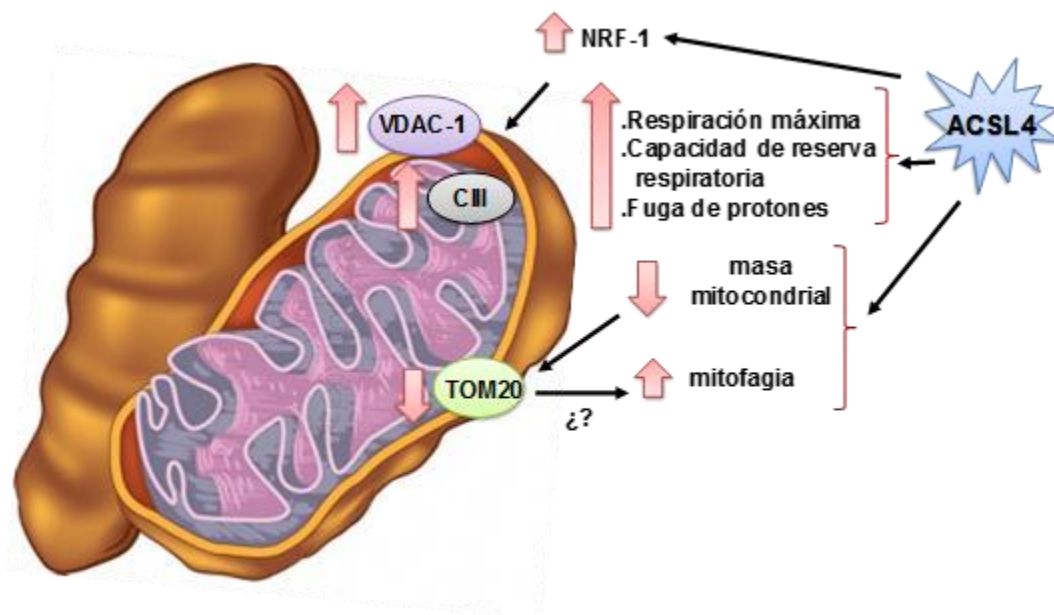
- ✚ El aumento en la respiración máxima estaría relacionado con diferencias en la disponibilidad de sustrato y con la inducción de los complejos de la cadena de transporte de electrones, entre ellos el Complejo III, promovida por la expresión de ACSL4.
- ✚ ACSL4 juega un rol clave ante la demanda energética de las células y la oxidación más rápida de los sustratos disponibles (azúcares, grasas y aminoácidos) para hacer frente a este desafío metabólico, lo cual resulta fundamental para el establecimiento tumoral.
- ✚ El aumento de la fuga de protones mediado por ACSL4 involucraría la actividad de las proteínas ANT1 y UCP2, según lo observado en el RNA-seq. incrementan su expresión por ACSL4.
- ✚ La sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7 correlaciona con un aumento en la actividad mitocondrial, en coincidencia con el aumento de NRF-1 y proteínas de los complejos de la cadena de transporte de electrones, así también con lo observado en los parámetros respiratorios.
- ✚ ACSL4 provoca una disminución en la masa total de mitocondrias sin afectar el nivel de ADNmt total, lo cual indica que podría existir un proceso de compensación en el número de copias de ADNmt por unidad de mitocondria.
- ✚ ACSL4 induce una disminución en el marcador mitocondrial TOM20, lo que sugiere que ACSL4 podría disminuir la masa mitocondrial, al menos en parte, a través de la activación de la mitofagia.

En conjunto se desprende que ACSL4 juega un rol en el balance entre la mitofagia y la biogénesis mitocondrial, favoreciendo la mitofagia, probablemente en mitocondrias que ya estaban destinadas a ser eliminadas, pero provocando que otro *pool* de mitocondrias aumente la velocidad de la cadena de transporte de electrones, con mayor capacidad de respuesta a la demanda energética en la célula.

Observamos que las células de cáncer de mama que sobreexpresan ACSL4 muestran un aumento en la actividad mitocondrial pero no observamos cambios en la cantidad de ADN mitocondrial respecto del control. Es probable que ACSL4 promueva

una mayor actividad de la cadena de transporte de electrones a expensas de su desacople con la fosforilación oxidativa.

Todos estos datos obtenidos sugieren que ACSL4, enzima que se presenta con un mayor nivel de expresión en células de cáncer de mama más agresivas, estimula un mayor recambio mitocondrial y responde mejor a situaciones de mayor demanda energética lo que le proporciona una mayor capacidad de invasión, migración y proliferación en este modelo celular (Figura 44).



**Figura 44. Esquema representativo del rol de ACSL4 con relación al metabolismo mitocondrial**

# *Referencias*



## REFERENCIAS

1. Lopes-Marques M, Machado AM, Ruivo R, Fonseca E, Carvalho E, Castro LFC. Expansion, retention and loss in the Acyl-CoA synthetase “Bubblegum” (Acsbg) gene family in vertebrate history. *Gene*. Published online 2018. doi:10.1016/j.gene.2018.04.058
2. Fullekrug J, Poppelreuther M. Measurement of Long-Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase Activity. *Methods Mol Biol*. 2016;1376:43-53. doi:10.1007/978-1-4939-3170-5\_5
3. Knudsen TB, Gray MK, Church JK, et al. Early postimplantation embryo lethality in mice following in utero inhibition of adenosine deaminase with 2'-deoxycytosine. *Teratology*. 1989;40(6):615-626. doi:10.1002/tera.1420400609
4. Faergeman NJ, Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J*. 1997;323 ( Pt 1):1-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9173866>
5. Soupene E, Kuypers FA. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med*. 2008;233(5):507-521. doi:10.3181/0710-MR-287
6. Orlando U, Cooke M, Cornejo Maciel F, Papadopoulos V, Podestá EJ, Maloberti P. Characterization of the mouse promoter region of the acyl-CoA synthetase 4 gene: Role of Sp1 and CREB. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;369(1-2). doi:10.1016/j.mce.2013.01.016
7. Lewin TM, Kim JH, Granger DA, Vance JE, Coleman RA. Acyl-CoA Synthetase Isoforms 1, 4, and 5 are Present in Different Subcellular Membranes in Rat Liver and Can Be Inhibited Independently. *J Biol Chem*. Published online 2001. doi:10.1074/jbc.M102036200
8. Kuwata H, Hara S. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2019;144:1-27. doi:10.1016/j.prostaglandins.2019.106363
9. Castillo AF, Orlando UD, Maloberti PM, et al. New inhibitor targeting Acyl-CoA synthetase 4 reduces breast and prostate tumor growth, therapeutic resistance and steroidogenesis. *Cell Mol Life Sci*. Published online 2020. doi:10.1007/s00018-020-03679-5
10. Mashek DG, Bornfeldt KE, Coleman RA, et al. Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *J Lipid Res*. 2004;45(10):1958-1961. doi:10.1194/jlr.E400002-JLR200
11. Kang MJ, Fujino T, Sasano H, et al. A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):2880-2884. doi:0.1073/pnas.94.7.2880

12. Oikawa E, Iijima H, Suzuki T, et al. A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *J Biochem.* 1998;124(3):679-685. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722683>
13. Soupene E, Kuypers FA. Multiple erythroid isoforms of human long-chain acyl-CoA synthetases are produced by switch of the fatty acid gate domains. *BMC Mol Biol.* 2006;7:21. doi:10.1186/1471-2199-7-21
14. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med.* 2008;14(10):461-469. doi:10.1016/j.molmed.2008.08.005
15. Sakai M, Kakutani S, Horikawa C, et al. Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies. *BMC Cancer.* 2012;12:606. doi:10.1186/1471-2407-12-606
16. Bills TK, Smith JB, Silver MJ. Selective release of arachidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin. *J Clin Invest.* 1977;60(1):1-6. doi:10.1172/JCI108745
17. Minekura H, Kang MJ, Inagaki Y, et al. Exon/intron organization and transcription units of the human acyl-CoA synthetase 4 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286(1):80-86. doi:10.1006/bbrc.2001.5357
18. Hisanaga Y, Ago H, Nakagawa N, et al. Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *J Biol Chem.* 2004;279(30):31717-31726. doi:10.1074/jbc.M400100200
19. Kang MJ, Fujino T, Sasano H, et al. A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):2880-2884. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096315>
20. Cao Y, Murphy KJ, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS Lett.* 2000;467(2-3):263-267.
21. Maloberti P, Castilla R, Castillo F, et al. Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS J.* 2005;272(7). doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04616.x
22. Maloberti PM, Duarte AB, Orlando UD, et al. Functional interaction between acyl-coa synthetase 4, lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in the aggressive phenotype of breast cancer cells. *PLoS One.* 2010;5(11):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0015540
23. Seeger DR, Murphy CC, Murphy EJ. Astrocyte arachidonate and palmitate uptake and metabolism is differentially modulated by dibutyryl-cAMP treatment. *Prostaglandins*

- Leukot Essent Fat Acids*. 2016;110:16-26. doi:10.1016/j.plefa.2016.05.003
24. Wieckowski MRMR, Giorgi C, Lebiezinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc*. Published online 2009. doi:10.1038/nprot.2009.151
  25. Radif Y, Ndiaye H, Kalantzi V, et al. The endogenous subcellular localisations of the long chain fatty acid-activating enzymes ACSL3 and ACSL4 in sarcoma and breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*. Published online 2018. doi:10.1007/s11010-018-3332-x
  26. Duarte A, Poderoso C, Cooke M, et al. Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis. *PLoS One*. 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045829
  27. Gelmetti V, De Rosa P, Torosantucci L, et al. PINK1 and BECN1 relocalize at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation. *Autophagy*. 2017;13(4):654-669. doi:10.1080/15548627.2016.1277309
  28. Küch EM, Vellaramkalayil R, Zhang I, et al. Differentially localized acyl-CoA synthetase 4 isoenzymes mediate the metabolic channeling of fatty acids towards phosphatidylinositol. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. Published online 2014. doi:10.1016/j.bbalip.2013.10.018
  29. Khan WA, Blobe GC, Hannun YA. Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell Signal*. 1995;7(3):171-184. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7662506>
  30. McPhail LC, Clayton CC, Snyderman R. A potential second messenger role for arachidonic acid: activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase. *Trans Assoc Am Physicians*. 1984;97:222-231. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6242084>
  31. Murakami K, Routtenberg A. Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca<sup>2+</sup>. *FEBS Lett*. 1985;192(2):189-193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934001>
  32. Nomura T, Ogata H. Distribution of prostaglandins in the animal kingdom. *Biochim Biophys Acta*. 1976;431(1):127-131. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5152>
  33. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem*. Published online 2007. doi:10.1074/jbc.M703169200
  34. Klett EL, Chen S, Edin ML, et al. Diminished Acyl-CoA synthetase isoform 4 activity in INS 832/13 cells reduces cellular epoxyeicosatrienoic acid levels and results in impaired glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*. Published online 2013. doi:10.1074/jbc.M113.481077

35. Klett EL, Chen S, Yechool A, Lih FB, Coleman RA. Long-chain acyl-CoA synthetase isoforms differ in preferences for eicosanoid species and long-chain fatty acids. *J Lipid Res*. Published online 2017. doi:10.1194/jlr.M072512
36. Fitzpatrick FA, Soberman R. Regulated formation of eicosanoids. *J Clin Invest*. 2001;107(11):1347-1351. doi:10.1172/JCI13241
37. Maloberti P, Maciel FC, Castillo AF, et al. Enzymes involved in arachidonic acid release in adrenal and Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;265-266:113-120. doi:10.1016/j.mce.2006.12.026
38. Manna PR, Stetson CL, Slominski AT, Pruitt K. Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. *Endocrine*. 2016;51(1):7-21. doi:10.1007/s12020-015-0715-6
39. Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1990;37(3):395-403. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2257243>
40. Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: biosynthesis and function. *Crit Rev Neurobiol*. 1995;9(4):383-394. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8829852>
41. Reddy DS, Estes WA. Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(7):543-561. doi:10.1016/j.tips.2016.04.003
42. Tatiana Z. Gonadal Sex Steroids: Production, Action and Interactions in Mammals. In: *Steroids - From Physiology to Clinical Medicine*. ; 2012. doi:10.5772/52994
43. Cooke BA, van der Kemp AJ. Protein kinase activity in rat testis interstitial tissue. Effect of luteinizing hormone and other factors. *Biochem J*. 1976;154(2):371-378. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/180976>
44. Podesta EJ, Dufau ML, Catt KJ. Characterization of two forms of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase in rat testicular interstitial cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1976;5(1-2):109-122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/182570>
45. Podesta EJ, Dufau ML, Catt KJ. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase of rat Leydig cells: physical characteristics of two holoenzymes and their subunits. *Biochemistry*. 1978;17(8):1566-1573. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/206280>
46. Privalle CT, Crivello JF-, Jefcoate CR. Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(February):702-706. doi:10.1073/pnas.80.3.702
47. Sluchanko NN, Tugaeva K V, Maksimov EG. Solution structure of human steroidogenic acute regulatory protein STARD1 studied by small-angle X-ray scattering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;489(4):445-450. doi:10.1016/j.bbrc.2017.05.167

48. Jefcoate C. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. *J Clin Invest.* 2002;110(7):881-890. doi:10.1172/JCI16771
49. Crivello JF, Jefcoate CR. Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetics and effects of inhibitors. *J Biol Chem.* 1980;255(17):8144-8151. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6251046>
50. Karaboyas GC, Koritz SB. The Transformation of Delta-5-Pregnenolone and Progesterone to Cortisol by Rat Adrenal Slices and the Effect of Acth and Adenosine 3',5'-Monophosphate Upon It. *Biochim Biophys Acta.* 1965;100:600-602. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14347959>
51. Lambeth JD, Xu XX, Glover M. Cholesterol sulfate inhibits adrenal mitochondrial cholesterol side chain cleavage at a site distinct from cytochrome P-450<sub>scc</sub>. Evidence for an intramitochondrial cholesterol translocator. *J Biol Chem.* 1987;262(19):9181-9188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597410>
52. Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:193-213. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.193
53. Krueger RJ, Orme-Johnson NR. Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein. *J Biol Chem.* 1983;258(16):10159-10167. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6309771>
54. Stocco DM, Kilgore MW. Induction of mitochondrial proteins in MA-10 Leydig tumour cells with human choriogonadotropin. *Biochem J.* 1988;249(1):95-103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2829853>
55. Epstein LF, Orme-Johnson NR. Acute action of luteinizing hormone on mouse Leydig cells: accumulation of mitochondrial phosphoproteins and stimulation of testosterone synthesis. *Mol Cell Endocrinol.* 1991;81(1-3):113-126. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1797581>
56. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol.* 2000;164(3):247-253. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694364>
57. Lacapere JJ, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids.* 2003;68(7-8):569-585. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957662>
58. Nishikawa T, Omura M, Noda M, Yoshida S. Possible involvement of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in the regulation of pregnenolone synthesis in bovine adrenocortical mitochondria. *J Biochem.* 1994;116(4):833-837. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7883758>
59. Omura M, Hirai A, Tamura Y, Yoshida S. Transformation of arachidonic acid by 5- and

- 15-lipoxygenase pathways in bovine adrenal fasciculata cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 1990;40(2):93-102. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2385616>
60. Wang XJ, Dyson MT, Jo Y, Eubank DW, Stocco DM. Involvement of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cyclic AMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;85(2-5):159-166.
61. Paz C, Cornejo Maciel F, Gorostizaga A, et al. Role of Protein Phosphorylation and Tyrosine Phosphatases in the Adrenal Regulation of Steroid Synthesis and Mitochondrial Function. *Front Endocrinol*. 2016;7(60):1-15. doi:10.3389/fendo.2016.00060
62. Wang X, Shen CL, Dyson MT, et al. The involvement of epoxygenase metabolites of arachidonic acid in cAMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *J Endocrinol*. 2006;190(3):871-878. doi:10.1677/joe.1.06933
63. Bollag WB. Role of phospholipases in adrenal steroidogenesis. *J Endocrinol*. 2016;229(1):R29-41. doi:10.1530/JOE-16-0007
64. Maloberti P, Lozano RC, Mele PG, et al. Concerted regulation of free arachidonic acid and hormone-induced steroid synthesis by acyl-CoA thioesterases and acyl-CoA synthetases in adrenal cells. *Eur J Biochem*. 2002;269(22):5599-5607. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03267.x
65. Castillo AF, Cornejo Maciel F, Castilla R, et al. cAMP increases mitochondrial cholesterol transport through the induction of arachidonic acid release inside this organelle in Leydig cells. *FEBS J*. 2006;273(22):5011-5021. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05496.x
66. Cornejo Maciel F, Maloberti P, Neuman I, et al. An arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase is a hormone-dependent and obligatory protein in the signal transduction pathway of steroidogenic hormones. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(3):655-666. doi:10.1677/jme.1.01691
67. Finkielstein CV, Maloberti P, Mendez CF, Podestá EJ. A novel Arachidonic acid-Related Thioesterase Involved in acute Steroidogenesis. *Endocr Res*. 1998;24(3-4). doi:10.3109/07435809809032616
68. Svensson LT, Engberg ST, Aoyama T, Usuda N, Alexson SE, Hashimoto T. Molecular cloning and characterization of a mitochondrial peroxisome proliferator-induced acyl-CoA thioesterase from rat liver. *Biochem J*. 1998;329 ( Pt 3):601-608. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445388>
69. Hunt MC, Alexson SE. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog Lipid Res*. 2002;41(2):99-130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755680>

70. Grevengoed TJ, Klett EL, Coleman RA. Acyl-CoA metabolism and partitioning. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:1-30. doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105541
71. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, et al. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci.* Published online 2006. doi:10.1016/j.tips.2006.06.005
72. Kolmer M, Rovio A, Alho H. The characterization of two diazepam binding inhibitor (DBI) transcripts in humans. *Biochem J.* 1995;306 ( Pt 2:327-330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534063>
73. Gwynne JT, Hess B. The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis. *J Biol Chem.* 1980;255(22):10875-10883. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253490>
74. Knudsen J, Hojrup P, Hansen HO, Hansen HF, Roepstorff P. Acyl-CoA-binding protein in the rat. Purification, binding characteristics, tissue concentrations and amino acid sequence. *Biochem J.* 1989;262(2):513-519. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2803267>
75. Papadopoulos V. Structure and function of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;217(2):130-142. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9452136>
76. Papadopoulos V, Lecanu L, Brown RC, Han Z, Yao ZX. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience.* 2006;138(3):749-756. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.05.063
77. Veenman L, Gavish M. The role of 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) in programmed cell death, and effects of steroids on TSPO expression. *Curr Mol Med.* 2012;12(4):398-412. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348610>
78. Maloberti P, Mele PG, Neuman I, et al. Regulation of arachidonic acid release in steroidogenesis: Role of a new ACYL-CoA thioesterase (ARTIST). *Endocr Res.* 2000;26(4):653-662. doi:10.3109/07435800009048585
79. Castilla R, Gadaleta M, Castillo AF, et al. New enzymes involved in the mechanism of action of epidermal growth factor in a clonal strain of Leydig tumor cells. *Endocrinology.* 2008;149(7):3743-3752. doi:10.1210/en.2007-1580
80. Miyares RL, Stein C, Renisch B, Anderson JL, Hammerschmidt M, Farber SA. Long-chain Acyl-CoA synthetase 4A regulates Smad activity and dorsoventral patterning in the zebrafish embryo. *Dev Cell.* 2013;27(6):635-647. doi:10.1016/j.devcel.2013.11.011
81. Golej DL, Askari B, Kramer F, et al. Long-chain acyl-CoA synthetase 4 modulates

- prostaglandin E 2 release from human arterial smooth muscle cells . *J Lipid Res*.  
Published online 2011. doi:10.1194/jlr.m013292
82. Askari B, Kanter JE, Sherrid AM, et al. Rosiglitazone inhibits acyl-CoA synthetase activity and fatty acid partitioning to diacylglycerol and triacylglycerol via a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism in human arterial smooth muscle cells and macrophages. *Diabetes*. 2007;56(4):1143-1152. doi:10.2337/db06-0267
  83. Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, et al. FAACL4, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. *Genomics*. Published online 1998. doi:10.1006/geno.1997.5104
  84. Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I. Non-syndromic X-linked mental retardation: From a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol*. Published online 2005. doi:10.1002/jcp.20296
  85. Zhang Y, Chen D, Wang Z. Analyses of mental dysfunction-related ACSL4 in Drosophila reveal its requirement for Dpp/BMP production and visual wiring in the brain. *Hum Mol Genet*. 2009;18(20):3894-3905. doi:10.1093/hmg/ddp332
  86. Cao Y, Dave KB, Doan TP, Prescott SM. Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2001;61(23):8429-8434.
  87. Sun XJ, Xu GL. Overexpression of Acyl-CoA Ligase 4 (ACSL4) in Patients with Hepatocellular Carcinoma and its Prognosis. *Med Sci Monit*. 2017;23:4343-4350. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28887439>
  88. Wu X, Li Y, Wang J, et al. Long chain fatty Acyl-CoA synthetase 4 is a biomarker for and mediator of hormone resistance in human breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(10):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0077060
  89. Orlando UD, Castillo AF, Medrano MAR, Solano AR, Maloberti PM, Podesta EJ. Acyl-CoA synthetase-4 is implicated in drug resistance in breast cancer cell lines involving the regulation of energy-dependent transporter expression. *Biochem Pharmacol*. 2019;159:52-63. doi:10.1016/J.BCP.2018.11.005
  90. Yuan H, Li X, Zhang X, Kang R, Tang D. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(3):1338-1343. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.124
  91. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol*. 2017;13(1):91-98. doi:10.1038/nchembio.2239
  92. Feng J, Lu P zhi, Zhu G zhi, et al. ACSL4 is a predictive biomarker of sorafenib sensitivity in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*. Published online 2020.



- doi:10.1038/s41401-020-0439-x
93. Lei P, Bai T, Sun Y. Mechanisms of ferroptosis and relations with regulated cell death: A review. *Front Physiol*. Published online 2019. doi:10.3389/fphys.2019.00139
  94. Gao M, Yi J, Zhu J, et al. Role of Mitochondria in Ferroptosis. *Mol Cell*. Published online 2019. doi:10.1016/j.molcel.2018.10.042
  95. Li Y, Feng D, Wang Z, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. *Cell Death Differ*. Published online 2019. doi:10.1038/s41418-019-0299-4
  96. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol*. 2016;26(3):165-176. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.014
  97. Orlando UD, Castillo AF, Dattilo MA, Solano AR, Maloberti PM, Podesta EJ. Acyl-CoA synthetase-4, a new regulator of mTOR and a potential therapeutic target for enhanced estrogen receptor function in receptor-positive and -negative breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6(40):42632-42650. doi:10.18632/oncotarget.5822
  98. Wu X, Deng F, Li Y, et al. ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance. *Oncotarget*. 2015;6(42):44849-44863. doi:10.18632/oncotarget.6438
  99. Zhu P, Fan Z. Cancer stem cells and tumorigenesis. *Biophys Reports*. Published online 2018. doi:10.1007/s41048-018-0062-2
  100. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Essential Concepts in Molecular Pathology*.; 2010. doi:10.1016/C2009-0-01712-7
  101. Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res*. 2015;56(5):403-413. doi:10.3109/03008207.2015.1060970
  102. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. Published online 2000. doi:10.1016/S0098-2997(00)00007-8
  103. Brabletz T. EMT and MET in Metastasis: Where Are the Cancer Stem Cells? *Cancer Cell*. Published online 2012. doi:10.1016/j.ccr.2012.11.009
  104. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol*. Published online 2020. doi:10.1016/j.tranon.2020.100773
  105. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
  106. Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*. 2007;369(9574):1742-1757. doi:10.1016/S0140-6736(07)60781-8

107. Zanotti S, Canalis E. Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders. *Calcif Tissue Int.* 2012;90(2):69-75. doi:10.1007/s00223-011-9541-x
108. Haraguchi M. The role of the transcriptional regulator snail in cell detachment, reattachment and migration. *Cell Adh Migr.* 2009;3(3):259-263. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287205>
109. Carvalho LV de, Pereira EM, Frappart L, et al. Molecular characterization of breast cancer in young Brazilian women. *Rev Assoc Med Bras.* Published online 2010. doi:10.1590/s0104-42302010000300010
110. Dai X, Li T, Bai Z, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* Published online 2015.
111. Gilbert JA. Potential therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Lancet Oncol.* 2012;13(8):e330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23024992>
112. Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(5):402-418. doi:10.1016/j.apsb.2015.07.005
113. Sorlie T, Sørlie T, Perou CM, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-10874. doi:10.1073/pnas.191367098
114. Lebert JM, Lester R, Powell E, Seal M, McCarthy J. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr Oncol.* Published online 2018. doi:10.3747/co.25.3954
115. Clarke SC, Schofield PM, Grace AA, Metcalfe JC, Kirschenlohr HL. Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. *Circulation.* 2001;103(11):1497-1502. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257075>
116. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093
117. Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med.* 2015;12(2):106-116. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030
118. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* Published online 2009. doi:10.1093/jnci/djp082
119. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Published online 2003. doi:10.1073/pnas.0932692100

120. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. Published online 2011. doi:10.1186/bcr2889
121. Yeh J, Chun J, Schwartz S, et al. Clinical Characteristics in Patients with Triple Negative Breast Cancer. *Int J Breast Cancer*. 2017;2017:1796145. doi:10.1155/2017/1796145
122. Cailleau R, Olive M, Cruciger Q V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*. 1978;14(11):911-915. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/730202>
123. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves Jr. WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974;53(3):661-674. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4412247>
124. Keydar I, Chen L, Karby S, et al. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*. 1979;15(5):659-670. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/228940>
125. Sommers CL, Skerker JM, Chrysogelos SA, Bosseler M, Gelmann EP. Regulation of vimentin gene transcription in human breast cancer cell lines. *Cell Growth Differ*. 1994;5(8):839-846. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986748>
126. Thompson EW, Paik S, Brunner N, et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol*. 1992;150(3):534-544. doi:10.1002/jcp.1041500314
127. Orlando UD, Garona J, Ripoll G V., et al. The functional interaction between acyl-coa synthetase 4, 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 controls tumor growth: A novel therapeutic target. *PLoS One*. 2012;7(7):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0040794
128. Mota AL, Evangelista AF, Macedo T, et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncol Lett*. 2017;13(6):4708-4712. doi:10.3892/ol.2017.6093
129. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol*. 2002;190(3):279-286. doi:10.1002/jcp.10068
130. Monjazeb AM, High KP, Connoy A, Hart LS, Koumenis C, Chilton FH. Arachidonic acid-induced gene expression in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. Published online 2006. doi:10.1093/carcin/bgl023
131. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(3):181-193. doi:10.1038/nrc2809
132. Villegas-Comonfort S, Castillo-Sanchez R, Serna-Marquez N, Cortes-Reynosa P, Salazar EP. Arachidonic acid promotes migration and invasion through a PI3K/Akt-

- dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2014;90(5):169-177. doi:10.1016/j.plefa.2014.01.007
133. Wong RSY. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. *Adv Pharmacol Sci*. Published online 2019. doi:10.1155/2019/3418975
134. Cox TR, Gartland A, Eler JT. Lysyl Oxidase, a Targetable Secreted Molecule Involved in Cancer Metastasis. *Cancer Res*. 2016;76(2):188-192. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2306
135. Kasashima H, Yashiro M, Kinoshita H, et al. Lysyl oxidase is associated with the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells in hypoxia. *Gastric Cancer*. 2016;19(2):431-442. doi:10.1007/s10120-015-0510-3
136. Osawa T, Ohga N, Akiyama K, et al. Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer*. 2013;109(8):2237-2247. doi:10.1038/bjc.2013.535
137. Perryman L, Eler JT. Lysyl oxidase in cancer research. *Futur Oncol*. 2014;10(9):1709-1717. doi:10.2217/fon.14.39
138. Shih YH, Chang KW, Chen MY, et al. Lysyl oxidase and enhancement of cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013;35(2):250-256. doi:10.1002/hed.22959
139. Boufrajech M, Nilubol N, Zhang L, et al. miR30a inhibits LOX expression and anaplastic thyroid cancer progression. *Cancer Res*. 2015;75(2):367-377. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2304
140. Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SFT, et al. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res*. Published online 2002.
141. Ma BJ, Huang L, Han M, et al. [Effect of lysyl oxidase on migration and adhesion of human gastric cancer HGC-27 cells in vitro]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2011;33(5):331-333. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21875459>
142. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol*. Published online 2013. doi:10.1007/s00281-012-0342-8
143. Smith BJ, Wills MR, Savory J. Prostaglandins and cancer. *Ann Clin Lab Sci*. 1983;13(5):359-365. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6357045>
144. Cecilia C, Sofía C, Marcela V, et al. Cytochrome 450 metabolites of arachidonic acid (20-HETE, 11,12-EET and 14,15-EET) promote pheochromocytoma cell growth and tumor associated angiogenesis. *Biochimie*. 2020;171-172:147-157. doi:10.1016/j.biochi.2020.02.014

145. Colombero C, Papademetrio D, Sacca P, Mormandi E, Alvarez E, Nowicki S. Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (20-HETE) in Androgen-Mediated Cell Viability in Prostate Cancer Cells. *Horm Cancer*. 2017;8(4):243-256. doi:10.1007/s12672-017-0299-0
146. Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, et al. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):503-524. doi:10.1007/s10555-007-9098-3
147. Sung YK, Hwang SY, Park MK, et al. Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2003;94(5):421-424.
148. Monaco ME, Creighton CJ, Lee P, Zou X, Topham MK, Stafforini DM. Expression of long-chain fatty Acyl-CoA synthetase 4 in breast and prostate cancers is associated with sex steroid hormone receptor negativity. *Transl Oncol*. 2010;3(2):91-98. doi:10.1593/tlo.09202
149. Xia H, Lee KW, Chen J, et al. Simultaneous silencing of ACSL4 and induction of GADD45B in hepatocellular carcinoma cells amplifies the synergistic therapeutic effect of aspirin and sorafenib. *Cell Death Discov*. 2017;3:17058. doi:10.1038/cddiscovery.2017.58
150. Li D, Ji H, Niu X, et al. Tumor-associated macrophages secrete CC-chemokine ligand 2 and induce tamoxifen resistance by activating PI3K/Akt/mTOR in breast cancer. *Cancer Sci*. Published online 2020. doi:10.1111/cas.14230
151. Ortega MA, Fraile-Martínez O, Asúnsolo Á, Buján J, García-Honduvilla N, Coca S. Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *J Oncol*. Published online 2020. doi:10.1155/2020/9258396
152. Castillo AF, Orlando UD, Lopez P, Solano AR, Maloberti PM, Podesta EJ. Gene Expression Profile and Signaling Pathways in MCF-7 Breast Cancer Cells Mediated by Acyl-Coa Synthetase 4 Overexpression. *Transcr Open Access*. 2016;3(2):1-9. doi:10.4172/2329-8936.1000120
153. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25(10):1010-1022. doi:10.1101/gad.2037511
154. Emami KH, Burke TW, Smale ST. Sp1 activation of a TATA-less promoter requires a species-specific interaction involving transcription factor IID. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(3):839-846. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9443978>
155. Dattilo MA, Benzo Y, Herrera LM, et al. Regulatory mechanisms leading to differential Acyl-CoA synthetase 4 expression in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-13. doi:10.1038/s41598-019-46776-7
156. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol*. Published online 2009.

- doi:10.2353/ajpath.2009.080794
157. Wang W, Li X, Ding N, et al. MiR-34a regulates adipogenesis in porcine intramuscular adipocytes by targeting ACSL4. *BMC Genet.* Published online 2020. doi:10.1186/s12863-020-0836-7
158. Kaller M, Liffers ST, Oeljeklaus S, et al. Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(8):M111 010462. doi:10.1074/mcp.M111.010462
159. Qin X, Zhang J, Lin Y, Sun XM, Zhang JN, Cheng ZQ. Identification of MiR-211-5p as a tumor suppressor by targeting ACSL4 in Hepatocellular Carcinoma. *J Transl Med.* Published online 2020. doi:10.1186/s12967-020-02494-7
160. Smith ME, Saraceno GE, Capani F, Castilla R. Long-chain acyl-CoA synthetase 4 is regulated by phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(1):272-277. doi:10.1016/j.bbrc.2012.10.138
161. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* Published online 2016. doi:10.1038/cr.2016.39
162. Yamano K, Matsuda N, Tanaka K. The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO Rep.* Published online 2016. doi:10.15252/embr.201541486
163. Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ. Ubiquitin-binding domains from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Published online 2009. doi:10.1038/nrm2767
164. Kan CF, Singh AB, Stafforini DM, Azhar S, Liu J. Arachidonic acid downregulates acyl-CoA synthetase 4 expression by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation. *J Lipid Res.* 2014;55(8):1657-1667. doi:10.1194/jlr.M045971
165. Sun Y. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* Published online 2003. doi:10.4161/cbt.2.6.677
166. Ardley HC, Robinson PA. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.* Published online 2005. doi:10.1042/eb0410015
167. Morreale FE, Walden H. Types of Ubiquitin Ligases. *Cell.* Published online 2016. doi:10.1016/j.cell.2016.03.003
168. Wang P, Dai X, Jiang W, Li Y, Wei W. RBR E3 ubiquitin ligases in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* Published online 2020. doi:10.1016/j.semcancer.2020.05.002
169. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* Published online 2008.

- doi:10.1083/jcb.200809125
170. Liu J, Zhang C, Zhao Y, et al. Parkin targets HIF-1 $\alpha$  for ubiquitination and degradation to inhibit breast tumor progression. *Nat Commun*. Published online 2017.  
doi:10.1038/s41467-017-01947-w
171. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. *Neuron*. Published online 2015. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.007
172. McWilliams TG, Muqit MM. PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*. Published online 2017. doi:10.1016/j.ceb.2017.03.013
173. Greene JC, Whitworth AJ, Andrews LA, Parker TJ, Pallanck LJ. Genetic and genomic studies of *Drosophila* parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet*. Published online 2005.  
doi:10.1093/hmg/ddi074
174. Barazzuol L, Giamogante F, Brini M, Cali T. PINK1/Parkin Mediated Mitophagy, Ca<sup>2+</sup> Signalling, and ER-Mitochondria Contacts in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. Published online 2020. doi:10.3390/ijms21051772
175. Ding WX, Yin XM. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*. Published online 2012. doi:10.1515/hsz-2012-0119
176. Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AHV, Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet*. 2010;19(24):4861-4870. doi:10.1093/hmg/ddq419
177. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, et al. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature*. Published online 2013.  
doi:10.1038/nature12043
178. Mele PG, Duarte A, Paz C, Capponi A, Podesta EJ. Role of intramitochondrial arachidonic acid and acyl-CoA synthetase 4 in angiotensin II-regulated aldosterone synthesis in NCI-H295R adrenocortical cell line. *Endocrinology*. 2012;153(7):3284-3294.  
doi:10.1210/en.2011-2108
179. Cho YY, Kang MJ, Ogawa S, Yamashita Y, Fujino T, Yamamoto TT. Regulation by adrenocorticotrophic hormone and arachidonate of the expression of acyl-CoA synthetase 4, an arachidonate-preferring enzyme expressed in steroidogenic tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274(3):741-745. doi:10.1006/bbrc.2000.3207
180. Paz C, Cornejo Maciel F, Mendez C, Podesta EJ. Corticotropin increases protein tyrosine phosphatase activity by a cAMP-dependent mechanism in rat adrenal gland. *Eur J Biochem*. 1999;265(3):911-918. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518784>
181. Poderoso C, Cornejo Maciel F, Gorostizaga A, Bey P, Paz C, Podesta EJ. The

- obligatory action of protein tyrosine phosphatases in ACTH-stimulated steroidogenesis is exerted at the level of StAR protein. *Endocr Res.* 2002;28(4):413-417.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12530643>
182. Poderoso C, Paz C, Gorostizaga A, Cornejo Maciel F, Mendez CF, Podesta EJ. Protein serine/threonine phosphatase 2A activity is inhibited by cAMP in MA-10 cells. *Endocr Res.* 2002;28(4):319-323. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12530632>
183. Cooke M, Mele P, Maloberti P, et al. Tyrosine phosphatases as key regulators of StAR induction and cholesterol transport: SHP2 as a potential tyrosine phosphatase involved in steroid synthesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336(1-2):63-69.  
doi:10.1016/j.mce.2010.11.030
184. Cano F, Poderoso C, Cornejo Maciel F, et al. Protein tyrosine phosphatases regulate arachidonic acid release, StAR induction and steroidogenesis acting on a hormone-dependent arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;99(4-5). doi:10.1016/j.jsbmb.2006.01.003
185. Cooke M, Orlando U, Maloberti P, Podesta EJ, Cornejo Maciel F. Tyrosine phosphatase SHP2 regulates the expression of acyl-CoA synthetase ACSL4. *J Lipid Res.* 2011;52(11):1936-1948. doi:10.1194/jlr.M015552
186. Gray MW. Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Mol Biol Cell.* Published online 2017. doi:10.1091/mbc.E16-07-0509
187. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* Published online 2014. doi:10.1038/nature12985
188. Bartolák-Suki E, Imsirovic J, Nishibori Y, Krishnan R, Suki B. Regulation of mitochondrial structure and dynamics by the cytoskeleton and mechanical factors. *Int J Mol Sci.* Published online 2017. doi:10.3390/ijms18081812
189. Mitchell P, Moyle J, Mitchell R. [69] Measurement of  $\rightarrow$ H<sup>+</sup>/O in Mitochondria and Submitochondrial Vesicles. *Methods Enzymol.* Published online 1979. doi:10.1016/0076-6879(79)55071-X
190. Rutter GA, Rizzuto R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca<sup>2+</sup> release: An intimate connection. *Trends Biochem Sci.* Published online 2000. doi:10.1016/S0968-0004(00)01585-1
191. Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med.* Published online 2010. doi:10.1016/j.mam.2010.03.002
192. Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion.* Published online 2012.



- doi:10.1016/j.mito.2011.04.001
193. De Pinto V, Guarino F, Guarnera A, et al. Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar function for VDAC3? *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. Published online 2010. doi:10.1016/j.bbabi.2010.01.031
  194. Mannella CA, Bonner WD. Biochemical characteristics of the outer membranes of plant mitochondria. *BBA - Biomembr*. Published online 1975. doi:10.1016/0005-2736(75)90105-4
  195. Yamamoto T, Yamada A, Watanabe M, et al. VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. *J Proteome Res*. Published online 2006. doi:10.1021/pr060291w
  196. Madungwe NB, Feng Y, Lie M, et al. Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin) knockdown induces cell death by apoptosis via an AIF-PARP-dependent mechanism and cell cycle arrest. *Am J Physiol - Cell Physiol*. Published online 2018. doi:10.1152/ajpcell.00230.2017
  197. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc*. Published online 2012. doi:10.1038/nprot.2012.058
  198. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Published online 2010. doi:10.1038/nrm3013
  199. Cheng J, Nanayakkara G, Shao Y, et al. Mitochondrial proton leak plays a critical role in pathogenesis of cardiovascular diseases. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ; 2017. doi:10.1007/978-3-319-55330-6\_20
  200. Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? *J Aging Res*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/192503
  201. Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, et al. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*. Published online 2012. doi:10.1016/j.mito.2011.07.004
  202. Liu YJ, McIntyre RL, Janssens GE, Houtkooper RH. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mech Ageing Dev*. Published online 2020. doi:10.1016/j.mad.2020.111212
  203. Yetkin-Arik B, Vogels IMC, Nowak-Sliwinska P, et al. The role of glycolysis and mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Sci Rep*. Published online 2019. doi:10.1038/s41598-019-48676-2

204. Gohil VM, Sheth SA, Nilsson R, et al. Discovery and therapeutic potential of drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nat Biotechnol*. Published online 2010. doi:10.1038/nbt.1606.
205. Warburg O. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science (80- )*. Published online 1956. doi:10.1126/science.123.3191.309
206. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, et al. A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*. Published online 2007. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.020
207. Huber R, Spiegel T, Büchner M, Riepe MW. Graded Reoxygenation with Chemical Inhibition of Oxidative Phosphorylation Improves Posthypoxic Recovery in Murine Hippocampal Slices. *J Neurosci Res*. Published online 2004. doi:10.1002/jnr.10868
208. Chen Q, Camara AKS, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol - Cell Physiol*. Published online 2007. doi:10.1152/ajpcell.00270.2006
209. Książakowska-Łakoma K, Zyla M, Wilczyński JR. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Prz Menopauzalny*. Published online 2014. doi:10.5114/pm.2014.42717
210. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell*. Published online 2016. doi:10.1016/j.cell.2016.07.002
211. Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMBS, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res*. Published online 2018. doi:10.1038/cr.2017.155
212. Avagliano A, Ruocco MR, Aliotta F, et al. Mitochondrial Flexibility of Breast Cancers: A Growth Advantage and a Therapeutic Opportunity. *Cells*. Published online 2019. doi:10.3390/cells8050401
213. Heiden MG Vander, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (80- )*. Published online 2009. doi:10.1126/science.1160809
214. Journo D, Mor A, Abeliovich H. Aup1-mediated regulation of Rtg3 during mitophagy. *J Biol Chem*. Published online 2009. doi:10.1074/jbc.M109.048140
215. Vara-Perez M, Felipe-Abrio B, Agostinis P. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells*. Published online 2019. doi:10.3390/cells8050493
216. Pua HH, Guo J, Komatsu M, He Y-W. Autophagy Is Essential for Mitochondrial Clearance in Mature T Lymphocytes. *J Immunol*. Published online 2009. doi:10.4049/jimmunol.0801143

217. Strappazon F, Nazio F, Corrado M, et al. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ*. Published online 2015. doi:10.1038/cdd.2014.139
218. Di Rita A, Peschiaroli A, D'Acunzo P, et al. HUWE1 E3 ligase promotes PINK1/PARKIN-independent mitophagy by regulating AMBRA1 activation via IKK $\alpha$ . *Nat Commun*. Published online 2018. doi:10.1038/s41467-018-05722-3
219. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, et al. Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. *Mol Cell Biol*. Published online 2009. doi:10.1128/mcb.00166-09
220. Jin SM, Youle RJ. PINK1-and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J Cell Sci*. Published online 2012. doi:10.1242/jcs.093849
221. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol*. Published online 2010. doi:10.1038/ncb2012
222. Bernardini JP, Lazarou M, Dewson G. Parkin and mitophagy in cancer. *Oncogene*. Published online 2017. doi:10.1038/onc.2016.302
223. Chourasia AH, Boland ML, Macleod KF. Mitophagy and cancer. *Cancer Metab*. Published online 2015. doi:10.1186/s40170-015-0130-8
224. Kimmelman AC, White E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab*. Published online 2017. doi:10.1016/j.cmet.2017.04.004
225. Zhang C, Lin M, Wu R, et al. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Published online 2011. doi:10.1073/pnas.1113884108
226. Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, et al. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. Published online 2008. doi:10.1038/onc.2008.199
227. Fei P, Wang W, Kim SH, et al. Bnip3L is induced by p53 under hypoxia, and its knockdown promotes tumor growth. *Cancer Cell*. Published online 2004. doi:10.1016/j.ccr.2004.10.012
228. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature*. Published online 2015. doi:10.1038/nature14300
229. Hardy L, Frison M, Campanella M. Breast cancer cells exploit mitophagy to exert therapy resistance. *Oncotarget*. Published online 2018. doi:10.18632/oncotarget.24533
230. Xu L, Lin DC, Yin D, Koeffler HP. An emerging role of PARK2 in cancer. *J Mol Med*.

- Published online 2014. doi:10.1007/s00109-013-1107-0
231. Veeriah S, Morris LG, Solit D, Chan TA. The familial Parkinson disease gene PARK2 is a multisite tumor suppressor on chromosome 6q25.2-27 that regulates cyclin E. *Cell Cycle*. Published online 2010. doi:10.4161/cc.9.8.11583
  232. Madhu V, Boneski PK, Silagi E, et al. Hypoxic Regulation of Mitochondrial Metabolism and Mitophagy in Nucleus Pulposus Cells Is Dependent on HIF-1 $\alpha$ -BNIP3 Axis. *J Bone Miner Res*. Published online 2020. doi:10.1002/jbmr.4019
  233. Tay SP, Yeo CWS, Chai C, et al. Parkin enhances the expression of cyclin-dependent kinase 6 and negatively regulates the proliferation of breast cancer cells. *J Biol Chem*. Published online 2010. doi:10.1074/jbc.M110.108241
  234. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese R V. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*. Published online 2013. doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017
  235. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(21):11280-11285. doi:10.1073/pnas.200367597
  236. Liu Z, Huang Y, Zhang Y, Chen D, Zhang YQ. Drosophila Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 regulates axonal transport of synaptic vesicles and is required for synaptic development and transmission. *J Neurosci*. 2011;31(6):2052-2063. doi:10.1523/JNEUROSCI.3278-10.2011
  237. Dattilo MA, Benzo Y, Herrera LM, et al. Regulatory mechanisms leading to differential Acyl-CoA synthetase 4 expression in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-46776-7
  238. Castillo AF, Orlando UD, Maloberti PM, et al. New inhibitor targeting Acyl-CoA synthetase 4 reduces breast and prostate tumor growth, therapeutic resistance and steroidogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2020;in press:doi.org/10.1007/s00018-020-03679-5.
  239. Engel LW, Young NA. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res*. 1978;38(11 Pt 2):4327-4339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/212193>
  240. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973;51(5):1409-1416. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357757>
  241. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. Published online 2005. doi:10.1016/j.vascn.2004.08.014
  242. Fan X, Wang Y, Jiang T, et al. B-Myb Mediates Proliferation and Migration of Non-Small-Cell Lung Cancer via Suppressing IGFBP3. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).

- doi:10.3390/ijms19051479
243. Steichen JM, Kulp DW, Tokatlian T, et al. HIV Vaccine Design to Target Germline Precursors of Glycan-Dependent Broadly Neutralizing Antibodies. *Immunity*. 2016;45(3):483-496. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.016
  244. Ke SH, Madison EL. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube “megaprimer” PCR method. *Nucleic Acids Res*. Published online 1997. doi:10.1093/nar/25.16.3371
  245. Liu H, Naismith JH. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol*. Published online 2008. doi:10.1186/1472-6750-8-91
  246. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557-580. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791>
  247. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of .... *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
  248. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
  249. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. Published online 2012. doi:10.1038/nmeth.2019
  250. Choi SW, Gerencser AA, Ng R, et al. No consistent bioenergetic defects in presynaptic nerve terminals isolated from mouse models of Alzheimer’s disease. *J Neurosci*. Published online 2012. doi:10.1523/JNEUROSCI.2414-12.2012
  251. Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. Published online 2019. doi:10.1038/s41467-019-09234-6
  252. Sui Y, Liu Y, Xu G. A lysine-to-arginine mutation on NEDD8 markedly reduces the activity of cullin RING E3 ligase through the impairment of neddylation cascades. *Biochem Biophys Res Commun*. Published online 2015. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.085
  253. Sokalingam S, Raghunathan G, Soundarajan N, Lee SG. A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein. *PLoS One*. Published online 2012. doi:10.1371/journal.pone.0040410
  254. Ferree A, Shirihai O. Mitochondrial dynamics: The intersection of form and function. *Adv Exp Med Biol*. Published online 2012. doi:10.1007/978-1-4614-3573-0\_2

255. Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, et al. Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res*. Published online 2012. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3928
256. Kang D, Hamasaki N. Alterations of Mitochondrial DNA in Common Diseases and Disease States: Aging, Neurodegeneration, Heart Failure, Diabetes and Cancer. *Curr Med Chem*. Published online 2012. doi:10.2174/0929867053363081
257. Hu L, Yao X, Shen Y. Altered mitochondrial DNA copy number contributes to human cancer risk: Evidence from an updated meta-analysis. *Sci Rep*. Published online 2016. doi:10.1038/srep35859
258. Hertweck KL, Dasgupta S. The landscape of mtDNA modifications in cancer: A tale of two cities. *Front Oncol*. Published online 2017. doi:10.3389/fonc.2017.00262
259. Wallace DC. Mitochondrial function and cancer. *Nat Rev Cancer*. Published online 2012. doi:10.1038/nrc3365
260. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. Published online 2010. doi:10.1038/nrd3137
261. Contino S, Porporato PE, Bird M, et al. Presenilin 2-dependent maintenance of mitochondrial oxidative capacity and morphology. *Front Physiol*. Published online 2017. doi:10.3389/fphys.2017.00796
262. Chan NC, Salazar AM, Pham AH, et al. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet*. Published online 2011. doi:10.1093/hmg/ddr048
263. Zhu J, Dagda RK, Chu CT. Monitoring mitophagy in neuronal cell cultures. *Methods Mol Biol*. Published online 2011. doi:10.1007/978-1-61779-328-8\_21
264. Maloberti PM, Castillo AF, Orlando U, Podesta EJ. ACSL4. In: Choi S, ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer New York; 2017:1-8. doi:10.1007/978-1-4614-6438-9\_101897-1
265. Ohta T, Fukuda M. Ubiquitin and breast cancer. *Oncogene*. Published online 2004. doi:10.1038/sj.onc.1207371
266. Diehl JA, Fuchs SY, Haines DS. Ubiquitin and cancer: New discussions for a new journal. *Genes and Cancer*. Published online 2010. doi:10.1177/1947601910383565
267. Monaco ME, Creighton CJ, Lee P, Zou X, Topham MK, Stafforini DM. Expression of Long-chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 in Breast and Prostate Cancers Is Associated with Sex Steroid Hormone Receptor Negativity. *Transl Oncol*. 2010;3(2):91-98. doi:10.1593/tlo.09202

268. Sen P, Kan CFK, Singh AB, et al. Identification of p115 as a novel ACSL4 interacting protein and its role in regulating ACSL4 degradation. *J Proteomics*. 2020;229:103926. doi:10.1016/j.jprot.2020.103926
269. Belkaid A, Ouellette RJ, Surette ME. 17 $\beta$ -estradiol-induced ACSL4 protein expression promotes an invasive phenotype in estrogen receptor positive mammary carcinoma cells. *Carcinogenesis*. Published online 2017. doi:10.1093/carcin/bgx020
270. Deng L, Meng T, Chen L, Wei W, Wang P. The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. *Signal Transduct Target Ther*. Published online 2020. doi:10.1038/s41392-020-0107-0
271. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. Published online 2001. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.503
272. Shi D, Grossman SR. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: Emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets. *Cancer Biol Ther*. Published online 2010. doi:10.4161/cbt.10.8.13417
273. Fukunaga E, Inoue Y, Komiya S, et al. Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. *J Biol Chem*. Published online 2008. doi:10.1074/jbc.M710496200
274. Zhi X, Zhao D, Wang Z, et al. E3 ubiquitin ligase RNF126 promotes cancer cell proliferation by targeting the tumor suppressor p21 for ubiquitin-mediated degradation. *Cancer Res*. Published online 2013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0562
275. Jin C, Yang YA, Anver MR, Morris N, Wang X, Zhang YE. Smad ubiquitination regulatory factor 2 promotes metastasis of breast cancer cells by enhancing migration and invasiveness. *Cancer Res*. Published online 2009. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1463
276. Inoue Y, Imamura T. Regulation of TGF- $\beta$  family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci*. Published online 2008. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00925.x
277. Fenech EJ, Lari F, Charles PD, et al. Interaction mapping of endoplasmic reticulum ubiquitin ligases identifies modulators of innate immune signalling. *Elife*. 2020;9:1-29. doi:10.7554/eLife.57306
278. Ramanathan A, Schreiber SL. Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Published online 2009. doi:10.1073/pnas.0912074106
279. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature*. Published online 2007. doi:10.1038/nature06322
280. Andrews MG, Subramanian L, Kriegstein AR. mTOR signaling regulates the morphology and migration of outer radial glia in developing human cortex. *Elife*. Published online

2020. doi:10.7554/eLife.58737
281. Farrar GJ, Chadderton N, Kenna PF, Millington-Ward S. Mitochondrial disorders: Aetiologies, models systems, and candidate therapies. *Trends Genet.* Published online 2013. doi:10.1016/j.tig.2013.05.005
282. Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell.* Published online 2016. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.011
283. Frantz MC, Wipf P. Mitochondria as a target in treatment. *Environ Mol Mutagen.* Published online 2010. doi:10.1002/em.20554
284. Elkon R, Linhart C, Sharan R, Shamir R, Shiloh Y. Genome-wide in silico identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells. *Genome Res.* Published online 2003. doi:10.1101/gr.947203
285. Kiyama T, Chen C-K, Wang SW, et al. Essential roles of mitochondrial biogenesis regulator Nrf1 in retinal development and homeostasis. *Mol Neurodegener.* Published online 2018. doi:10.1186/s13024-018-0287-z
286. Das J, Felty Q, Poppiti R, Jackson R, Roy D. Nuclear Respiratory Factor 1 Acting as an Oncoprotein Drives Estrogen-Induced Breast Carcinogenesis. *Cells.* Published online 2018. doi:10.3390/cells7120234
287. Radde BN, Ivanova MM, Mai HX, et al. Nuclear respiratory factor-1 and bioenergetics in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2016;347(1):222-231. doi:10.1016/j.yexcr.2016.08.006
288. Guarino F, Zinghirino F, Mela L, et al. NRF-1 and HIF-1 $\alpha$  contribute to modulation of human VDAC1 gene promoter during starvation and hypoxia in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* Published online 2020. doi:10.1016/j.bbabi.2020.148289
289. Zinghirino F, Pappalardo XG, Messina A, Guarino F, Pinto V De. Is the secret of vdac isoforms in their gene regulation? Characterization of human vdac genes expression profile, promoter activity, and transcriptional regulators. *Int J Mol Sci.* Published online 2020. doi:10.3390/ijms21197388
290. Zhao Y, Li Y, Zhang R, Wang F, Wang T, Jiao Y. The role of Erastin in ferroptosis and its prospects in cancer therapy. *Onco Targets Ther.* Published online 2020. doi:10.2147/OTT.S254995
291. Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem.* Published online 2000. doi:10.1074/jbc.275.17.13134
292. Satoh JI, Kawana N, Yamamoto Y. Pathway Analysis of ChIP-Seq-Based NRF1 Target Genes Suggests a Logical Hypothesis of their Involvement in the pathogenesis of



- Neurodegenerative Diseases. *Gene Regul Syst Bio*. Published online 2013.  
doi:10.4137/GRSB.S13204
293. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435(2):297-312. doi:10.1042/BJ20110162
294. Rohlena J, Dong L, Neuzil J. Targeting the Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes for the Induction of Apoptosis and Cancer Treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(3):377-389. doi:10.2174/1389201011314030011
295. Hill BG, Benavides GA, Lancaster JJR, et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. In: *Biological Chemistry*. ; 2012.  
doi:10.1515/hsz-2012-0198
296. Pflieger J, He M, Abdellatif M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis*. Published online 2015. doi:10.1038/cddis.2015.202
297. Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J*. Published online 2020. doi:10.1096/fj.202000767R
298. Teh JT, Zhu WL, Newgard CB, Casey PJ, Wang M. Respiratory capacity and reserve predict cell sensitivity to mitochondria inhibitors: Mechanism-based markers to identify metformin-responsive cancers. *Mol Cancer Ther*. Published online 2019.  
doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-0766
299. Kulikov A V., Luchkina EA, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitophagy: Link to cancer development and therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482(3):432-439.  
doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.088
300. Memon AA, Zöller B, Hedelius A, et al. Quantification of mitochondrial DNA copy number in suspected cancer patients by a well optimized ddPCR method. *Biomol Detect Quantif*. Published online 2017. doi:10.1016/j.bdq.2017.08.001
301. Villa E, Proïcs E, Rubio-Patiño C, et al. Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. *Cell Rep*. Published online 2017.  
doi:10.1016/j.celrep.2017.08.087