



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EL PAPEL DE LA DEACETILASA MITOCONDRIAL SIRT3 EN LA FUNCIÓN  
MITOCONDRIAL Y EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN Y CÁNCER  
DE MAMA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
MARISOL AYALA REYES**

**TUTOR PRINCIPAL  
DR. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN (CCG)**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO ((INMEGEN)  
DRA. YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY (IBT)**

Ciudad de México. Mayo, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: **EL PAPEL DE LA DEACETILASA MITOCONDRIAL SIRT3 EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN Y CÁNCER DE MAMA** que presenté para obtener el grado de Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

**Marisol Ayala Reyes  
313318634**

*Marisol Ayala*

Al Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, mi tutor, por brindarme la oportunidad y el apoyo para llevar a cabo y concluir este trabajo.

A la Dra. Diana Lashidua Fernández Coto por su participación en el proyecto y por el tiempo dedicado a la enseñanza de técnicas relevantes para el mismo.

Al Dr. Jeovanis Gil Valdés por su colaboración en el análisis por espectrometría de masas y por su valiosa contribución al análisis de datos en este proyecto.

Al M. en C. Ramiro Alonso Bastida por su valiosa contribución al análisis de datos en este proyecto.

A la Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay y al Dr. Osbaldo Resendis Antonio por las sugerencias para el enriquecimiento de este trabajo.

A la Bióloga Erika Isabel Melchy Pérez por su trabajo en el procesamiento de muestras mediante citometría de flujo, y por el tiempo dedicado a explicarme el análisis de los datos.

Al Biólogo Ángel Gabriel Martínez Batallar por el entrenamiento en técnicas importantes para el proyecto.

Al CONACyT por la beca que me otorgó durante la Maestría

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado PAEP por la beca otorgada para asistir al XXI Congreso de la Organización de Proteómica Humana (HUPO).

A la memoria de mi madre Rocío Reyes quien siempre me brindo su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A mi padre Jaime Ayala y a mi hermana Rocío Ayala por su amor y por siempre motivarme a seguir adelante.

A mi novio y amigo Ramiro Alonso por ser un apoyo incondicional en mi vida.

A mis amigos Gabriel Martínez, Diana Fernández, Angelina Herrera, Jocelin Rizo, Jasiel García, Sofía Herrera y Josué Morales por los maravillosos momentos que hemos compartido.

A la memoria de mi querido amigo el Dr. Jorge Carretero Ortega, quien me inspiró a seguir mis estudios de Maestría y quien siempre me brindo su amor, comprensión y apoyo.

## I. INDICE GENERAL

I. INDICE GENERAL .....	i
II. ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
III. ABREVIATURAS.....	iv
IV. RESUMEN.....	v
1. ANTECEDENTES.....	1
<b>1.1. Origen y estructura general de la mitocondria</b> .....	1
<b>1.2. Funciones principales de la mitocondria</b> .....	2
1.2.1. Cadena de transporte de electrones .....	3
1.2.2 Metabolismo mitocondrial.....	5
1.2.3 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria.....	7
1.2.4 Almacenamiento de calcio en la mitocondria.....	8
1.2.5 Apoptosis y muerte celular .....	9
<b>1.3. Mitocondria y cáncer</b> .....	10
1.3.1 Genoma mitocondrial .....	11
1.3.2 Reprogramación metabólica .....	11
1.3.3 Desregulación de la homeostasis de ROS y Ca <sup>2+</sup> en la mitocondria .....	13
1.3.4 Evasión de la apoptosis .....	14
1.3.5 Ciclo fisión-fusión mitocondrial.....	15
1.3.6 Mitofagia .....	16
<b>1.4. Mecanismos de regulación de proteínas mitocondriales</b> .....	16
1.4.1 Modificaciones postraduccionales.....	16
1.4.2 Acetilación y desacetilación de residuos de lisina .....	17
1.4.3 Efectos en la acetilación de proteínas mitocondriales .....	18
2. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	19
<b>2.1 Papel de SIRT3 en el cáncer</b> .....	19
<b>2.2 Técnicas proteómicas para el análisis de la estequiometría de acetilación</b> .....	21
2.2.1 Acetilación química y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas .....	21
3. JUSTIFICACIÓN .....	22
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS: .....	22
6. MÉTODOS.....	23
<b>6.1. Diagrama de la estrategia general de trabajo</b> .....	23

<b>6.2 Material biológico</b> .....	23
<b>6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) e inmunoblot</b> .....	23
<b>6.4 Enriquecimiento de mitocondrias</b> .....	24
<b>6.5 Diagrama del procedimiento de enriquecimiento mitocondrial mediante gradiente de sacarosa</b> .....	25
<b>6.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) e inmunoblot de las fases del enriquecimiento mitocondrial</b> .....	25
<b>6.7. Acetilación química con NAS-d3</b> .....	26
<b>6.9 Análisis estadístico y construcción de gráficos en R</b> .....	27
<b>6.10 Determinación de especies reactivas de oxígeno</b> .....	27
<b>7. RESULTADOS</b> .....	29
<b>7.1 La expresión de la deacetilasa mitocondrial SIRT3 muestra variación entre las líneas celulares A549 y MCF7</b> .....	29
<b>7.2 La inhibición mediada por el inhibidor selectivo 3-TYP, no tiene un impacto directo en la expresión de SIRT3 en las líneas celulares A549 y MCF7</b> .....	29
<b>7.3 El método de enriquecimiento de mitocondrias mediante centrifugación secuencial y gradiente de sacarosa demostró ser apropiado para los objetivos de nuestra investigación</b> .....	30
<b>7.4 Ajuste de efecto de lote y análisis de componentes principales en el procesamiento de muestras proteómicas</b> .....	31
<b>7.6 La inhibición de SIRT3 en células A549 parece favorecer procesos importantes que regulan el progreso de la enfermedad</b> .....	38
<b>7.7 La reducción en la expresión de SIRT3 con 3-TYP en células MCF7 podría estar relacionada con un fenotipo de cáncer más agresivo</b> .....	41
<b>7.8 Determinación de la estequiometría de acetilación y análisis de proteínas sobreacetiladas en las líneas celulares A549 y MCF7</b> .....	44
<b>7.9 La sobreacetilación de proteínas en células A549 y MCF7 tiene un impacto significativo en el metabolismo del cáncer</b> .....	45
<b>7.10 SIRT3 podría estar participando en la deacetilación de múltiples proteínas clave en el metabolismo de células A549</b> .....	48
<b>7.11 La baja expresión de SIRT3 potencia la acetilación de proteínas relacionadas con el cáncer</b> .....	51
<b>7.12 SIRT3 desempeña un papel crucial como regulador en la producción de ROS en la línea celular MCF7; la intensificación de su inhibición conlleva a un aumento en los niveles de producción de dichas especies en las células</b> .....	54
<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	55
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	61
<b>11. REFERENCIAS</b> .....	62

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la mitocondria.....	2
Figura 2. Principales funciones de la mitocondria.....	3
Figura 3. Sistema de fosforilación oxidativa.....	5
Figura 4. Defectos mitocondriales en cáncer.....	10
Figura 5. Acetilación y deacetilación.....	18
Figura 6. SIRT3 presenta una expresión diferencial en las líneas celulares MCF7 y A549, mostrando una mayor expresión en células A549 y una menor expresión en células MCF7.....	29
Figura 7. El inhibidor 3-TYP no ejerce un efecto directo en la expresión de SIRT3 en las líneas celulares A549 y MCF7.....	30
Figura 8. Evidencia de enriquecimiento mitocondrial en células MCF7.....	31
Figura 9. Análisis de componentes principales después de la normalización utilizando el método de Bayes.....	32
Figura 10. Las vías biológicas enriquecidas en células A549 sugieren una preferencia por el metabolismo oxidativo, mientras que en células MCF7 parece predominar el metabolismo glucolítico para la generación de energía.....	36
Figura 11. SIRT3 se encuentra sobreexpresada en mitocondrias de células A549 y subexpresada en mitocondrias de células MCF7, lo que sugiere su participación activa en la regulación del TCA y la OXPHOS.....	37
Figura 12. El tratamiento con 3-TYP enriquece la vía de detoxificación de ROS y reduce el enriquecimiento de la endocitosis.....	39
Figura 13. El tratamiento con 3-TYP reveló un aumento en la reparación de ADN en las mitocondrias, específicamente a través de la reparación por escisión de nucleótidos (GG-NER).....	40
Figura 14. El tratamiento con 3-TYP disminuyó el enriquecimiento de vías relacionadas con el metabolismo glucolítico y aumentó el enriquecimiento de vías asociadas a la OXPHOS en células MCF7.....	42
Figura 15. El tratamiento con 3-TYP reveló un aumento en el enriquecimiento de la vía de necroptosis y la vía de activación del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C y APC/CCdc20) en las mitocondrias de células MCF7, ambas asociadas con un pronóstico desfavorable en el cáncer.....	43
Figura 16. Determinación de la estequiometría de acetilación.....	44
Figura 17. Cambios en el metabolismo de líneas celulares A549 y MCF7 en proteínas totales y mitocondriales.....	47
Figura 18. Cambios en la acetilación de proteínas en la línea celular A549, tanto en proteínas totales como mitocondriales, bajo condiciones de control y tratamiento con 3-TYP.....	50
Figura 19. Cambios en la acetilación de proteínas en la línea celular MCF7, tanto en proteínas totales como mitocondriales, bajo condiciones de control y tratamiento con 3-TYP.....	53
Figura 20. SIRT3 no ejerce un efecto directo en los niveles de ROS en la línea celular A549, pero si en la línea MCF7.....	54
Figura 21. Diferencias metabólicas en las líneas celulares A549 y MCF7.....	59

### III. ABREVIATURAS

ATP - adenosín trifosfato	MS - mass spectrometry, por su nombre en inglés
MMI - membrana mitocondrial interna	RE - retículo endoplasmático
MME - membrana mitocondrial externa	SOD - superóxido dismutasa
ADNmt - ADN mitocondrial	GPX - glutatión peroxidasa
ADNn - ADN nuclear	IDH - isocitrato deshidrogenasa
OXPHOS - oxidative phosphorylation, por su nombre en inglés	NADP - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ROS - reactive oxygen species, por su nombre en inglés	NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
TCA - tricarboxylic acid cycle, por su nombre en inglés	MCU - mitochondrial calcium uniporter, por su nombre en inglés
NAD - nicotinamide adenine dinucleotide, por su nombre en inglés	PTP - permeability transition pore, por su nombre en inglés
NADH - nicotinamide adenine dinucleotide, (reduced), por su nombre en inglés	HIF-1 - hypoxia-inducible factor, por su nombre en inglés
FAD - flavin adenine dinucleotide, por su nombre en inglés	HK - hexoquinasa
FADH <sub>2</sub> - flavin adenine dinucleotide (reduced), por su nombre en inglés	LC - liquid chromatography, por su nombre en inglés
CTE - cadena de transporte de electrones	LDHA - lactato deshidrogenasa A
Cytc - citocromo c	VDAC - voltage-dependent anion channel
UbQ - ubiquinona	MPT - modificación postraduccional
SDH - succinato deshidrogenasa	KATs - lysine acetyltransferases, por su nombre en inglés
QH2 - ubiquinol	KDACs - lysine deacetylases, por su nombre en inglés
COX - citocromo c oxidasa	SCLC - small cell lung cancer, por su nombre en inglés
ANT - adenine nucleotide translocase, por su nombre en inglés	NSCLC - non-small cell lung cancer, por su nombre en inglés
OAA - oxalacetato	
α-KG - alpha ketoglutarate, por su nombre en inglés	

#### IV. RESUMEN

La mitocondria es un organelo fundamental en el metabolismo y producción de energía. Su función principal es producir adenosín trifosfato (ATP) mediante el sistema de fosforilación oxidativa. Sin embargo, la mitocondria también participa en otros procesos celulares importantes entre los que destacan: el mantenimiento de la homeostasis del calcio, la comunicación núcleo-mitocondria, la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la regulación de la apoptosis y muerte celular. Actualmente gran parte de las vías que regulan la función mitocondrial permanecen desconocidas. Un ejemplo es la regulación mediante la acetilación de residuos de lisina de proteínas mitocondriales. A pesar de que la acetilación de proteínas se ha asociado de manera significativa con el cáncer, así como con otras enfermedades, existen pocos estudios en donde se aborda el papel que juega esta modificación postraduccional (MPT) en proteínas mitocondriales. Se sabe que la acetilación en proteínas mitocondriales posee un efecto principalmente inhibitorio y que sucede de manera no enzimática, favorecida por altas concentraciones de acetil coenzima A y pH alcalino, las cuales son propiedades características de la matriz mitocondrial. Es por esto, que la regulación de la deacetilación de proteínas mitocondriales es fundamental para preservar la función normal en el organelo. La deacetilasa sirtuina 3 (SIRT3) ubicada en la mitocondria, es la enzima principal encargada de la deacetilación en la mitocondria. Esta proteína ha sido fuertemente implicada con la regulación de procesos carcinogénicos, existiendo estudios que sugieren que SIRT3 puede actuar como supresor de tumores o como oncogén. Como supresor previene la reprogramación metabólica, que implica la obtención de energía mediante vías glucolíticas (efecto Warburg) la cual es una característica de la tumorigénesis. No obstante, existen células cancerosas con necesidades metabólicas diferentes que se benefician de la expresión de esta proteína para iniciar procesos carcinogénicos. Nuestro estudio proteómico y acetilómico de proteínas de células derivadas de cáncer de pulmón (A549) y cáncer de mama (MCF7) reveló que existe una regulación importante a través de la acetilación-deacetilación de proteínas, y que SIRT3 tiene un papel importante en dicha regulación. En las células A549, la inhibición de SIRT3 parece tener un efecto protector al prevenir el avance de la enfermedad mediante el enriquecimiento de vías como la reparación del ADN y la detoxificación de ROS. Por otro lado, en células MCF7, la inhibición de SIRT3 parece potenciar la activación de vías asociadas con un pronóstico desfavorable en el cáncer, incluyendo las vías relacionadas con la OXPHOS. Nuestros análisis de citometría sugieren que estas vías podrían estar alteradas, ya que hemos observado un aumento en la producción de ROS mitocondriales. Además, nuestros resultados indican el papel de SIRT3 como oncogénico en células A549 y como supresor en células MCF7.

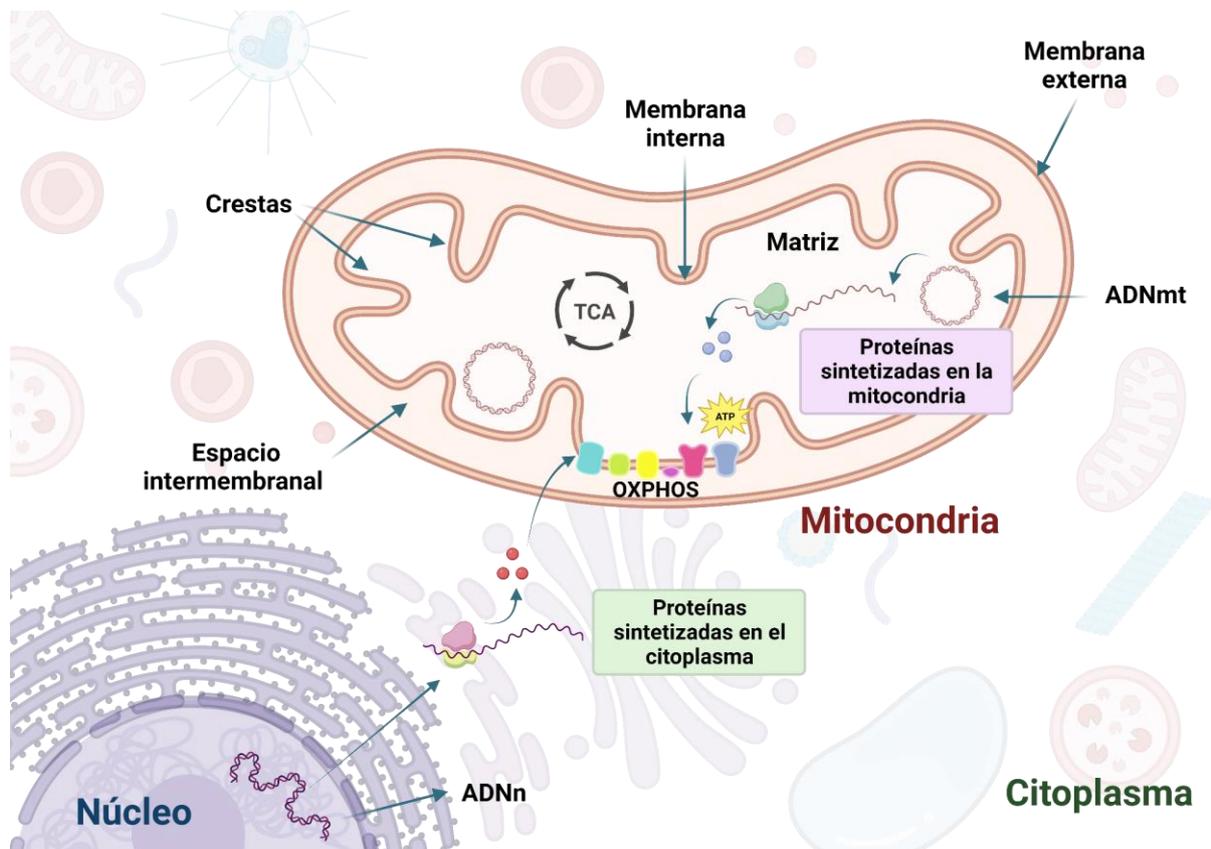
## **1. ANTECEDENTES**

### ***1.1. Origen y estructura general de la mitocondria***

Las mitocondrias son organelos celulares esenciales de las células eucariotas. Su función principal radica en suministrar la energía requerida para llevar a cabo muchos de los procesos intracelulares. En contraste con otras estructuras celulares, se sugiere que las mitocondrias eran bacterias que posteriormente se incorporaron a las células eucariotas [1]. Esta asociación simbiótica estableció una colaboración en el material genético de ambas partes, facilitando la transferencia y origen de nuevos genes, así como la fusión de sus respectivos metabolismos. [1,2].

En concordancia con su origen, la mitocondria presenta una estructura de doble membrana: una membrana mitocondrial externa (MME) lisa y una membrana mitocondrial interna (MMI) que se encuentra plegada, encapsulando la matriz mitocondrial. Además, contiene su propio ADN circular, conocido como ADN mitocondrial (ADNmt), el cual codifica para trece proteínas mitocondriales. Las proteínas mitocondriales restantes son codificadas por el ADN nuclear (ADNn) y posteriormente transportadas a la mitocondria desde el citoplasma. Estas proteínas tienen la capacidad de ubicarse en la matriz mitocondrial, asociarse con la membrana interna o externa, o residir en el espacio intermembranal (Figura 1).

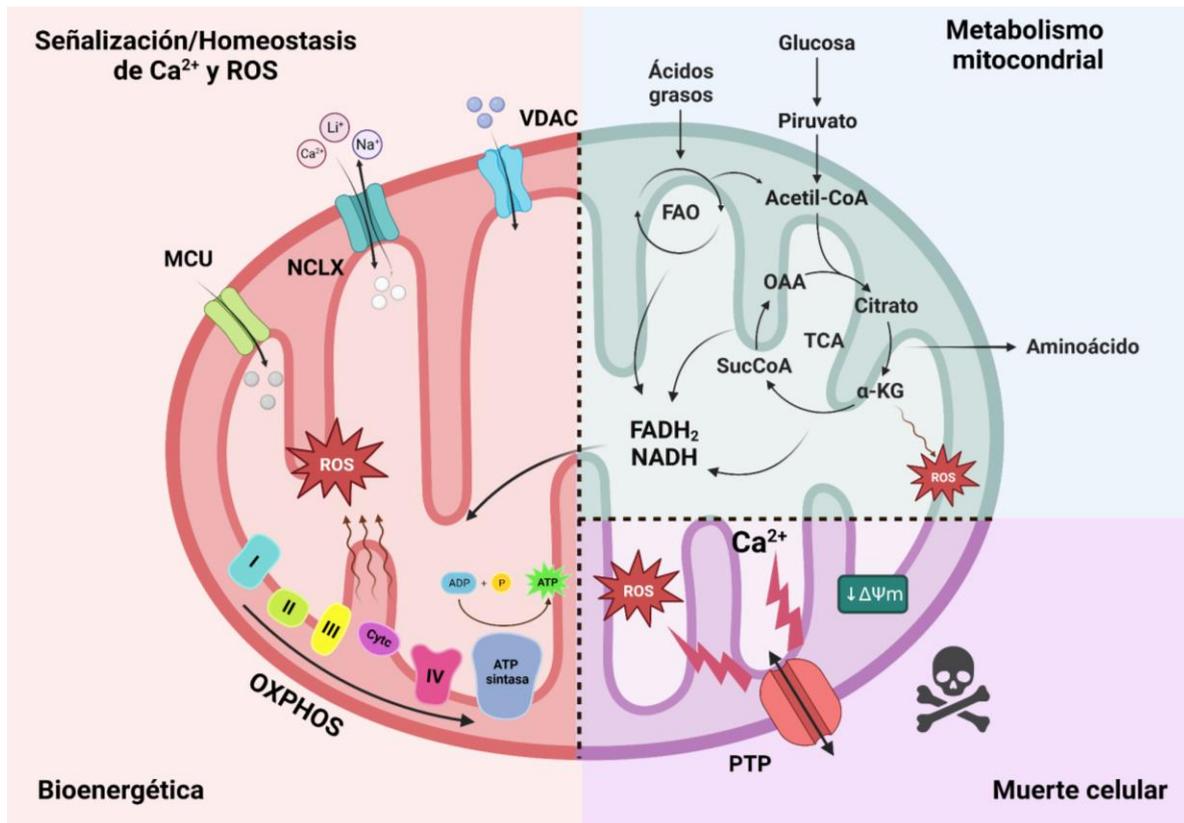
Cada célula alberga una cifra que oscila entre cientos y miles de mitocondrias [3]. Sin embargo, el recuento de estos organelos varía en función de la posición de las células en el organismo. Por ejemplo, las células residentes en el corazón presentan una densidad mitocondrial superior debido a la alta demanda de energía necesaria para ejecutar las tareas mecánicas del corazón [1]. Asimismo, las mitocondrias tienen la capacidad de alterar su estructura y función como respuesta a condiciones fisiológicas y otros factores, tales como la alimentación, el ejercicio, la temperatura y las señales hormonales [4,5]. El óptimo desempeño mitocondrial resulta crucial en la preservación de la homeostasis metabólica, por ende, este componente se encuentra vinculado a trastornos que involucran modificaciones en la cantidad o funcionalidad de las mitocondrias. Ejemplos de estos trastornos son la obesidad, enfermedades cardiovasculares, padecimientos crónico degenerativos como la diabetes y de manera importante el cáncer [6].



**Figura 1. Estructura de la mitocondria.** La mitocondria está compuesta por una membrana externa lisa y otra interna que se encuentra plegada, encapsulando la matriz mitocondrial. Cada uno de estos pliegues en la membrana interna genera crestas, las cuales optimizan la eficiencia de los procesos mitocondriales. Además del ADN nuclear (ADNn), la mitocondria contiene su propio ADN, conocido como ADNmt, que codifica proteínas mitocondriales importantes. Sin embargo, no todas las proteínas mitocondriales se derivan de la información contenida en el ADNmt. De manera complementaria, el ADNn también codifica proteínas destinadas al transporte a la mitocondria. Figura modificada de [7].

## 1.2. Funciones principales de la mitocondria

Las mitocondrias desempeñan un rol de vital importancia en la generación de energía, siendo su función principal la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). No obstante, estos organelos también llevan a cabo diversas funciones de relevancia, tales como el almacenamiento de calcio, el mantenimiento de la homeostasis de especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de la apoptosis y la regulación de la muerte celular, entre otros trabajos significativos.



**Figura 2. Principales funciones de la mitocondria.** En la célula, la mitocondria desempeña un papel esencial en procesos tanto de catabolismo como de anabolismo, lo que resulta crucial para que se lleve a cabo la bioenergética mitocondrial y la señalización intracelular. La bioenergética mitocondrial emerge como el epicentro de la generación de energía, operando mediante la OXPHOS, para el mantenimiento de la función celular. Además, la mitocondria ejerce un estricto control sobre la homeostasis de ROS y calcio, factores críticos en el equilibrio celular, y desempeña un papel determinante en la regulación de la muerte celular a través de vías como la apoptosis. Estas funciones estrechamente interconectadas demuestran la centralidad de la mitocondria en los procesos vitales y las respuestas celulares. Figura modificada de [8].

A continuación, se describirán con mayor profundidad las funciones más importantes de la mitocondria.

### 1.2.1. Cadena de transporte de electrones

Las células utilizan carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos como combustibles para poder generar energía en forma de ATP. Para esto, estos nutrientes son procesados y dirigidos hacia el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) dentro de la matriz mitocondrial. A través de sucesivas reacciones de oxidación, los electrones resultantes son capturados y almacenados en los transportadores NADH y FADH<sub>2</sub>. Estos transportadores se encargan de transferir electrones a la vía metabólica OXPHOS, ubicada en MMI [9]. Esta vía metabólica implica el acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones (CTE) y la generación de ATP [10].

La CTE se organiza en cuatro complejos proteicos anclados en la MMI: complejo I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa), complejo II (succinato deshidrogenasa),

complejo III (citocromo c reductasa) y complejo IV (citocromo c oxidasa). Además, cuenta con dos transportadores de electrones móviles: la ubiquinona hidrofóbica y el citocromo c (Cyt<sub>c</sub>). Por otra parte, la ATP sintasa también denominada complejo V, se encarga de la producción de ATP (ver Figura 2) [11].

El complejo I, también conocido como NADH: ubiquinona oxidorreductasa, se compone de tres módulos fundamentales: 1) un módulo de deshidrogenasa (N), encargado de recibir electrones del NADH, 2) un módulo semejante a la deshidrogenasa (Q) que facilita la transferencia de electrones hacia la ubiquinona (UbQ), y 3) un módulo transportador (P) que efectúa el bombeo de protones a través de la membrana interna desde la matriz mitocondrial. En consecuencia, la función principal de este complejo radica en la transferencia de electrones (ión hidruro :H-) desde el NADH hacia la UbQ, y con la energía liberada durante este proceso se bombean cuatro protones desde la matriz hacia al espacio intermembranal [12,13].

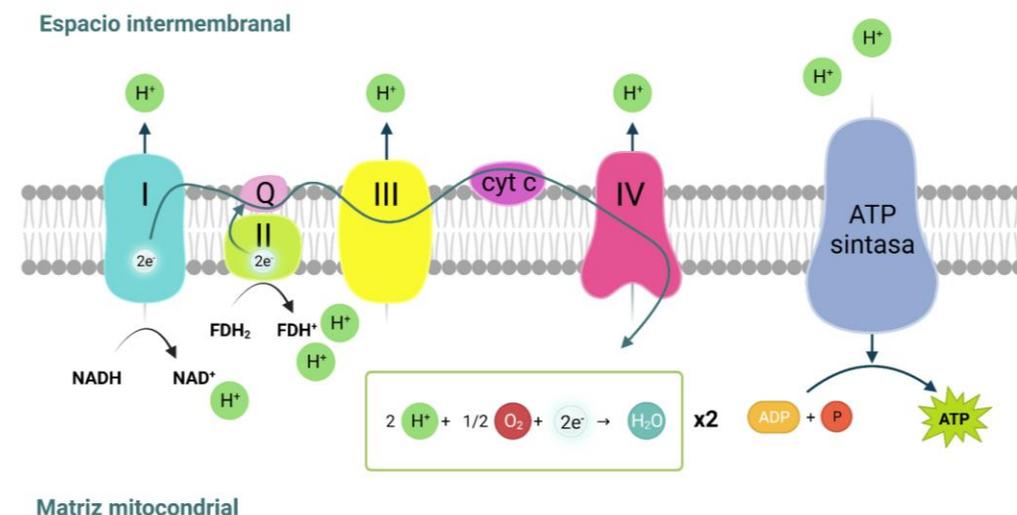
El complejo II, también denominado succinato deshidrogenasa (SDH) es el único complejo de la CTE que interviene simultáneamente en el TCA. Dentro del TCA su función consiste en la oxidación del succinato para formar fumarato, mientras que, en la CTE, se encarga de transferir electrones del succinato hacia la UbQ. Esta transferencia de electrones no conlleva el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna. No obstante, durante este proceso se origina ubiquinol (QH<sub>2</sub>), el cual posteriormente es empleado por el complejo III [12,13].

El complejo III, también denominado citocromo c reductasa, acopla la transferencia de electrones desde QH<sub>2</sub> al citocromo c (Cyt<sub>c</sub>) mediante dos sitios diferenciados: un sitio de reducción de quinona (QN) y un sitio de oxidación de quinol (QP). En el sitio QP, uno de los dos electrones del QH<sub>2</sub> se transfiere inicialmente a la proteína ferrosulfurada de Rieske, continúa hacia Cyt1 y culmina en Cyt<sub>c</sub>, generando un radical semiquinona (Q<sup>•-</sup>), que cede su electrón al oxígeno para generar el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). El segundo electrón del QH<sub>2</sub> reduce la ubiquinona/semiquinona (Q/SQ<sup>-</sup>) en el sitio QN, y la semiquinona traspasa su electrón a Heme b<sub>L</sub> (grupo hemo de Cyt<sub>c</sub>), formando ubiquinona. Heme b<sub>L</sub> aporta un electrón a Heme b<sub>H</sub> (grupo hemo de Cyt<sub>c</sub>), reduciendo otra molécula de ubiquinona y regenerando semiquinona. Este ciclo se conoce como ciclo Q y resulta en la oxidación de dos moléculas de QH<sub>2</sub>, la reducción de dos moléculas de Cyt<sub>c</sub> y la reducción de una molécula de ubiquinona [12]. La transferencia de cada par de electrones desde el QH<sub>2</sub> hasta el Cyt<sub>c</sub> desencadena la liberación de cuatro protones por parte del complejo III [14].

El complejo IV, también denominado citocromo c oxidasa (COX), consta de cuatro centros metálicos redox, que incluyen Cu<sub>A</sub>, hemo a (Fe<sub>a</sub>) y un centro binuclear compuesto por hemo a<sub>3</sub> (Fe<sub>a</sub><sub>3</sub>) y Cu<sub>B</sub>. El Cyt<sub>c</sub> reducido transfiere los electrones primeramente al centro Cu<sub>A</sub>, seguidamente al hemo a, posteriormente al centro hemo a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub>, culminando con la transferencia a la molécula de O<sub>2</sub> [12,13]. Así, en este complejo, se bombean dos protones a través de la membrana por cada par de

electrones, mientras que, al mismo tiempo, dos protones por cada par de electrones se combinan con el  $O_2$  para dar como resultado la formación de  $H_2O$  en el interior de la matriz (Figura 2).

Los protones que se bombean a través de la MMI por los complejos I, III y IV de la CTE generan un potencial electroquímico transmembranal interno ( $\Delta P = \Delta\psi + \Delta\mu H^+$ ). La energía almacenada en esta diferencia de potencial ( $\Delta P$ ) es empleada por la ATP sintasa, también conocida como complejo V de la CTE, para catalizar la conversión de ADP y  $P_i$  en ATP, gracias a dos dominios funcionales: F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>. Este ATP es luego transportado al citosol mediante los translocadores de nucleótidos de adenina (ANT). Sin embargo, el potencial electroquímico transmembranal interno ( $\Delta P$ ) también se emplea en otras funciones dentro de las mitocondrias, como la importación de calcio ( $Ca^{2+}$ ) desde el citosol hacia la matriz mitocondrial [12,15].



**Figura 3. Sistema de fosforilación oxidativa.** Los complejos I, II, III y IV, junto con ATP sintasa (Complejo V), forman una compleja maquinaria para la producción de energía. Estos complejos colaboran en la transferencia de electrones y la generación de un gradiente electroquímico, que a su vez impulsa la síntesis de ATP. Figura modificada de [16].

### 1.2.2 Metabolismo mitocondrial

Previamente mencionamos que la mitocondria utiliza diversas moléculas, como carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos, como combustible para la generación de ATP. El catabolismo de estos nutrientes conduce a la producción de unidades y metabolitos más pequeños, generalmente acetil coenzima A (acetil-CoA), que posteriormente convergen en el TCA. Este ciclo representa la vía metabólica final mediante la cual se transfieren electrones a la CTE para la generación de energía [9,17].

El TCA, consiste en una secuencia de reacciones que se desarrollan en forma cíclica. Comienza con la unión de una molécula de acetil-CoA y una molécula de oxaloacetato

(OAA), dando como resultado la formación de una molécula de citrato. Este citrato luego se transforma en su isómero, el isocitrato. A continuación se producen dos descarboxilaciones oxidativas, en las cuáles el isocitrato se convierte en  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) y luego en succinil-CoA. Esto ocurre con la liberación de dos moléculas de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y la generación de dos moléculas de NADH. Después el succinil-CoA se convierte en succinato, lo que conlleva a la generación de guanosín trifosfato (GTP), que puede posteriormente convertirse en ATP. El succinato se oxida, generando fumarato. En esta reacción, dos átomos de hidrógeno se transfieren a FAD, lo que resulta en la producción de  $\text{FADH}_2$ . Finalmente el fumarato se convierte en malato y, posteriormente en OAA. Esta última molécula se combina nuevamente con otra molécula de acetil-CoA para continuar el ciclo [18]. Cabe aclarar que a pesar de lo anteriormente descrito este ciclo no está estrictamente limitado a un punto de inicio y finalización específicos. En cambio, su progresión puede variar dependiendo de las necesidades metabólicas y la disponibilidad de sustratos.

El acetil-CoA necesario para el TCA se origina a partir de diversas fuentes, con frecuencia derivado de la glucólisis. Durante la glucólisis, realizada en el citoplasma, una molécula de glucosa se oxida a piruvato. Posteriormente, este piruvato se transporta a la matriz mitocondrial, en donde el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) lo oxida a una molécula de dos carbonos (grupo acetilo) que se une con la coenzima A (CoA) para dar lugar a la formación de acetil-CoA [17]. No obstante, otros productos metabólicos del citoplasma celular también ingresan a la mitocondria con el fin de ser aprovechados por el TCA para la posterior generación de energía, entre éstos destacan la glutamina y los ácidos grasos.

La glutamina es el aminoácido libre no esencial más abundante en la sangre y los tejidos [19]. En las mitocondrias, la glutamina se transforma en glutamato y amoníaco gracias a la acción de la enzima glutaminasa. El glutamato, a su vez, se convierte en  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), un componente intermedio del ciclo del TCA, mediante la actividad de una transaminasa y la glutamato deshidrogenasa (GDH). Esto permite que el TCA se mantenga en funcionamiento, permitiendo el transporte de electrones a la CTE para la generación de ATP [9].

Los ácidos grasos por su parte, son utilizados por las mitocondrias para la producción de acetil-CoA a través de la oxidación de los ácidos grasos (FAO). Para esto, los ácidos grasos ingresan a las células a través de proteínas transportadoras específicas y proteínas de unión que facilitan su transporte entre membranas. Antes de ingresar a la mitocondria, los ácidos grasos son convertidos en acil-CoA graso por acción de la enzima acil-CoA sintetasa. Posteriormente, en la MME la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) transforma el acil-CoA graso en acilcarnitina. Estas acilcarnitinas son importadas a la matriz mitocondrial a través de la actividad de la translocasa de carnitina/acilcarnitina. La carnitina palmitoiltransferasa II (CPT2) restaura la acilcarnitina en acil-CoA graso, dando inicio al FAO y a la generación de acetil-CoA. El acetil-CoA se incorpora en el TCA para continuar con el proceso de

generación de energía o bien puede ser utilizado para la síntesis de otras moléculas [9,20].

En situaciones de estrés celular, se produce un cambio significativo en el equilibrio entre las distintas moléculas utilizadas para la generación de energía. En células en crecimiento y en proceso de proliferación, como ocurre en las células cancerosas, el TCA funciona de manera distinta. Esto se debe a que algunos de sus componentes intermedios se desvían hacia diversas rutas biosintéticas para abastecerlas de los recursos necesarios. Como consecuencia, el TCA no se enfoca tanto en su contribución a la producción de energía, como lo hace en células no cancerosas. En su lugar, su atención se concentra principalmente en la síntesis de productos indispensables para el mantenimiento de las células [21]. Normalmente, la mayoría de la energía requerida para llevar a cabo todos los procesos intracelulares se obtiene de la OXPHOS como se verá más adelante.

### *1.2.3 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria*

Las ROS son moléculas, radicales o iones, que presentan un electrón desapareado en su capa más externa, lo que las hace altamente reactivas. Se pueden clasificar en dos categorías principales: los radicales libres de oxígeno y las ROS no radicales [22,23].

En las mitocondrias, el complejo I y el complejo III son los principales sitios de origen de ROS; no obstante, otras enzimas mitocondriales también contribuyen a la producción de estas especies [24]. El superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) son las principales ROS generadas como subproducto tóxico en las mitocondrias [6]. Estas ROS desempeñan un papel como segundos mensajeros, activando rutas de señalización para la proliferación celular. Sin embargo, un incremento excesivo de ROS puede desencadenar alteraciones en la función normal de la célula, dando lugar a daños en macromoléculas tales como proteínas, lípidos y ADN. Esto, a su vez, conlleva alteraciones en la función mitocondrial y puede desencadenar eventos asociados con la apoptosis celular [17,25].

Pese a que la mitocondria contribuye de manera importante a la generación y acumulación de ROS en la célula, no es el único compartimento intracelular en donde se generan estas especies, los peroxisomas y el retículo endoplasmático (RE) también contribuyen al efecto nocivo que estas especies pueden ejercer sobre la célula, subrayando así la importancia de su detoxificación. El proceso de detoxificación de ROS se ejecuta tanto a través de moléculas no enzimáticas, como el glutatión, los flavonoides y ciertas vitaminas, así como enzimas antioxidantes. Entre estas últimas, destacan las superóxido dismutasas (SOD), que catalizan la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, las catalasas, que descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, las glutatión peroxidadasas (GPX) que

intervienen en la descomposición del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos inorgánicos, entre otras [23].

En el contexto específico de las mitocondrias, el superóxido generado en la matriz mitocondrial es transformado en  $H_2O_2$  mediante la acción de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD). En paralelo, el superóxido producido en el espacio intermembranal, mayormente atribuible al complejo III de la CTE, dismuta por la Cu/ZnSOD o SOD1. Dado que el nivel de reactividad de  $H_2O_2$  es relativamente bajo, se considera la principal ROS señalizadora en el interior de la célula, y su concentración se encuentra en un estricto estado de equilibrio gracias a la actividad de enzimas que se encargan de catalizar su conversión a  $H_2O$  [26]. Además, la isocitrato deshidrogenasa 2 (mitocondrial), una participante en el TCA que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato a  $\alpha$ -KG, también contribuye a la prevención de la acumulación de ROS, al depender del cofactor  $NADP^+$  y generar NADPH [23].

#### *1.2.4 Almacenamiento de calcio en la mitocondria*

Las mitocondrias muestran una distribución reticular a lo largo de toda la célula, lo que les otorga la capacidad de captar y almacenar iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) de manera eficiente [27,28]. Es precisamente esta característica la que conduce a la participación activa de las mitocondrias en la regulación de la homeostasis de los iones  $Ca^{2+}$ . Dentro de las mitocondrias, el aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  está asociado con una mejora en el metabolismo oxidativo y un incremento en la producción de ATP. Este proceso se desencadena debido a que el  $Ca^{2+}$  activa a la cetoglutarato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa, enzimas clave en el TCA, estimulando la síntesis de ATP [28–30].

El ion  $Ca^{2+}$  es transportado al interior de la mitocondria a través de una proteína denominada uniportador de calcio mitocondrial (MCU), cuya función principal es posibilitar la captación eficiente de  $Ca^{2+}$  desde el citosol así como desde el retículo endoplasmático (RE) de manera rápida y efectiva [28,31]. Se sugiere que MCU desempeña dos roles fundamentales: primero, evita que el  $Ca^{2+}$  se acumule excesivamente dentro de la mitocondria al restringir su ingreso cuando los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico son elevados; segundo, actúa como regulador que supervisa la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria. Por ende, resulta de vital importancia la regulación de MCU para mantener la funcionalidad bioenergética de las mitocondrias [28].

Pese a que niveles elevados de iones  $Ca^{2+}$  se asocian con una mejora en OXPHOS, el exceso de estos iones se vincula con el proceso de muerte celular. En situaciones de acumulación excesiva de  $Ca^{2+}$  se desencadena la activación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP). La apertura de este poro provoca la liberación desde las mitocondrias hacia el citosol del Cytc, una molécula con propiedades proapoptóticas. Esta liberación marca el inicio de una cascada de señalización

apoptótica, también conocida como muerte celular programada, tema que trataremos a continuación [17,28].

### *1.2.5 Apoptosis y muerte celular*

Las mitocondrias se encuentran regulando la muerte celular a través de la apoptosis y la necroptosis. La apoptosis, un tipo de muerte celular programada, es un mecanismo que los organismos han desarrollado para eliminar células innecesarias o que no contribuyen al funcionamiento adecuado del cuerpo [32,33]. Puede ocurrir por varias vías de señalización, sin embargo, la vía central para que se lleve a cabo este proceso es mediante la activación en cascada de un grupo de cisteínas proteasas también llamadas caspasas [17].

Tras la exposición a diversos estímulos apoptóticos, se activan las caspasas iniciadoras (como las caspasas -2, -8 y -9), las cuales, a su vez, llevan a cabo la escisión y activación de las formas inactivas de las caspasas efectoras (como las caspasas -3, -6 y -7), iniciando así la escisión proteolítica de sustratos celulares específicos y, en consecuencia, provocando la muerte celular [33,34].

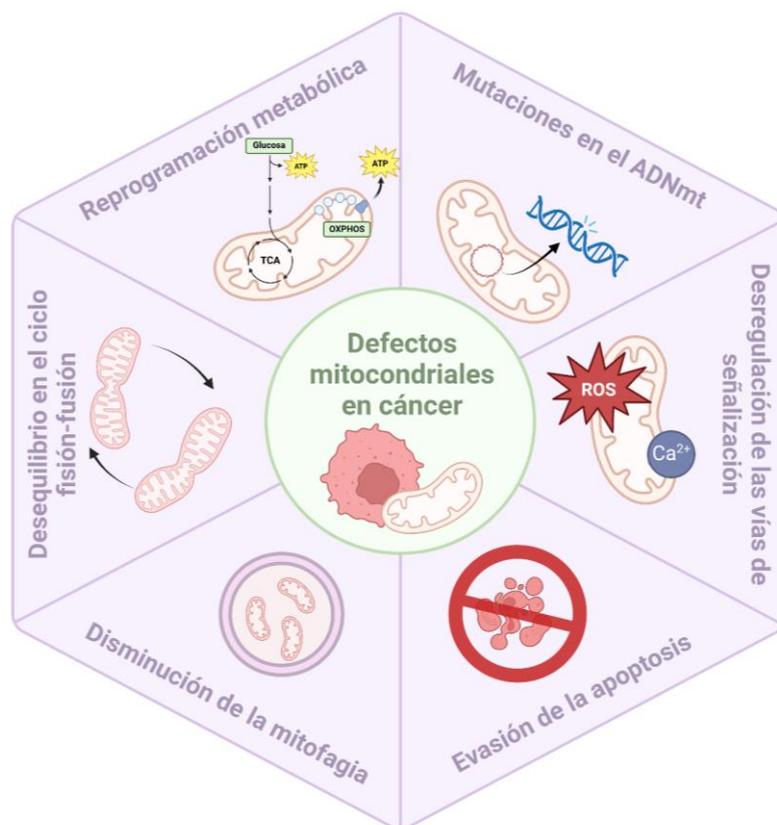
Las mitocondrias participan en las dos rutas principales de apoptosis, la vía extrínseca y la vía intrínseca; no obstante, desempeñan papeles distintos en cada una de ellas [17]. En la vía extrínseca las mitocondrias estimulan un bucle de amplificación que activa la cascada de caspasas. Mientras que en la vía intrínseca, señales como daño al ADN, incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y estrés oxidativo, estimulan la apertura de la membrana externa mitocondrial, a través del PTP, lo que resulta en la liberación de factores proapoptóticos alojados en las mitocondrias, como por ejemplo Cyt c [17,35] (ver Figura 3).

Además, se ha constatado que las mitocondrias desempeñan un papel en la promoción de un tipo de muerte celular denominada necroptosis [36], la cual se define como una forma regulada de necrosis [37]. En términos generales, la necroptosis, implica la participación del factor de necrosis tumoral (TNF) cuando se bloquea la función apoptótica. El TNF activa las proteínas cinasas 1 y 3 (RIPK1 y RIPK3), las cuales interactúan con el receptor, desencadenando la formación del necrosoma. RIPK3 fosforila la pseudocinasa similar al dominio de cinasa de linaje mixto (MLKL), lo que lleva a su activación. El MLKL oligomerizado y activado permeabiliza la membrana plasmática provocando la muerte de la célula [38]. Se sabe que RIPK3 activa el complejo PDH, mejorando el funcionamiento del sistema OXPHOS, lo que lleva a una mayor producción de ROS mitocondriales en las células. Estas ROS pueden promover la autofosforilación de RIPK1, llevando a su activación y a la formación del necrosoma [38–40]. Existen otros intermediarios de la necroptosis inducida por TNF entre los que destaca el  $\text{Ca}^{2+}$ [37].

Como se mencionó en la *sección 1.1*, el mantenimiento equilibrado de todas estas funciones mitocondriales es de vital importancia para prevenir el desarrollo de ciertas enfermedades, siendo el cáncer una de las más relevantes.

### 1.3. Mitocondria y cáncer

Se ha observado que los cambios en la cantidad y contenido del ADNmt, las alteraciones en la expresión y la actividad de la CTE, así como mutaciones en el ADNmt, dan lugar a una desregulación mitocondrial que está directamente relacionada con el inicio y progresión del cáncer [1,41]. En esta sección, se explorará con mayor detalle cómo esta desregulación mitocondrial promueve una reprogramación metabólica que permite a la célula adaptarse al estrés mitocondrial.



**Figura 4. Defectos mitocondriales en cáncer.** La interconexión de defectos mitocondriales juega un papel crucial en la patogénesis del cáncer. Estos abarcan un espectro que incluye mutaciones en el ADNmt, reprogramación metabólica, desequilibrio en el ciclo fisión-fusión, disminución de la mitofagia, evasión de la apoptosis y desregulación de las vías de señalización.

A continuación, se describirán con mayor detalle cada uno de estos defectos mitocondriales en el cáncer.

### 1.3.1 Genoma mitocondrial

Como se mencionó en la *sección 1.1*, la hipótesis sostiene que las mitocondrias tienen origen bacteriano y que, mediante un evento evolutivo, se integraron con las células eucariotas. Esta simbiosis no sólo marcó el surgimiento de las mitocondrias, sino que también facilitó la transferencia y origen de nuevos genes, otorgando a las células eucariotas ventajas adaptativas mediante la contribución de material genético. Por este motivo, las mitocondrias poseen su propio ADN, y de manera complementaria, el ADN nuclear desempeña un papel en la codificación de proteínas que son aprovechadas por la mitocondria.

El ADNmt tiene un tamaño de 16,5 kb, y contiene información para la síntesis de 13 polipéptidos cruciales en la CTE, los cuales son esenciales para la función de la OXPHOS. Además, el ADNmt codifica 2 ARN ribosomales (ARNr) y 22 ARN de transferencia (ARNt) [42]. Entre los genes que codifica el ADNmt en la CTE, se incluyen siete de las cuarenta y cinco subunidades del complejo I (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5 y 6), el citocromo b (cytb) del complejo III, tres de las trece subunidades del complejo IV (COI, II, y III), y dos de las dieciséis subunidades del complejo V (ATP 6 y 8) [15].

Investigaciones previas han demostrado que la eliminación de ADNmt conlleva una disminución en la tasa de crecimiento de las células [25]. En el contexto del cáncer, las mutaciones que emergen en el ADNmt suprimen la actividad de proteínas implicadas en la OXPHOS, lo cual está directamente vinculado a irregularidades en el metabolismo energético de las células [15]. Sin embargo, el ADNmt no es el único componente afectado en el contexto del cáncer; también se han identificado mutaciones en enzimas mitocondriales codificadas por el ADNn.

Por mencionar algunas de las mutaciones encontradas, se han detectado mutaciones en los genes que codifican las subunidades de la SDH, en la enzima fumarato hidratasa, así como en los genes de las isocitrato deshidrogenasas (IDH), en concreto, en los genes IDH1 e IDH2 [25].

### 1.3.2 Reprogramación metabólica

Como se mencionó anteriormente, en células sanas, el piruvato proveniente de la glucólisis u otras vías metabólicas se emplea en el TCA. Esto facilita la producción de los transportadores NADH y FADH<sub>2</sub>, que desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento adecuado de la OXPHOS y, en consecuencia, en la generación de energía en forma de ATP. No obstante, esto no sucede en muchas células cancerosas [43].

Las células cancerosas obtienen la mayor parte de su energía a través de la glucólisis. El piruvato que generan se convierte en lactato en lugar de ser utilizado en el TCA para poner en marcha la vía metabólica de la OXPHOS que produce 28 moléculas de

ATP. A pesar de que la glucólisis sólo genera dos moléculas de ATP, su velocidad es aproximadamente 100 veces más rápida que la OXPHOS. Este cambio en el metabolismo de las células cancerosas se conoce como reprogramación metabólica o efecto Warburg [43], en honor a Otto Warburg, quien fue pionero en describir esta alteración en el metabolismo de las células cancerosas [44]. A lo largo del tiempo, múltiples investigaciones han corroborado que este efecto constituye una característica fundamental en células cancerosas, ya que les posibilita un crecimiento y proliferación desmesurados, además de suprimir la apoptosis [34].

Se reconoce que las células cancerosas se encuentran expuestas a bajas concentraciones de oxígeno desde las etapas iniciales de la carcinogénesis. Esto se debe, en parte, al microambiente celular que evoluciona a medida que se forma el tumor, a este fenómeno se le conoce como hipoxia celular [34,45,46]. En estas circunstancias, el factor de transcripción denominado factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), se encarga de regular la expresión génica. Este factor se compone de dos subunidades: HIF-1 $\beta$ , que se expresa de manera constitutiva, y HIF-1 $\alpha$ , cuya expresión es exclusiva en situaciones de hipoxia [46]. Por lo tanto, el proceso de degradación de la subunidad HIF-1 $\alpha$  es de suma importancia para la evasión de la reprogramación metabólica.

El proceso de degradación del HIF-1 $\alpha$  implica la hidroxilación de los residuos de prolina por las enzimas prolin-hidroxilasas en sus dos dominios de degradación de oxígeno, seguido del reconocimiento por parte del supresor de tumores von Hippel-Lindau (VHL), que en colaboración con las elonginas B y C, actúa como una ubiquitina ligasa E3, marcando a la proteína HIF-1 para su degradación a través del proteosoma. En condiciones de hipoxia, la actividad de las hidroxilasas se ven comprometidas, impidiendo así el reconocimiento de HIF-1 $\alpha$  por parte de VHL. Esto permite su estabilización y la subsiguiente formación de un dímero con HIF-1 $\beta$  [47]. En consecuencia, la actividad de HIF-1 depende de la conservación de la subunidad HIF-1 $\alpha$  para posibilitar la transcripción de los genes diana de HIF-1. Entre estos genes se encuentran aquellos relacionados con el metabolismo glucolítico, como los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT3), las hexoquinasas (HK1 y HK2), la piruvato deshidrogenasa (PDH), la lactato deshidrogenasa A (LDHA), así como las proteínas vinculadas a la eliminación de mitocondrias dañadas, como BNIP3 [34,48].

La estabilización de HIF-1 $\alpha$  puede acontecer incluso en ausencia de hipoxia, y un ejemplo de ello es la influencia del fumarato y el succinato. Estos metabolitos impiden la degradación de la subunidad HIF-1 $\alpha$  al interferir con la actividad de la enzima prolin-hidroxilasa, lo que resulta en una regulación positiva de HIF-1 [49]. El exceso de estos metabolitos mitocondriales se observa en ciertos tipos de cáncer que presentan mutaciones en las enzimas succinato deshidrogenasa y fumarato hidratasa del TCA [46,50].

Además de HIF-1 $\alpha$ , otros factores de transcripción de gran importancia en la reprogramación metabólica son c-Myc y p53. En células cancerosas, c-Myc estimula tanto la producción de energía como la síntesis de biomoléculas, aspectos fundamentales para lograr una proliferación acelerada. Lo hace de manera independiente de los estímulos de factores de crecimiento. Además, de manera análoga al factor HIF-1, c-Myc fomenta la expresión de genes vinculados al metabolismo glucolítico, como los que codifican para los transportadores de glucosa, la piruvato cinasa y la LDHA [51].

Por otro lado, el factor de transcripción p53 es conocido como un supresor de tumores y desempeña un papel en la regulación tanto de la glucólisis como de la OXPHOS. No obstante, en células cancerosas, la actividad de este factor se ve inhibida, resultando en la pérdida de sus funciones, y por ende, en la promoción de la obtención de energía a través de la glucólisis [46]. Asimismo existen otros elementos que también contribuyen a la reprogramación metabólica en las células cancerosas, como las mutaciones en las isocitrato deshidrogenasas (IDH1 e IDH2) que generan oncometabolitos que alteran el equilibrio redox en la célula [25], la actividad de la piruvato cinasa M2, y el proceso de respiración del fumarato [46].

Es importante destacar que, además del efecto Warburg, las células cancerosas también se caracterizan por experimentar un aumento en la glutaminólisis y la síntesis de novo de ácidos grasos. La glutaminólisis como se detalló en la sección 1.2.2, alimenta al TCA y proporciona esqueletos de nitrógeno y carbono para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos. Por otro lado, los ácidos grasos que se sintetizan a partir de acetil-CoA y NADPH, desempeñan un papel crítico en la formación de la membrana celular en las células cancerosas. Esto se debe a la elevada tasa de proliferación que caracteriza a estas células [20].

Cabe señalar que no todos los tipos de cáncer experimentan consistentemente esta alteración en la bioenergética mitocondrial. Algunas células cancerosas obtienen la mayor parte de su ATP a través de la OXPHOS, es decir existe heterogeneidad metabólica en ciertos tumores, donde algunas células mantienen un metabolismo glucolítico y otras tienen predominantemente un metabolismo oxidativo [52,53].

### *1.3.3 Desregulación de la homeostasis de ROS y Ca<sup>2+</sup> en la mitocondria*

Como mencionamos previamente, las mitocondrias constituyen la principal fuente de ROS dentro de la célula, lo que enfatiza la importancia de regularlas adecuadamente para mantener un funcionamiento óptimo. El aumento de estas especies reactivas promueve la activación de vías de señalización oncogénicas, lo que conduce a procesos anómalos en el interior de la célula [24].

La presencia excesiva de ROS, tiene el potencial de dañar el ADN, las proteínas y los lípidos, provocando perturbaciones en la CTE. Como resultado, esto contribuye a la reprogramación metabólica y a la evasión de la muerte celular. Se ha demostrado que factores como la hipoxia, la activación de oncogenes, la supresión de genes supresores de tumores y la disfunción mitocondrial derivada de mutaciones en el ADNmt, o deficiencias enzimáticas, llevan a un aumento en la generación de ROS mitocondriales [54].

Sin embargo, las ROS no son las únicas especies que contribuyen al desarrollo del cáncer. El  $\text{Ca}^{2+}$ , por un lado, promueve la generación de ATP (*ver sección 1.2.4.*), lo que permite a las células cancerosas producir suficiente energía para mantener su crecimiento aberrante [28]. Por otro lado, la transferencia insuficiente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores de inositol trifosfato (IP3R) desde el retículo endoplasmático (RE) a las mitocondrias también contribuye a la activación de la autofagia. Esta consiste en eliminar y reciclar componentes celulares deteriorados o aberrantes a través de su secuestro en vesículas. En las células cancerosas, un aumento en la autofagia es un evento ventajoso ya que evita que la célula entre en la vía apoptótica, favoreciendo así el desarrollo y la progresión del cáncer [55].

Otras proteínas reguladoras importantes incluyen el MCU y el canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC). Una expresión reducida de MCU se correlaciona con una disminución en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que promueve la supervivencia de las células cancerosas [56]. VDAC, por otro lado, se relaciona con la reprogramación metabólica, ya que media la comunicación entre la célula y las mitocondrias. Además de facilitar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , VDAC establece un puente entre la glucólisis y la OXPHOS al interactuar con las HK. La expresión de VDAC se ve influenciada por los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula [28,57].

#### *1.3.4 Evasión de la apoptosis*

La evasión de la apoptosis es una característica distintiva del cáncer. Este fenómeno ocurre a través de la activación o inactivación de factores de transcripción que afectan la expresión de reguladores apoptóticos [33].

Para evadir la apoptosis, las células cancerosas aumentan o mejoran la estabilidad de las proteínas de la familia BCL-2 antiapoptóticas (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-w y Bcl-XL), al mismo tiempo que suprimen a nivel transcripcional o postranscripcional las proteínas BCL-2 proapoptóticas (por ejemplo, Bax y Bak). Este proceso ocurre a través de la activación del factor de transcripción p53. Como resultado, las proteínas BCL-2 regulan la migración, invasión y, en consecuencia, la metástasis del cáncer. [33,58]. El aumento en la expresión de proteínas BCL-2 se observa en varios tipos de células cancerosas (por ejemplo, cáncer de mama y pulmón) [59,60], lo cual se ha relacionado con un aumento en las capacidades migratorias e invasivas. Sin embargo,

muchas veces esta sobreexpresión por sí sola no es suficiente para inducir estos efectos, siendo necesaria la coexpresión con otras proteínas como c-Myc, n-Myc y Twist1, así como condiciones de hipoxia celular [58].

De manera interesante, las células que muestran una disfunción mitocondrial persistente y presentan una mayor producción de ROS, desempeñan un papel crucial en la decisión de si una célula inicia el proceso de necroptosis [38].

#### *1.3.5 Ciclo fisión-fusión mitocondrial*

El ciclo coordinado de fisión y fusión mitocondrial ocurre de manera continua y equilibrada, siendo responsable de las variaciones en la longitud de las mitocondrias dentro de la célula. Esta dinámica permite el mantenimiento de un fenotipo y función mitocondrial adecuados, y abarca la regulación del ADNmt y la redistribución de las mitocondrias [61,62]. Los defectos en este ciclo se han asociado de manera estrecha con el cáncer.

La fisión mitocondrial es un proceso en el cual las mitocondrias se dividen, esto permite un aumento en el número de mitocondrias en las células y desempeña un papel central en el control de calidad mitocondrial. Cuando las mitocondrias experimentan despolarización, la fisión, junto con otros mecanismos mitocondriales relacionados con el control de calidad, proporciona un mecanismo para segregar componentes funcionales de aquellos que son disfuncionales. Las mitocondrias hijas que están despolarizadas tienen una probabilidad reducida de fusionarse y, en su lugar, activan vías de señalización que desencadenan la autofagia mitocondrial selectiva, conocida como mitofagia [63,64].

La evidencia sugiere que el aumento en la fisión mitocondrial es una característica que las células cancerosas exhiben como una estrategia para evadir la apoptosis. La hiperfragmentación de las mitocondrias resulta en la incorporación disfuncional de Bax (una proteína antiapoptótica de la familia BCL-2) en la membrana, lo que a su vez conduce a la formación de poros [58].

La fusión mitocondrial implica la unión de dos o más mitocondrias, y las células emplean este proceso como un mecanismo para contrarrestar los efectos perjudiciales de las mitocondrias dañadas en su interior. De esta manera, la célula puede fusionar mitocondrias defectuosas con aquellas que se encuentran en buen estado, lo que contribuye al óptimo funcionamiento mitocondrial. Entre los procesos que la fusión regula se encuentran el aumento de ROS, la disminución del potencial de membrana mitocondrial y el equilibrio de la heteroplasmia mitocondrial [10,61].

Es por lo expuesto anteriormente que el desequilibrio en el ciclo de fisión y fusión mitocondrial, especialmente una hiperactivación de la fisión, desempeña un papel impulsor en la oncogénesis, la metástasis y la progresión del cáncer.

### *1.3.6 Mitofagia*

La mitofagia, también conocida como autofagia mitocondrial selectiva, es un proceso fundamental para prevenir el daño celular causado por mitocondrias dañadas. Este proceso posibilita la renovación de las mitocondrias al capturar aquellas que presentan deterioro y posteriormente degradarlas en los lisosomas [65].

En el contexto del cáncer, esta capacidad de control de calidad mitocondrial se ve reducida, ya que la acumulación de mitocondrias defectuosas conduce a un incremento en la generación de ROS, que a su vez, inducen mutaciones en el ADNmt, contribuyendo de este modo a un metabolismo oxidativo deficiente. Por lo tanto, en el cáncer, la mitofagia desempeña un papel crucial al permitir la supervivencia celular o la apoptosis, en función del contexto celular específico [63].

## **1.4. Mecanismos de regulación de proteínas mitocondriales**

### *1.4.1 Modificaciones postraduccionales*

Se estima que el proteoma humano comprende alrededor de un millón de proteínas, una cifra que supera el número de genes presentes en el genoma humano (aproximadamente 30,000 genes). Esta amplia discrepancia se debe al hecho de que las células emplean dos mecanismos para incrementar la diversidad, complejidad y heterogeneidad de su proteoma. En primer lugar, se lleva a cabo el proceso de empalme alternativo del ARN mensajero, el cual se desarrolla a nivel transcripcional [66]. En segundo lugar, se encuentran las modificaciones postraduccionales (MPT), que ocurren cuando se añaden de manera covalente grupos funcionales a uno o varios residuos de aminoácidos en las proteínas. Estas adiciones pueden llevarse a cabo de manera enzimática o sin depender de una enzima.

Se han identificado más de 200 tipos diferentes de MPT [67]. Estas MPT desempeñan un papel fundamental en la regulación de las proteínas, controlando diversos procesos fisiológicos y celulares. Entre estos procesos se incluyen la diferenciación celular, la degradación de proteínas, los mecanismos de señalización, la localización intracelular de las proteínas, la regulación de la actividad enzimática, la modulación de la expresión génica y las interacciones proteína-proteína.

Entre las MPT, la fosforilación ha sido el principal objeto de estudio de muchos investigadores, lo que ha permitido un mayor entendimiento de sus diversas implicaciones en los procesos celulares [68]. Aunque en menor proporción, otras MPT también han sido objeto de estudio. Sin embargo, una que ha capturado particular atención es la acetilación de residuos de N( $\epsilon$ )-lisina. Esta modificación ha sido estrechamente asociada con diversas enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer [69].

#### *1.4.2 Acetilación y desacetilación de residuos de lisina*

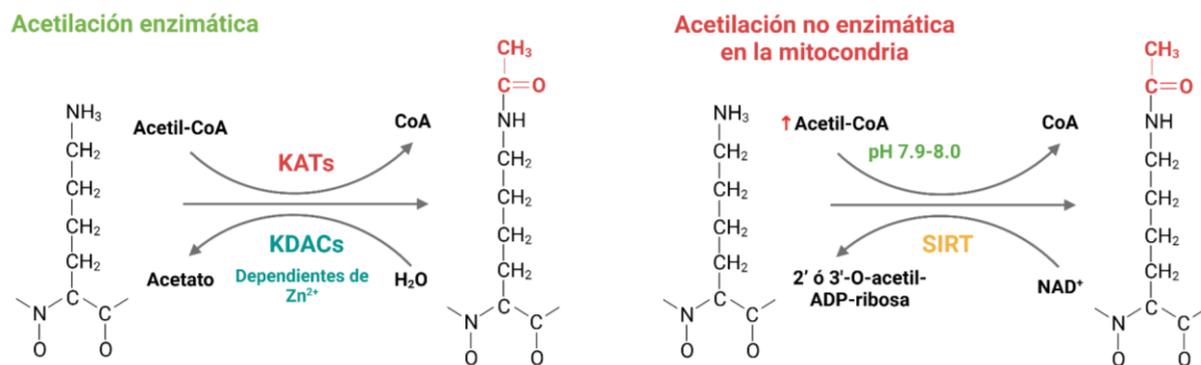
La acetilación de N( $\epsilon$ )-lisina consiste en la transferencia de un grupo acetilo desde la acetil-CoA hacia la amina primaria ubicada en la posición  $\epsilon$  de la cadena lateral de lisina dentro de una proteína [70]. Esta transferencia es comúnmente catalizada por un conjunto de proteínas denominadas lisina acetiltransferasas (KATs) [68,71]. Aunque la acetilación en su mayoría es mediada por estas KATs, en el entorno mitocondrial no se ha identificado una KAT específica. Sin embargo, hay indicios de que la acetilación en este organelo ocurre independientemente de enzimas, únicamente a través de la acetil-CoA [68].

Es importante señalar que las condiciones fisiológicas en la matriz mitocondrial son distintas a las de otros compartimentos celulares. Siendo el principal sitio de utilización de carbono, presenta concentraciones elevadas de acetil-CoA (0.1-1.5 mM) y su pH oscila entre 7.9 y 8.0 debido a la expulsión de iones  $H^+$  a través de la MMI. Ambas condiciones parecen propiciar la acetilación no enzimática, también conocida como acetilación química (ver Figura 5) [72].

Sin importar si la acetilación se da por vía enzimática o no enzimática, las fluctuaciones en los niveles de acetil-CoA ejercen un efecto en los niveles de acetilación. Como mencionamos previamente, la acetil-CoA puede ser generada mediante diversas rutas dependiendo de la disponibilidad de nutrientes en la célula, siendo un metabolito central en la bioenergética mitocondrial. Cualquier modificación en la producción de acetil-CoA tiene consecuencias significativas en el funcionamiento de las proteínas celulares [71].

La acetilación de proteínas puede tener una variedad de efectos según el contexto celular, incluyendo la localización, activación, inhibición, estabilización o facilitación de interacciones proteína-proteína o proteína-ADN [73].

La acetilación es un proceso que puede revertirse a través de la deacetilación. Existen dos clases primarias de deacetilasas: las lisinas deacetilasas (KDAC) dependientes de  $Zn^{2+}$  y las sirtuinas deacetilasas dependientes de  $NAD^+$  (Figura 5). Las KDACs principalmente se encuentran en el núcleo y el citoplasma, mientras que las deacetilasas sirtuinas se distribuyen en distintos compartimentos celulares: SIRT1 y SIRT6 se localizan en el núcleo, SIRT7 en el nucleolo, SIRT2 en el citoplasma y SIRT3, SIRT4 y SIRT5 en las mitocondrias [71].



**Figura 5. Acetilación y deacetilación.** La acetilación, catalizada por enzimas específicas, KATs, implica la adición de un grupo acetilo a residuos de lisina en proteínas. Sin embargo, en la mitocondria ocurre de manera no enzimática, gracias a las condiciones de la matriz mitocondrial, elevadas concentraciones de acetil-CoA y pH alcalino. Por otro lado, la deacetilación es llevada a cabo por enzimas deacetilasas KDACs dependientes de  $Zn^{2+}$  o por sirtuinas deacetilasas dependientes de  $NAD^+$ . Consiste en la eliminación de grupos acetilo de las proteínas, lo que puede revertir los efectos de la acetilación. Figura modificada de [68].

#### 1.4.3 Efectos en la acetilación de proteínas mitocondriales

Dentro de la amplia gama de sistemas de regulación vinculados al inicio y progresión del cáncer, la acetilación-deacetilación de proteínas mitocondriales emerge como un área crítica para futuras investigaciones. Este enfoque adquiere importancia dado que se ha establecido que más de un tercio de todas las proteínas presentes en las mitocondrias experimentan acetilación, siendo la mayoría de ellas participantes en procesos de bioenergética mitocondrial [74].

Tal como se mencionó con antelación, la acetilación de las proteínas mitocondriales es fundamentalmente de naturaleza no enzimática, mientras que la deacetilación está mediada por tres sirtuinas: SIRT3, SIRT4 y SIRT5. Sin embargo, se ha observado que SIRT3 exhibe la actividad deacetilasa mitocondrial más robusta [75]. SIRT3 se dirige hacia proteínas y enzimas que suelen regularse mediante la eliminación de grupos acetilo, las cuales son esenciales para el correcto funcionamiento de las mitocondrias en la célula. Ejemplos de estas proteínas son la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD), la PDH, la acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2), la IDH2, la superóxido dismutasa 2 (SOD2) y los complejos I-III y V (ATP sintasa) de la cadena de transporte de electrones, entre otras que desempeñan un papel crucial en el metabolismo [76].

A partir de lo mencionado, es evidente que la acetilación de proteínas mitocondriales ejerce principalmente una función inhibitoria [77]. Por lo tanto, esto sugiere que la deacetilación es fundamental para el funcionamiento adecuado de las mitocondrias y, por ende, para prevenir la reprogramación metabólica característica del cáncer.

## **2. ANTECEDENTES INMEDIATOS**

### ***2.1 Papel de SIRT3 en el cáncer***

Dado que SIRT3 desempeña un papel crucial como deacetilasa en la preservación de la función mitocondrial, varios grupos de investigación han explorado su relevancia en el cáncer. A pesar de que SIRT3 desempeña una función esencial en la regulación de proteínas relacionadas con el metabolismo oxidativo, se ha observado que su papel va más allá de ser únicamente un supresor de tumores que evita la reprogramación metabólica. De hecho, en ciertos tipos de cáncer, se ha evidenciado que SIRT3 opera como un oncogén, lo que significa que puede promover el desarrollo y progresión de la enfermedad [78,79].

Anteriormente, abordamos las alteraciones mitocondriales más frecuentes en el contexto del cáncer. No obstante, es importante destacar que dichas alteraciones no se manifiestan de la misma manera en todos los tipos de cáncer. Dos tipos de cáncer que tienen un alto interés en la investigación son el cáncer de pulmón y el cáncer de mama. Estos dos tipos de cáncer resultan especialmente relevantes dado que, según las estadísticas globales sobre el cáncer de 2020, encabezan las listas como las principales causas de muerte por cáncer en hombres y mujeres respectivamente [80]. Además, diversos estudios han arrojado indicios de que SIRT3 tiene un comportamiento diferenciado en estos dos tipos de cáncer; opera como un oncogén en el cáncer de pulmón y como un supresor de tumores en el cáncer de mama [79].

El cáncer de pulmón se desarrolla por diversos factores que incluyen la contaminación del aire, la exposición prolongada a carcinógenos, predisposición genética y, de manera significativa, el hábito de fumar. Este tipo de cáncer se subdivide en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) [81]. El último de estos representa alrededor del 80% al 85% de todos los casos de cáncer de pulmón [82]. A pesar de los notables avances en tratamientos específicos para el cáncer de pulmón, factores como la resistencia a los medicamentos, las recurrencias y las metástasis han planteado desafíos considerables para la reducción de la prevalencia y mortalidad asociadas a esta enfermedad [81].

En el caso del NSCLC, se ha observado una elevada expresión de SIRT3 en el tejido canceroso de pacientes en comparación con el tejido adyacente [83,84]. Además, en el NSCLC con mutaciones en PTEN (un supresor de tumores), se ha descubierto que SIRT3 deacetila a la proteína p53, lo que promueve su degradación a través de la vía de ubiquitinación y proteosoma [85]. Estos hallazgos sugieren un papel oncogénico de SIRT3 en este tipo de cáncer.

Por otra parte, entre los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer de mama se incluyen factores genéticos, relacionados con antecedentes familiares, y factores personales, como la exposición a hormonas y antecedentes reproductivos de las mujeres [86].

El cáncer de mama se clasifica según la presencia o ausencia de marcadores moleculares para los receptores de estrógeno o progesterona, así como el factor de crecimiento epidérmico 2 (ERBB2) humano, dividiéndose en tres subtipos principales: luminal A o HR+/ERBB2- (HR positivo/ERBB2 negativo), luminal B o HR+/ERBB2+ (HR positivo/ERBB2 positivo) y Triple negativo o HR-/ERBB2- (HR/ERBB2 negativo)[87].

Cuando el diagnóstico de cáncer de mama no se realiza a tiempo, la enfermedad puede volverse metastásica, lo que restringe los objetivos terapéuticos a la eliminación del tumor y la prevención de la recurrencia de esta enfermedad [81].

En cáncer de mama, se ha observado una disminución en la expresión de SIRT3, lo cual está vinculado a la estabilización del factor de transcripción HIF-1 y, por consiguiente, a la regulación positiva de sus genes diana [88], que como mencionamos en la *sección 1.3.2*, inducen la reprogramación metabólica. Estos genes objetivo, como ya se mencionó, están asociados a la inducción de la reprogramación metabólica, y se ha constatado que los pacientes con una expresión reducida de SIRT3 presentan un mayor riesgo de muerte. Investigaciones indican que la restauración de la expresión de SIRT3 favorece la reprogramación metabólica, reduciendo los niveles de utilización de glucosa relativa [88] y elevando los niveles de MnSOD [89]. Por lo tanto, se ha sugerido que SIRT3 desempeña un papel crucial como supresor de tumores en el cáncer de mama [90].

## **2.2 Técnicas proteómicas para el análisis de la estequiometría de acetilación**

### **2.2.1 Acetilación química y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas**

La acetilación de N( $\epsilon$ )-lisina es una MPT que inicialmente se identificó en histonas. Gracias a las técnicas sensibles de espectrometría de masas, se han identificado miles de sitios de acetilación en diversas proteínas celulares. Sin embargo, la identificación y cuantificación de los sitios de acetilación en proteínas de células humanas aún no está bien caracterizada. Esto se debe a la baja proporción en la que se encuentra presente en las proteínas, es decir, su baja estequiometría, siendo esta información estequiométrica esencial para interpretar con precisión la importancia biológica de la acetilación [91,92]. La estequiometría de acetilación puede entenderse como el nivel de acetilación en todas las copias de una proteína determinada en un momento dado. Esta información proporciona una perspectiva más completa del significado biológico de la acetilación como un mecanismo regulador en enfermedades como el cáncer.

El enfoque preferido para determinar los sitios específicos de acetilación consiste en llevar a cabo una inmunoprecipitación mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra la lisina acetilada, seguido por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Sin embargo, es importante destacar que este método no proporciona información directa sobre la estequiometría de la acetilación [68]. Diversos métodos químicos, enzimáticos y genéticos han sido descritos para medir la estequiometría de acetilación a nivel del proteoma y explorar su posible función. Una técnica interesante consiste en emplear etiquetado químico con isótopos estables. Esta técnica permite marcar proteínas con agentes acetilantes reactivos como el anhídrido acético y el sulfo-N-hidroxisuccinimida (NHS). Tras la marca, las proteínas se digieren y analizan mediante MS [92].

No obstante, se ha desarrollado un método químico que ofrece mayor precisión en el análisis de la estequiometría de acetilación. Este enfoque implica la reacción de acetilación utilizando N acetoxi succinimida en su forma pesada (NAS-d3), es decir, con hidrógenos sustituidos por deuterio. Con este enfoque, los residuos de lisina que no están acetilados de forma endógena se acetilan químicamente mediante este reactivo. Tras el proceso de digestión y el análisis por LC-MS, la diferencia de 3 daltons (Da) entre los péptidos acetilados endógenamente y aquellos acetilados químicamente permite examinar las distribuciones isotópicas (abundancias de los isótopos de una molécula), lo que a su vez facilita la determinación de la estequiometría de acetilación [93,94].

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existen pocos estudios proteómicos y acetilómicos enfocados en investigar el metabolismo del cáncer de mama y pulmón, que son las principales causas de muerte a nivel mundial. A pesar de que se han identificado algunos aspectos del metabolismo, aún existen incógnitas en cuanto a la regulación de la acetilación en el contexto del cáncer. Por lo tanto, este estudio busca determinar si la regulación a través de la acetilación-desacetilación desempeña un papel importante y si SIRT3 o sus proteínas blanco podrían ser objetivos interesantes para futuros tratamientos.

### 4. HIPÓTESIS

Comprender la función de la deacetilasa mitocondrial SIRT3 en las líneas celulares de cáncer de pulmón y mama proporcionará una comprensión más precisa de la acetilación de proteínas celulares y mitocondriales, así como de su contribución al desarrollo del cáncer. Este conocimiento abre nuevas oportunidades para identificar posibles blancos terapéuticos relacionados con la regulación de la actividad de las proteínas mediante SIRT3.

### 5. OBJETIVOS:

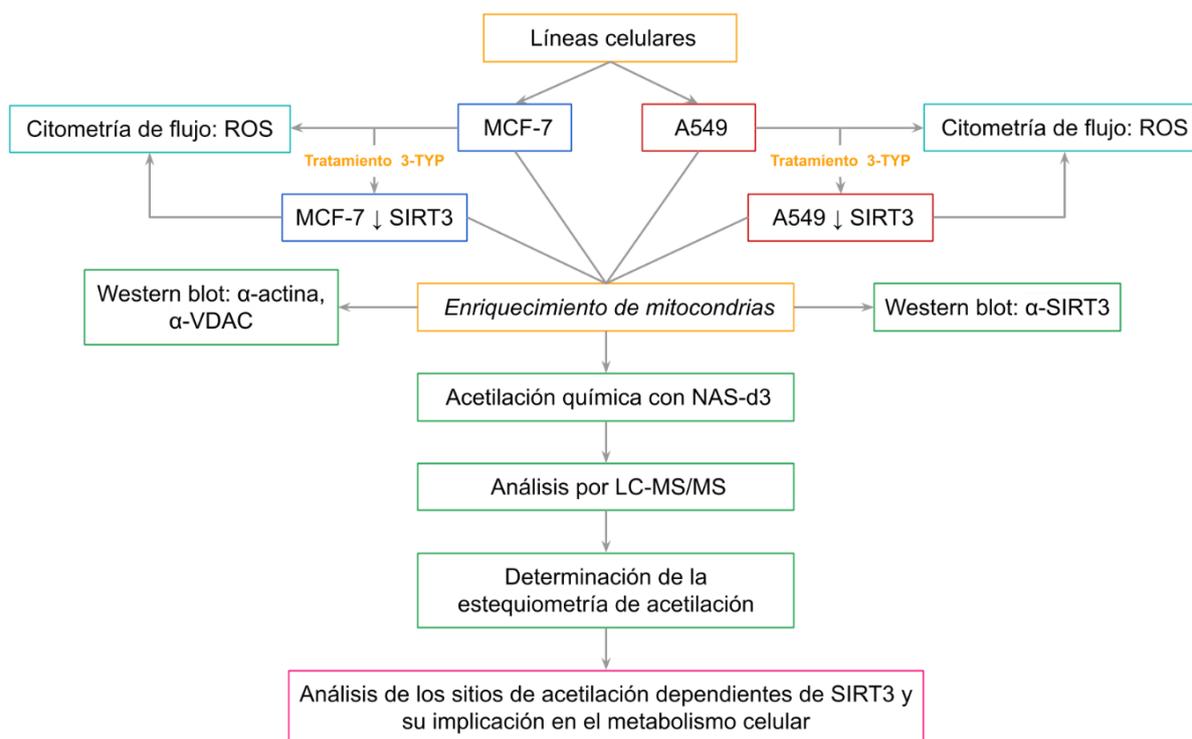
**Objetivo general:** *Analizar las consecuencias en la regulación del metabolismo mediante la inhibición de la deacetilasa mitocondrial SIRT3 en proteínas totales y mitocondriales de las líneas celulares A549 (cáncer de pulmón) y MCF7 (cáncer de mama).*

#### **Objetivos específicos:**

1. Determinar los niveles de expresión basal de la proteína SIRT3 en células de cáncer de pulmón A549 y de cáncer de mama MCF7
2. Evaluar el impacto de la inhibición de SIRT3 en la acetilación de proteínas mitocondriales de células A549 y MCF7
3. Evaluar la función mitocondrial en las células A549 y MCF7 mediante la determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo a través de ensayos de citometría de flujo.

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Diagrama de la estrategia general de trabajo



### 6.2 Material biológico

Se emplearon las líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) y cáncer de mama (MCF7). Estas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640, el cual fue suplementado con un 10% de suero fetal bovino (BSA) y antibiótico-antimicótico 1X. Las células se cultivaron a una temperatura de 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para la extracción de proteínas, se homogeneizaron seis millones de células de cada línea celular utilizando una solución con SDS (SDS al 4%, DTT 50 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,6).

### 6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) e inmunoblot

La concentración total de proteínas se evaluó mediante análisis densitométrico. Los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en un gel con un grosor del 8% y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Después de un bloqueo de 1 hora con albúmina fracción V al 10%, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-SIRT-3 (Cell Signaling Technology) en una dilución de 1:1000, y se mantuvo durante toda la noche en agitación a 4°C. Tras el lavado con TBST 1X, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) dirigido contra la cadena ligera de la inmunoglobulina G (IgG) de conejo

(Santa Cruz Biotechnology), a una dilución de 1:10,000, durante 1 hora a temperatura ambiente bajo condiciones de bloqueo. Para la detección de proteínas, se empleó el sustrato de quimioluminiscencia de máxima sensibilidad (SuperSignal™ West Femto, Thermo Scientific™). Las imágenes fueron escaneadas con un C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR) y se realizó la densitometría utilizando el programa Image Studio 5.2.

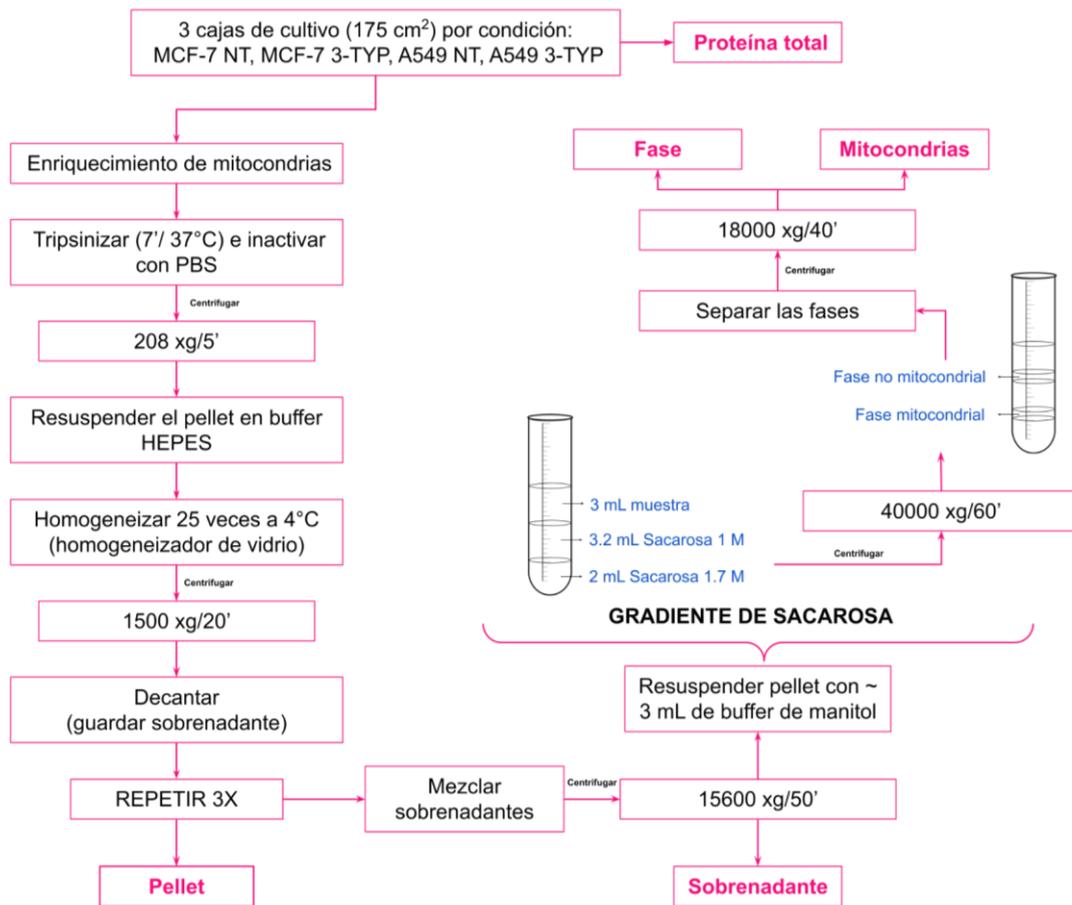
#### **6.4 Enriquecimiento de mitocondrias**

El enriquecimiento mitocondrial se llevó a cabo utilizando tres cajas de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> de células que alcanzaron una confluencia del 80% en cada condición. Para la inhibición, las células fueron tratadas con 3-TYP a una concentración de 25 nM 24 horas antes del proceso. Se realizó la separación de la monocapa celular mediante tripsinización, seguida de una centrifugación a 208 xg durante 5 minutos. El sobrenadante fue retirado y el botón celular resultante se homogeneizó con 15 mL de un buffer HEPES (20 mM de Hepes, 2 mM de EGTA, 250 mM de sacarosa y 0.5% de albúmina, pH 7.4). Luego, se realizó una centrifugación a 1,500 xg durante 20 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Este proceso se repitió tres veces, combinando los sobrenadantes obtenidos en cada paso. Posteriormente, se añadió un buffer de extracción de proteínas (4% de SDS, 50 mM de DTT, 100 mM de tris, pH 8,6) al botón celular resultante.

La mezcla de los sobrenadantes se sometió a una centrifugación a 15,600 xg durante 50 minutos a 4°C, el sobrenadante resultante fue conservado para su precipitación posterior. El botón obtenido fue resuspendido en un buffer de manitol (210 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 5 mM de EDTA, 5 mM de tris-HCl) y luego se colocó en un gradiente de sacarosa. Este gradiente se centrifugó en un rotor de columpio (SW41) a 40,000 xg durante 60 minutos a 4°C. Se recolectaron las fases nebulosas, siendo la fase mitocondrial la observada en la parte más baja en el tubo de ensayo (ver diagrama).

La fracción mitocondrial resultante se disolvió en buffer de manitol y se sometió a una centrifugación a 18,000 xg durante 40 minutos a 4°C. El botón mitocondrial obtenido fue tratado con un buffer de extracción de proteínas (4% de SDS, 50 mM de DTT, 100 mM de tris, pH 8.6), se cuantificó y luego se almacenó a -20°C para su uso posterior. Este proceso de enriquecimiento mitocondrial se repitió tres veces por separado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

## 6.5 Diagrama del procedimiento de enriquecimiento mitocondrial mediante gradiente de sacarosa



## 6.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) e inmunoblot de las fases del enriquecimiento mitocondrial

Las fases resultantes del proceso de enriquecimiento mitocondrial y proteínas totales se conservaron en buffer de extracción de proteínas (4% de SDS, 50 mM de DTT, 100 mM de Tris-HCl, pH 8.6) y su concentración se determinó mediante análisis densitométrico. Los extractos fueron sometidos a electroforesis y posteriormente transferidos a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana se bloqueó durante un período de 2 horas y luego se incubó con el anticuerpo anti-VDAC (GeneTex) en una dilución de 1:1000, con agitación constante durante toda la noche a 4°C. Después del lavado, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con HRP específico para la cadena ligera de la inmunoglobulina G (IgG) de conejo, diluido a 1:10000, durante 1 hora a temperatura ambiente bajo condiciones de bloqueo. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-actina acoplado a HRP (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución de 1:2000. Para llevar a cabo la detección de las proteínas, se empleó el sustrato de quimioluminiscencia de máxima sensibilidad SuperSignal™ West Pico PLUS, Thermo Scientific™. Las imágenes se escanearon en C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR) y se realizó la densitometría con el programa Image Studio 5.2.

### **6.7. Acetilación química con NAS-d3**

Para llevar a cabo la acetilación química, se empleó el reactivo N-acetoxi succinimida deuterado (NAS-d3), previamente sintetizado en el laboratorio [93]. El procedimiento se divide en siete pasos distintos: reducción, cuantificación, alquilación, acetilación, desesterificación, digestión y eliminación del detergente.

**Reducción y cuantificación.** Se realizó la reducción de los puentes disulfuro en los extractos de proteínas totales y mitocondriales mediante el calentamiento a 95°C durante 5 minutos, utilizando DTT 50 mM. Posteriormente, los extractos se cuantificaron mediante el reactivo de ensayo de proteínas Pierce™ a 660 nm, en combinación con el reactivo de compatibilidad de detergentes iónicos. Se utilizaron 50 µg de proteína de cada muestra para los siguientes pasos del procesamiento.

**Alquilación.** Se añadió iodoacetamida (IAA) en una concentración final de 0.1 M a cada muestra. Las muestras se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos y luego fueron precipitadas con nueve volúmenes de etanol durante la noche a -20°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 17,000 xg durante 5 minutos, se lavaron con etanol al 90%, se centrifugaron nuevamente a 17,000 xg durante 5 minutos y se evaporó el etanol a temperatura ambiente.

**Acetilación.** Las muestras se resuspendieron en un buffer de reacción de acetilación química (0.5% de SDS, 0.5% de DOC, 100 mM de TEAB) y se sometieron a sonicación en baño durante 5 minutos. A cada muestra se añadió la solución NAS-d3 y se incubó durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Este último paso se repitió una segunda vez.

**Desesterificación.** Tras el tiempo de incubación, se añadió hidroxilamina (para la eliminación de la O-acetilación) al 50% para lograr una concentración final del 5% en cada muestra. Después de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, las muestras se precipitaron con nueve volúmenes de etanol durante la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugaron a 17,000 xg durante 5 minutos, se lavaron con etanol al 90%, se centrifugaron nuevamente a 17,000 xg durante 5 minutos y se evaporó el etanol.

**Digestión.** Las muestras se resuspendieron en un buffer de digestión (50 mM de AmBic, 0.5% de DOC), se sometieron a sonicación en baño durante aproximadamente 5 minutos y se añadió tripsina en una relación enzima/sustrato de 1:50. Se incubaron durante 16 horas a 37°C.

**Eliminación del detergente.** Se añadió acetato de etilo en una relación 1:1 y TFA hasta alcanzar una concentración final del 0.5%. Las muestras se agitaron en un agitador tipo vórtex durante 3 minutos, se centrifugaron a 17,000 xg durante 10 minutos y se descartó la fase orgánica. Este proceso se repitió dos veces más sin el

uso de TFA. Las muestras se secaron completamente en un speed vac (Savant™ SpeedVac™) durante 2 horas.

### **6.8 Análisis LC-MS/MS y análisis de la estequiometría de acetilación**

El análisis LC-MS/MS se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Lund en Suecia en colaboración con el Dr. Jeovanis Gil Valdés. Los péptidos se resuspendieron en condiciones cromatográficas iniciales y se separaron en un sistema nano UPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC, conectado en línea con un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF-X de Thermo Fisher Scientific. Para la identificación y cuantificación relativa de péptidos y proteínas a partir de los datos generados por las mediciones de LC-MS/MS, se empleó el software MaxQuant versión v2.4.13.0

Los datos obtenidos a través del análisis por LC-MS/MS se utilizaron para determinar la estequiometría de la acetilación en los péptidos identificados que contenían residuos de lisina en su secuencia. Para llevar a cabo este análisis, se utilizó el programa Pview, el cual calcula la estequiometría de la acetilación basándose en el área de la distribución isotópica en el espectro MS de los péptidos identificados.

### **6.9 Análisis estadístico y construcción de gráficos en R**

Para llevar a cabo el análisis de componentes principales (PCA), inicialmente se detectó una variabilidad atribuible al "efecto de lote" o "efecto batch" en nuestros datos. Para mitigar esta variabilidad, se implementó un procedimiento de normalización que permitió el agrupamiento adecuado. Posteriormente, empleamos la prueba estadística T (Benjamini-Hochberg) para la creación de los diagramas de dispersión de tipo "Volcano Plot". Además, clasificamos aquellas proteínas que presentaron una acetilación igual o mayor al 0.4% como proteínas sobreacetiladas en nuestras muestras [95]. Las listas de proteínas significativas en cada comparación y las listas de proteínas sobreacetiladas se sometieron a un proceso de análisis de enriquecimiento de vías utilizando GeneCodis [96], lo cual permitió la generación de diagramas que representan la asociación con vías biológicas relevantes. Los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 8 y RStudio (versión 4.3.1).

### **6.10 Determinación de especies reactivas de oxígeno**

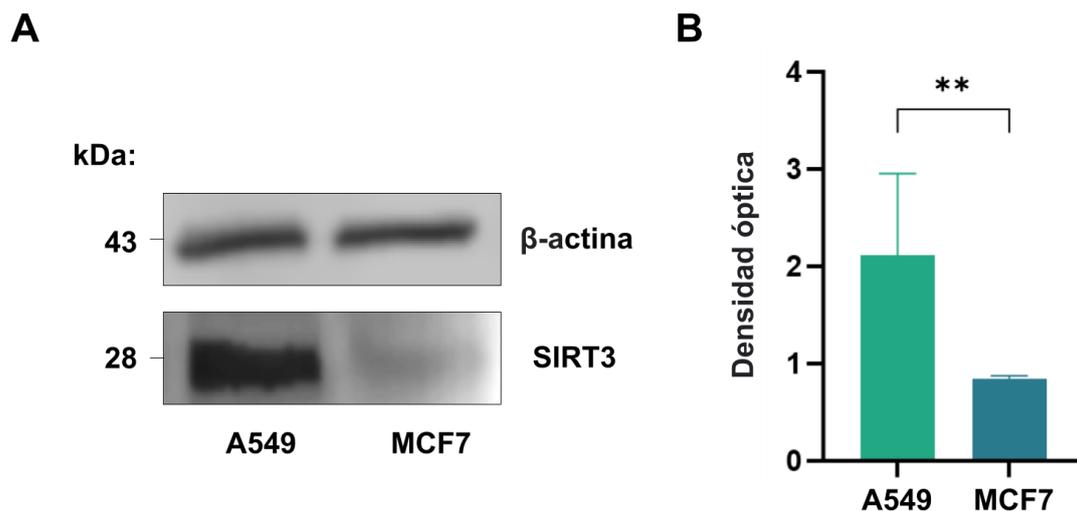
La determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno se realizó en placas de cultivo de 12 pozos que contenían células MCF7 y A549. Tanto las células tratadas con 3-TYP como las no tratadas, se utilizaron cuando alcanzaron una confluencia del 90%. Estas células se expusieron a una solución del reactivo MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator con una concentración de 1.5  $\mu\text{M}$  y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, en condiciones de oscuridad. Después del período de incubación, se separaron las monocapas celulares y se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos. El botón celular resultante se sometió a tres lavados con un amortiguador HBSS precalentado a 37°C. Luego, las

células se contaron y se ajustaron a una cantidad de 500,000 células por muestra. Como control positivo de daño mitocondrial, se trataron pozos de células con Antimicina A a una concentración de 100  $\mu$ M durante 30 minutos. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences) con el software BD FACSDiva (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el Software FlowJo™ (version 10.10). Los gráficos se hicieron con GraphPad Prism 8 y RStudio (versión 4.3.1).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 La expresión de la deacetilasa mitocondrial SIRT3 muestra variación entre las líneas celulares A549 y MCF7

Uno de los objetivos de este trabajo de investigación fue evaluar los niveles de expresión de la proteína SIRT3 en las líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón y mama, A549 y MCF7, respectivamente, a través de la técnica de inmunoblot. Investigaciones previas reportan que la expresión de SIRT3 se encuentra disminuida en cáncer de mama [89] y elevada en cáncer de pulmón [83]. Nuestros resultados coinciden con esta información, ya que la línea celular A549 mostró un incremento significativo en los niveles de expresión de SIRT3 en comparación con la línea celular MCF7, como se ilustra en la Figura 6. Esto podría estar relacionado con el papel que presenta SIRT3 como oncogén o supresor de tumores en estos dos tipos de cáncer.

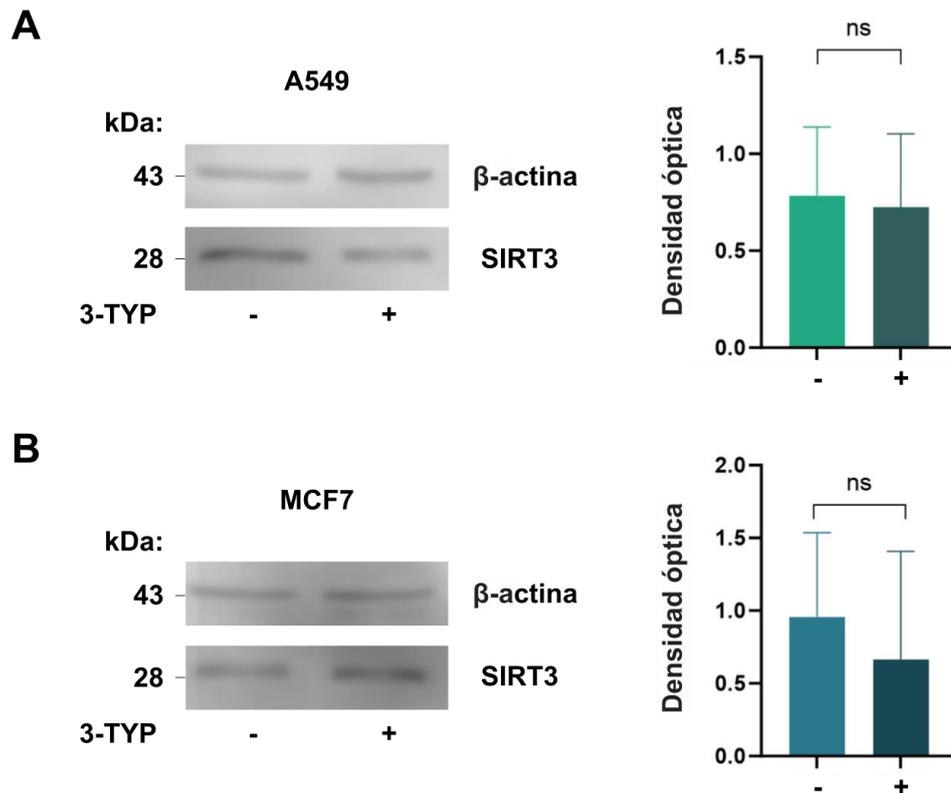


**Figura 6.** SIRT3 presenta una expresión diferencial en las líneas celulares MCF7 y A549, mostrando una mayor expresión en células A549 y una menor expresión en células MCF7. (A) Imagen representativa de inmunoblots para la expresión de SIRT3 en la línea celular A549 y en la línea celular MCF7 (B) Densitometría óptica del triplicado de inmunoblots para la expresión de SIRT3 en células A549 y MCF7. Se utilizó la prueba estadística T no pareada. Los asteriscos indican significancia para  $P < 0.05$ .

### 7.2 La inhibición mediada por el inhibidor selectivo 3-TYP, no tiene un impacto directo en la expresión de SIRT3 en las líneas celulares A549 y MCF7

Tras confirmar los niveles de expresión de SIRT3 en las líneas celulares A549 y MCF7, procedimos a evaluar los efectos resultantes de la inhibición de SIRT3. A pesar de que la nicotinamida es un inhibidor endógeno de las sirtuinas, su principal limitación reside en su falta de selectividad hacia estas enzimas. Sin embargo, los análogos de nicotinamida se han utilizado ampliamente para la inhibición de SIRT3 [97]. Un ejemplo interesante es el inhibidor 3-TYP (3-(1H-1,2,3-triazol-4-il) piridina), que, a diferencia de otros inhibidores de SIRT3, demuestra ser selectivo cuando se emplea en concentraciones dentro de un intervalo específico. 3-TYP tiene una IC<sub>50</sub> para SIRT3 de 16 nM, en contraste con los 88 nM para SIRT1 y los 92 nM para SIRT2 [97].

Con base en lo anterior empleamos este inhibidor a una concentración de 25 nM para la inhibición de SIRT3 en nuestras líneas celulares, A549 y MCF7. No obstante, como se puede apreciar en la Figura 7, no se observaron diferencias significativas en la expresión de SIRT3 en ambas líneas celulares. Este resultado es consistente con el mecanismo de acción conocido de este inhibidor, ya que no ejerce una influencia directa sobre la expresión de esta proteína.

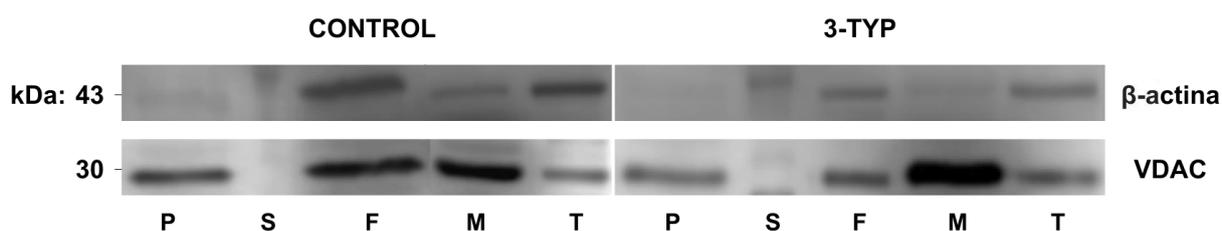


**Figura 7. El inhibidor 3-TYP no ejerce un efecto directo en la expresión de SIRT3 en las líneas celulares A549 y MCF7. (A) Inmunoblot y densitometría de las células A549: control y células tratadas con el inhibidor 3-TYP (B) Inmunoblot y densitometría de las células MCF7: control y células tratadas con el inhibidor 3-TYP. Se utilizó la prueba estadística T pareada.**

### **7.3 El método de enriquecimiento de mitocondrias mediante centrifugación secuencial y gradiente de sacarosa demostró ser apropiado para los objetivos de nuestra investigación.**

Con el propósito de determinar la estequiometría de acetilación tanto en las proteínas totales como en las proteínas mitocondriales de las líneas celulares A549 y MCF7, validamos nuestro método de enriquecimiento mitocondrial. Para esto implementamos dos condiciones experimentales en la línea celular MCF7: una de control y otra de inhibición utilizando el inhibidor 3-TYP, a una concentración de 25 nM, administrado 24 horas antes del proceso de enriquecimiento. Seguimos el protocolo estandarizado de enriquecimiento mitocondrial desarrollado en el laboratorio por la Dra. Diana Lashidua Fernández Coto, (sección 5.4) y, a través de este protocolo, obtuvimos distintas fases, incluida la fase mitocondrial.

Para confirmar la identidad de la fase mitocondrial, realizamos inmunoblots de la línea celular MCF7 con y sin tratamiento, tanto de esta fase como de las otras fases obtenidas, incluyendo la proteína total. Utilizamos un anticuerpo específico para una proteína mitocondrial, VDAC, y otro para una proteína citoplasmática,  $\beta$ -actina. Esto nos permitió visualizar y comparar la expresión de proteínas mitocondriales y citoplasmáticas presentes en cada fase. Como se puede apreciar en la Figura 8, se observa la expresión de VDAC (30 kDa) y  $\beta$ -actina (43 kDa), destacando una mayor presencia de VDAC en la fase mitocondrial, lo cual es más evidente en las células tratadas respecto a las control. Sin embargo, en estas últimas, también observamos que VDAC se destaca en la fase no mitocondrial, lo cual podría atribuirse a posibles inconsistencias en la última centrifugación de la muestra, resultando en la pérdida de mitocondrias que quedaron en esta fase. A pesar de esta pérdida, nuestros resultados respaldan la eficacia del enriquecimiento de mitocondrias.



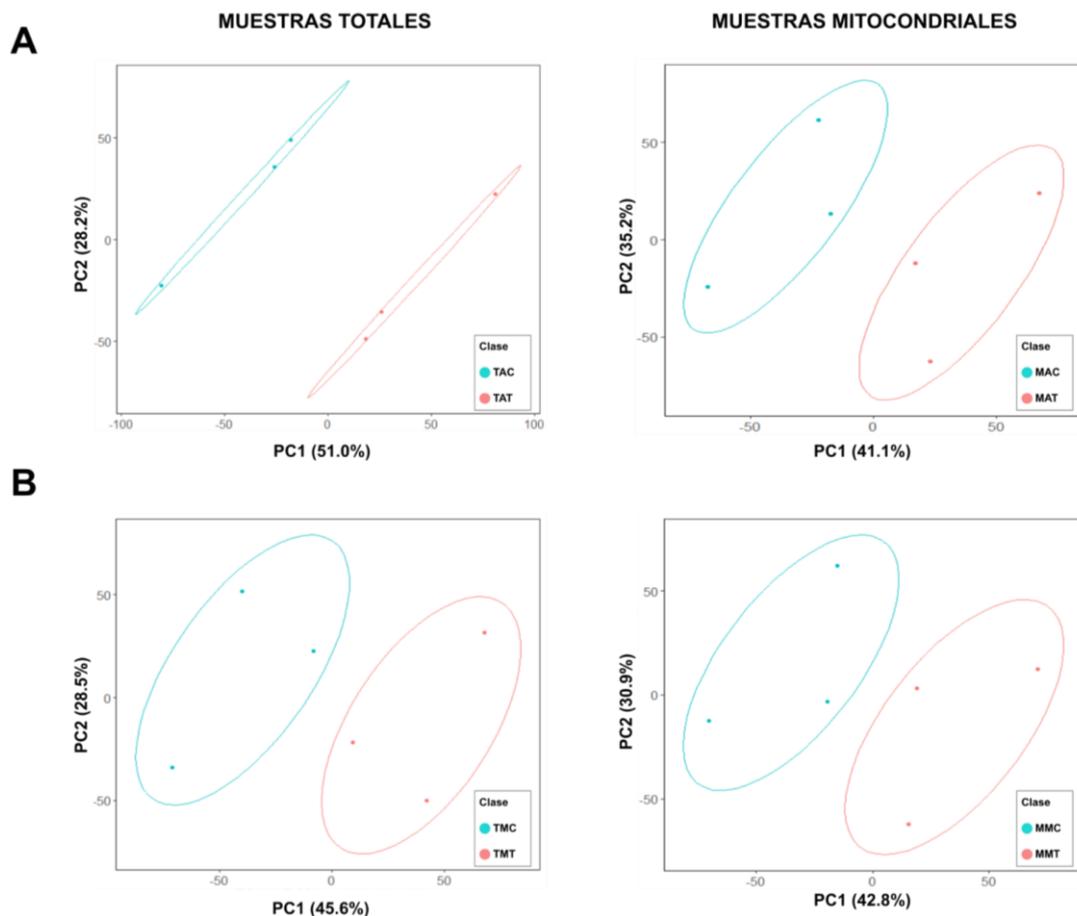
**Figura 8. Evidencia de enriquecimiento mitocondrial en células MCF7.** Inmunoblot de las distintas fases obtenidas durante el enriquecimiento mitocondrial: pellet (P), sobrenadante (S), fase no mitocondrial (F), mitocondrias (M) y proteína total (T).

Una vez confirmado lo mencionado anteriormente, procedimos a realizar triplicados biológicos tanto para el enriquecimiento mitocondrial como para la extracción de proteínas totales de nuestras líneas celulares de estudio, A549 y MCF7, en sus condiciones de control y tratadas con 3-TYP.

#### **7.4 Ajuste de efecto de lote y análisis de componentes principales en el procesamiento de muestras proteómicas.**

Llevamos a cabo el procesamiento de nuestras muestras siguiendo el protocolo detallado en la sección 5.6, con el propósito de prepararlas para su posterior análisis mediante LC-MS/MS. A través de LC-MS/MS, logramos identificar un total de 6,457 proteínas en nuestras muestras, teniendo en cuenta un 70% de valores válidos. Realizamos el análisis estadístico de componentes principales (PCA) y observamos que nuestros datos no exhibían una agrupación adecuada en relación con el tratamiento de 3-TYP. Ante esta observación, decidimos evaluar si nuestros datos presentaban “efecto de lote”, también conocido como “efecto Batch”. Este efecto provoca que las diferencias no biológicas entre muestras de lotes distintos no sean directamente comparables.

Para abordar este problema, empleamos la paquetería de R ComBat, la cual nos permitió ajustar los efectos de lote mediante el método de Bayes empírico (EB) [98]. Después de realizar estos ajustes, llevamos a cabo nuevamente el PCA y observamos una mejor agrupación de nuestras muestras de acuerdo a los tratamientos, como se puede apreciar en la Figura 9.



**Figura 9. Análisis de componentes principales después de la normalización utilizando el método de Bayes.** (A) PCA de muestras totales y mitocondriales de células A549: control (TAC y MAC) y tratadas con el inhibidor 3-TYP (TAT y MAT). (B) PCA de muestras totales y mitocondriales de células MCF7: control (TMC y MMC) y tratadas con el inhibidor 3-TYP (TMT y MMT). Datos después de la normalización Batch utilizando el método de Bayes empírico (EB).

Después de la corrección de los datos, aplicamos la prueba estadística T para generar gráficos de dispersión tipo "Volcano plot" con el objetivo de identificar las proteínas significativas en las muestras control y tratadas con 3-TYP. En adición, contrastamos también las muestras control de nuestras líneas celulares, A549 y MCF7, tanto en proteínas totales como en proteínas mitocondriales. Una vez completado lo anterior, investigamos el enriquecimiento de las vías biológicas asociadas a nuestras proteínas significativas mediante la utilización de la plataforma GeneCodis [96].

*7.5 SIRT3 se encuentra sobreexpresada en células A549 y subexpresada en células MCF7, lo que sugiere un posible papel activo en la regulación de su metabolismo.*

Para tener una mayor comprensión de cómo SIRT3 podría ser un punto de regulación clave en el cáncer de pulmón y cáncer de mama, decidimos investigar el metabolismo intrínseco de las líneas celulares A549 y MCF7, analizando tanto las proteínas totales como las proteínas mitocondriales.

Como se ha señalado en la sección de antecedentes, el metabolismo tiende a ser heterogéneo y, en la mayoría de los casos, se observa que diferentes tipos de células cancerosas muestran preferencias por un tipo específico de metabolismo, ya sea glucolítico u oxidativo, según sus requerimientos. Nuestros resultados en la línea celular A549, específicamente en TAC, mostraron un enriquecimiento en vías relacionadas con ambos metabolismos (Figura 10B).

Dentro de nuestras vías enriquecidas, identificamos la vía de detección de ROS por NFE2L2, tanto en muestras TAC como en muestras MAC (Figura 10B y Figura 11B). Esta vía desempeña un papel crucial en la protección antioxidante contra ROS [99]; sin embargo, también tiene la capacidad de regular la expresión de genes metabólicos, contribuyendo así a la reprogramación metabólica.

En las muestras TAC, también destacaron diversas vías asociadas al metabolismo oxidativo, como la vía del TCA y OXPHOS, así como la biogénesis del complejo I y el ensamblaje del complejo III de la CTE. Adicionalmente en TAC y MAC, también observamos enriquecidas la vía de biogénesis mitocondrial y vías relacionadas con la biosíntesis y metabolismo de la molécula NAD (Figura 10B y Figura 11B).

NAD es una coenzima crucial en el metabolismo energético, como se describe en la *sección 1.2.1*. Sin embargo, su función trasciende, ya que el NADH, a través de su fosforilación, actúa como fuente de NADPH, el cual se utiliza en procesos anabólicos y en el mantenimiento de sistemas antioxidantes celulares [100]. Además, como se describe en la *sección 1.4.2*, el NAD<sup>+</sup> es indispensable para la función de las sirtuinas deacetilasas. En nuestros resultados, observamos sobreexpresión de SIRT1 y SIRT3 en muestras TAC, y como esperábamos la sobreexpresión de SIRT3 en muestras MAC en comparación con la línea celular MCF7; TMC y MMC (Figura 10A y Figura 11A).

Se ha visto que diversos tipos de cáncer parecen depender considerablemente de la vía metabólica de NAD<sup>+</sup> [101], y se ha especulado que las células en tejidos cancerosos experimentan una mayor renovación de esta molécula en comparación con el tejido sano. Esta especulación se relaciona con la elevada tasa de proliferación de las células cancerosas y el aumento del daño en el ADN, lo cual activa la reparación mediada por PARP que consume NAD<sup>+</sup>, así como la sobreexpresión de miembros de la familia de PARP y SIRT1 [102].

Se sabe que SIRT1 tiene una actividad que favorece el desarrollo y la progresión del cáncer. Esta proteína es capaz de suprimir la apoptosis mediante la deacetilación del supresor p53 [103]. Además, SIRT1 puede activar la proteína c-Myc, la cual

desempeña un papel crucial en el ciclo celular, la apoptosis y la transformación celular [104]. Como se menciona en la sección 1.3.2, c-Myc también impulsa la expresión de genes relacionados con el metabolismo glucolítico. Por otro lado, SIRT3 regula principalmente la expresión de proteínas mitocondriales asociadas a la generación de energía [90], aunque su papel en el cáncer de pulmón aún no está completamente claro, nuestros resultados podrían sugerir su asociación con el desarrollo y progresión de este tipo de cáncer.

A pesar de que varias de las vías enriquecidas identificadas en nuestros resultados están relacionadas con el metabolismo oxidativo, sugiriendo una mayor demanda de mitocondrias para el mantenimiento de la energía en las células cancerosas, también observamos un enriquecimiento en la glucólisis y la señalización del glucagón. Sin embargo, una vía que destaca es la hidroxilación de prolina del HIF-1 $\alpha$ . Como se explica en la *sección 1.3.2*, esta vía cumple la función de degradar la subunidad HIF-1 $\alpha$  y prevenir su unión con HIF-1 $\beta$ . En consecuencia, se evita la transcripción de los genes diana de HIF-1, entre los cuales se encuentran genes relacionados con el metabolismo glucolítico. Por lo anterior, nuestros resultados podrían sugerir una inclinación hacia el metabolismo oxidativo en la línea celular A549.

En células de cáncer de mama existe mayor evidencia de reprogramación metabólica. Investigaciones previas han demostrado que la mayoría de las células de cáncer de mama experimentan reprogramación metabólica [105,106]. Como mencionamos en la *sección 1.3.2*, implica un incremento en la tasa de glucólisis, así como la alteración en la función mitocondrial [107]. Nuestros resultados revelaron vías biológicas enriquecidas en las muestras de proteínas totales y mitocondriales, TMC y MMC, relacionadas con este cambio en el metabolismo. Entre estas vías, destaca la vía de señalización de HIF-1 en muestras TMC, evidenciando expresión significativa de proteínas asociadas, como HK1, ALDOA, RELA, entre otras (Figura 10A).

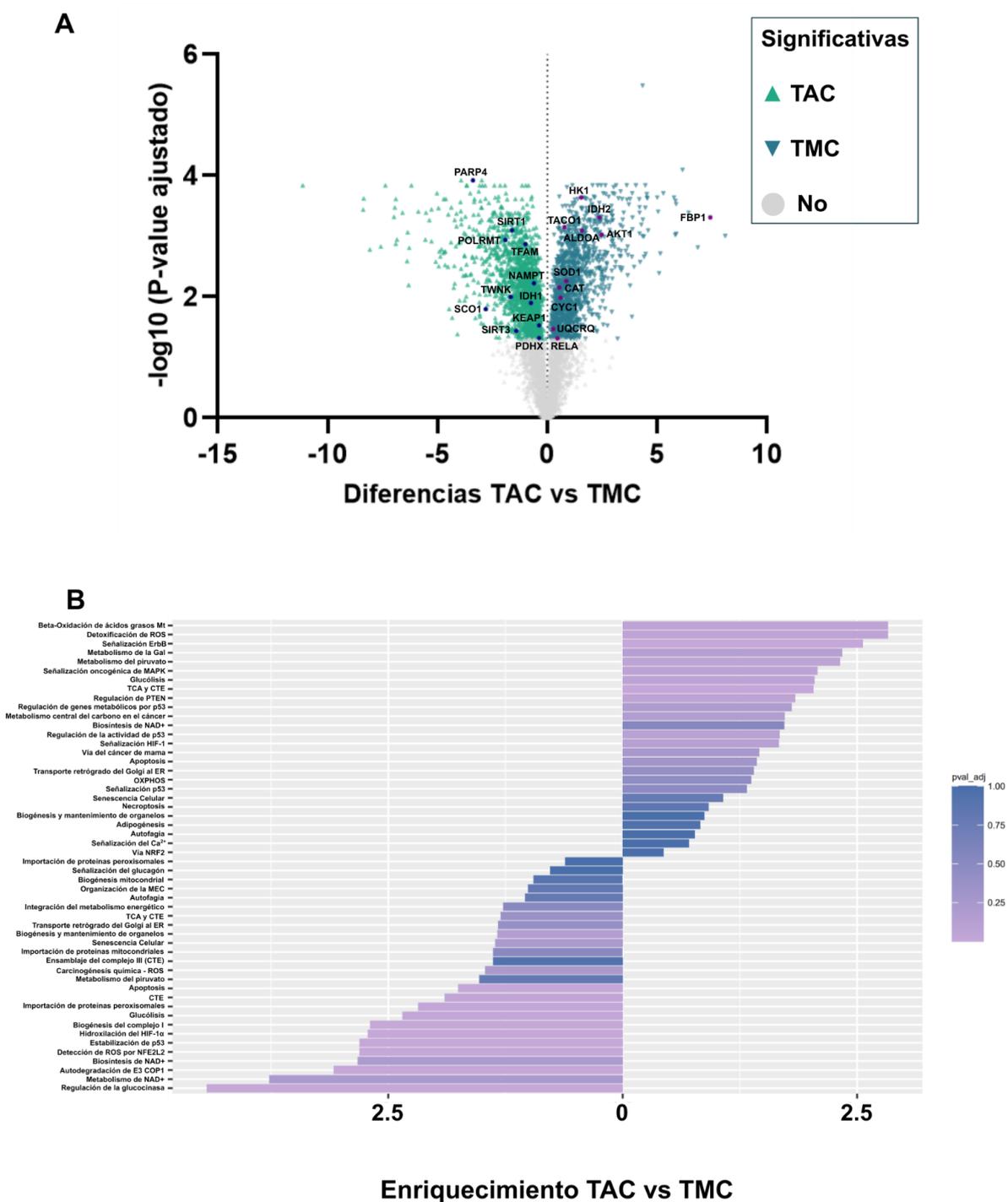
Otras vías de interés en estas muestras, incluyeron aquellas asociadas al TCA y la OXPHOS (Figura 10B y 11B). En TMC se observó un mayor enriquecimiento en la vía del TCA, y la cadena de transporte de electrones (CTE) en comparación con las muestras de proteínas totales de A549 (TAC) (Figura 10B). Por otro lado, es notable que una de las vías enriquecidas en muestras MMC sea la del TCA y la deficiencia del complejo de PDH (Figura 11B). Este complejo cataliza la conversión de piruvato en acetil-CoA y CO<sub>2</sub>, donde el acetil-CoA se utiliza en el TCA y la OXPHOS para la generación de energía. Estos resultados sugieren la posibilidad de una atrofia en la generación de ATP, ya que podría no estar produciéndose suficiente acetil-CoA para entrar en el TCA, y en consecuencia se transportarían menos electrones a la CTE. Es importante destacar que, a pesar de la preferencia por el metabolismo glucolítico en este y otros tipos de cáncer, esta opción no abarca la totalidad del metabolismo celular. Las células continúan generando energía mediante la OXPHOS, aunque en menor proporción, como parte de su estrategia para garantizar la supervivencia. Esto se logra utilizando otros productos metabólicos que ingresan a la mitocondria, como

la glutamina y los ácidos grasos. Por lo tanto, es factible la deficiencia del complejo PDH, y que no hayamos detectado un enriquecimiento tan marcado de la glucólisis en las muestras de la línea MCF7 en comparación con la línea A549 (Figura 10B).

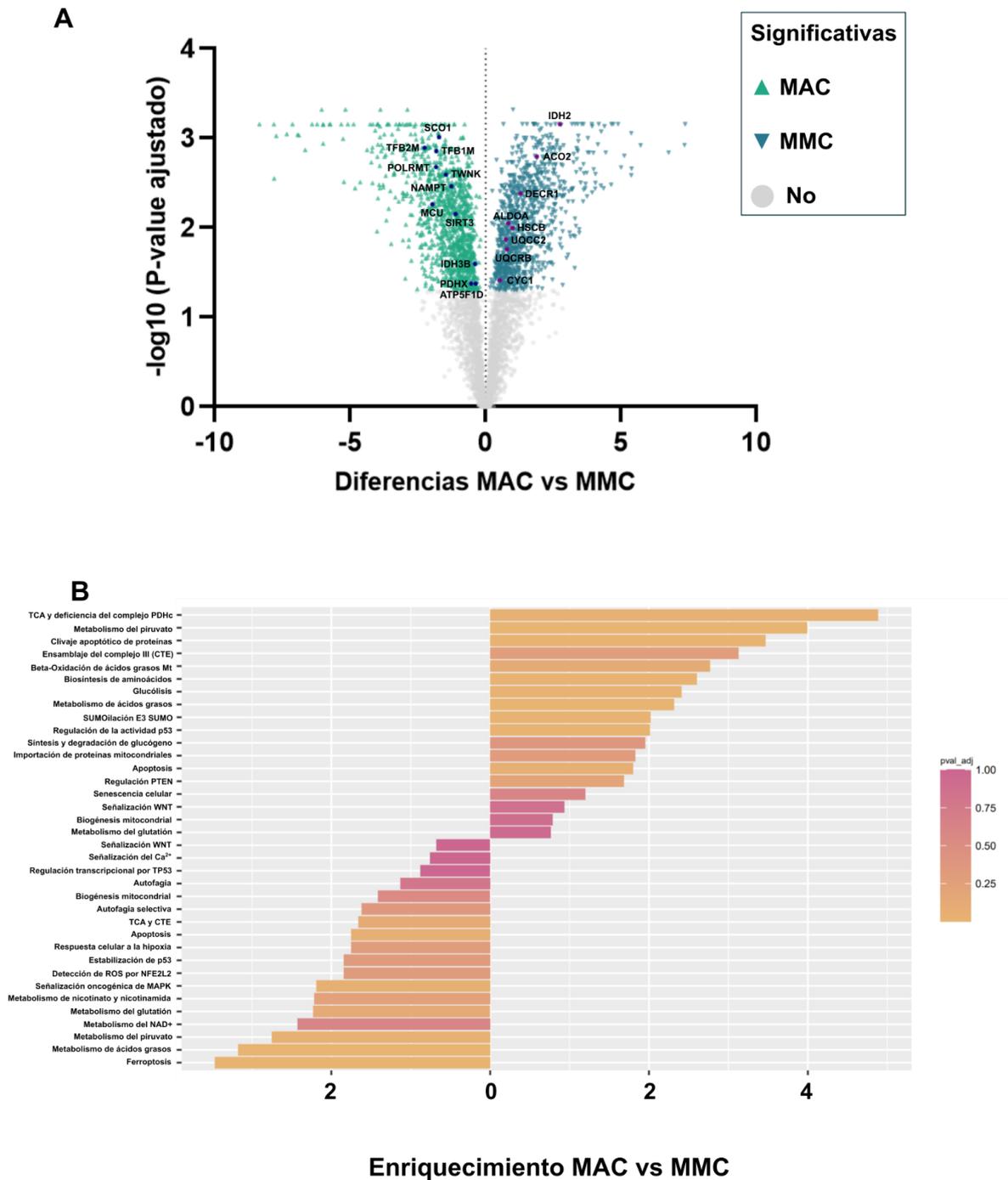
Detectamos, además, un enriquecimiento en la vía de ensamblaje del complejo III de la cadena de transporte de electrones (CTE) en las muestras MMC (Figura 11B), que es conocido por ser el complejo con mayor generación de ROS [108]. En el contexto del cáncer de mama, se ha demostrado que las ROS desempeñan un papel importante en la estabilización de HIF-1 $\alpha$ . Se ha informado que la hipoxia facilita la acumulación de electrones en los complejos de la CTE, especialmente en el complejo III, lo que permite que estos reduzcan las moléculas de oxígeno existentes a superóxido. Este fenómeno se ha observado como un factor que aumenta los niveles de HIF-1 $\alpha$  [109,110]. Relacionado con esto, en las muestras TMC observamos un enriquecimiento en la vía de detoxificación de ROS (Figura 10B) con sobreexpresión de proteínas relacionadas, como SOD1 (Figura 10A), posiblemente como un mecanismo de defensa ante la alta generación de estas especies. Sin embargo, se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína no previene la estabilización hipóxica de HIF- $\alpha$  [111].

De manera similar como veíamos en muestras de la línea celular A549, en muestras TMC identificamos también enriquecimiento de la vía de NFE2L2/NRF2 (Figura 10B). Como mencionamos anteriormente, esta vía no solo puede proteger a las células contra los ROS, sino que también está asociada con la regulación de la expresión de genes metabólicos que contribuyen a la reprogramación metabólica.

De manera general, nuestros resultados concuerdan con investigaciones previas donde se ha establecido la reprogramación metabólica como un marcador clave en el cáncer de mama.



**Figura 10.** Las vías biológicas enriquecidas en células A549 sugieren una preferencia por el metabolismo oxidativo, mientras que en células MCF7 parece predominar el metabolismo glucolítico para la generación de energía. (A) Volcano plot TAC vs TMC. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama. (B) Enriquecimiento de vías biológicas relevantes TAC vs TMC, se utilizó en programa GeneCodis con las anotaciones KEGG Pathways, Reactome Pathways y WikiPathways.



**Figura 11. SIRT3 se encuentra sobreexpresada en mitocondrias de células A549 y subexpresada en mitocondrias de células MCF7, lo que sugiere su participación activa en la regulación del TCA y la OXPHOS. (A)** Volcano plot MAC vs MMC. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama. **(B)** Enriquecimiento de vías biológicas relevantes MAC vs MMC, se utilizó en programa GeneCodis con las anotaciones KEGG Pathways, Reactome Pathways y WikiPathways.

## ***7.6 La inhibición de SIRT3 en células A549 parece favorecer procesos importantes que regulan el progreso de la enfermedad.***

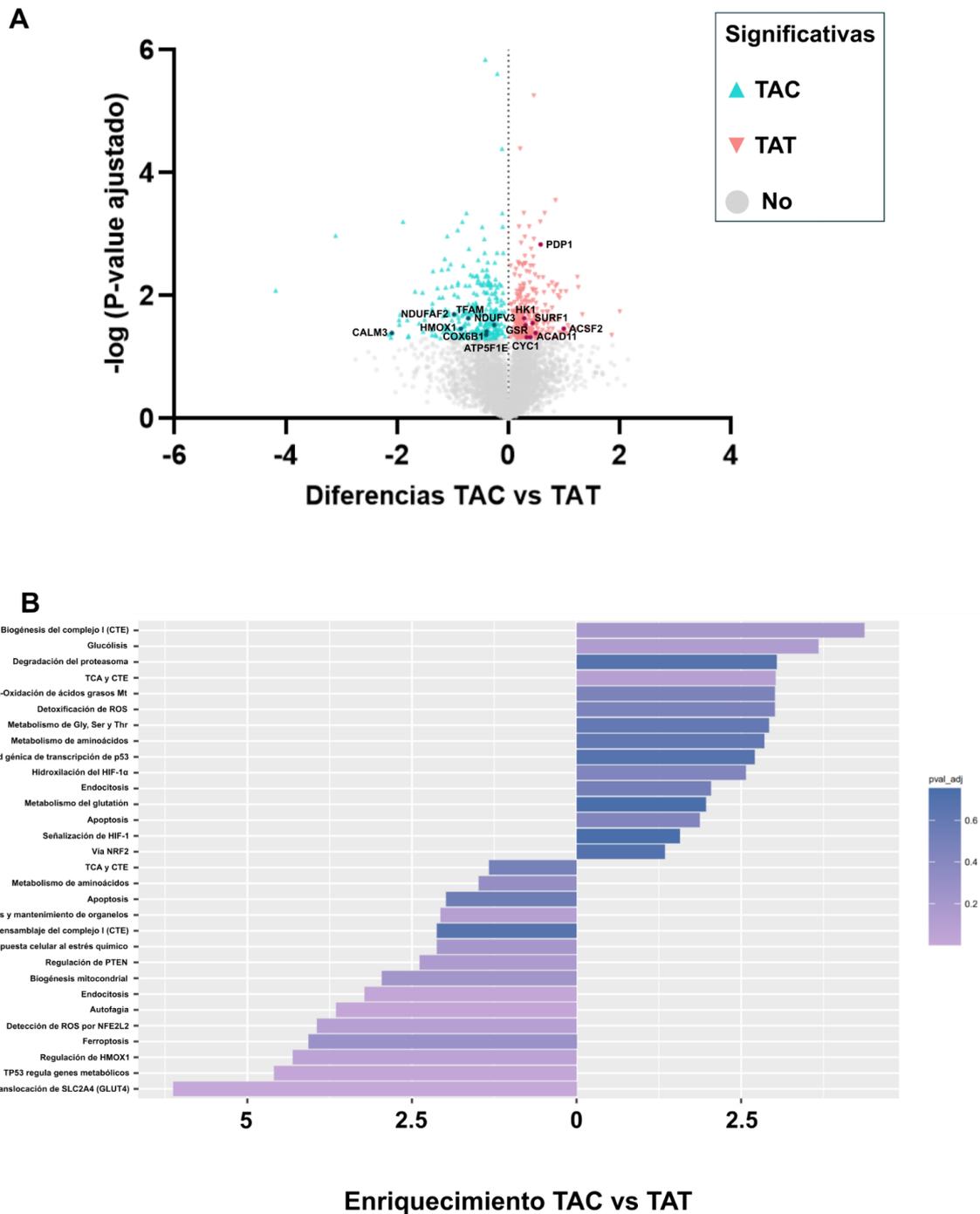
Nuestros resultados previos indicaron una sobreexpresión de la deacetilasa mitocondrial SIRT3, tanto a nivel de expresión mediante inmunoblot (Figura 6) como a nivel proteómico (Figura 10A y Figura 11B). Previamente, mencionamos que SIRT3 puede desempeñar una función tanto como oncogén o como supresor de tumores en diferentes tipos de cáncer. En el contexto específico del NSCLC, el papel de SIRT3 aún es controvertido; no obstante, se ha observado una notable sobreexpresión de esta proteína en tejido con cáncer en comparación con el tejido pulmonar adyacente [84], así como en líneas celulares de NSCLC como la línea A549 [83].

Las muestras TAC presentaron un enriquecimiento en vías similares a las observadas en nuestros resultados anteriores al comparar la línea A549 con la línea MCF7 (Figura 10). Estas incluyen la vía de detección de ROS por NFE2L2, vías asociadas al metabolismo oxidativo, como la vía del TCA y la CTE, junto con la vía de ensamblaje del complejo I de la CTE y la activación transcripcional de la biogénesis mitocondrial. Además, también destacan la vía de autofagia, la vía de endocitosis y la vía de regulación de p53, eventos ventajosos para las células cancerosas (Figura 10B y Figura 12B).

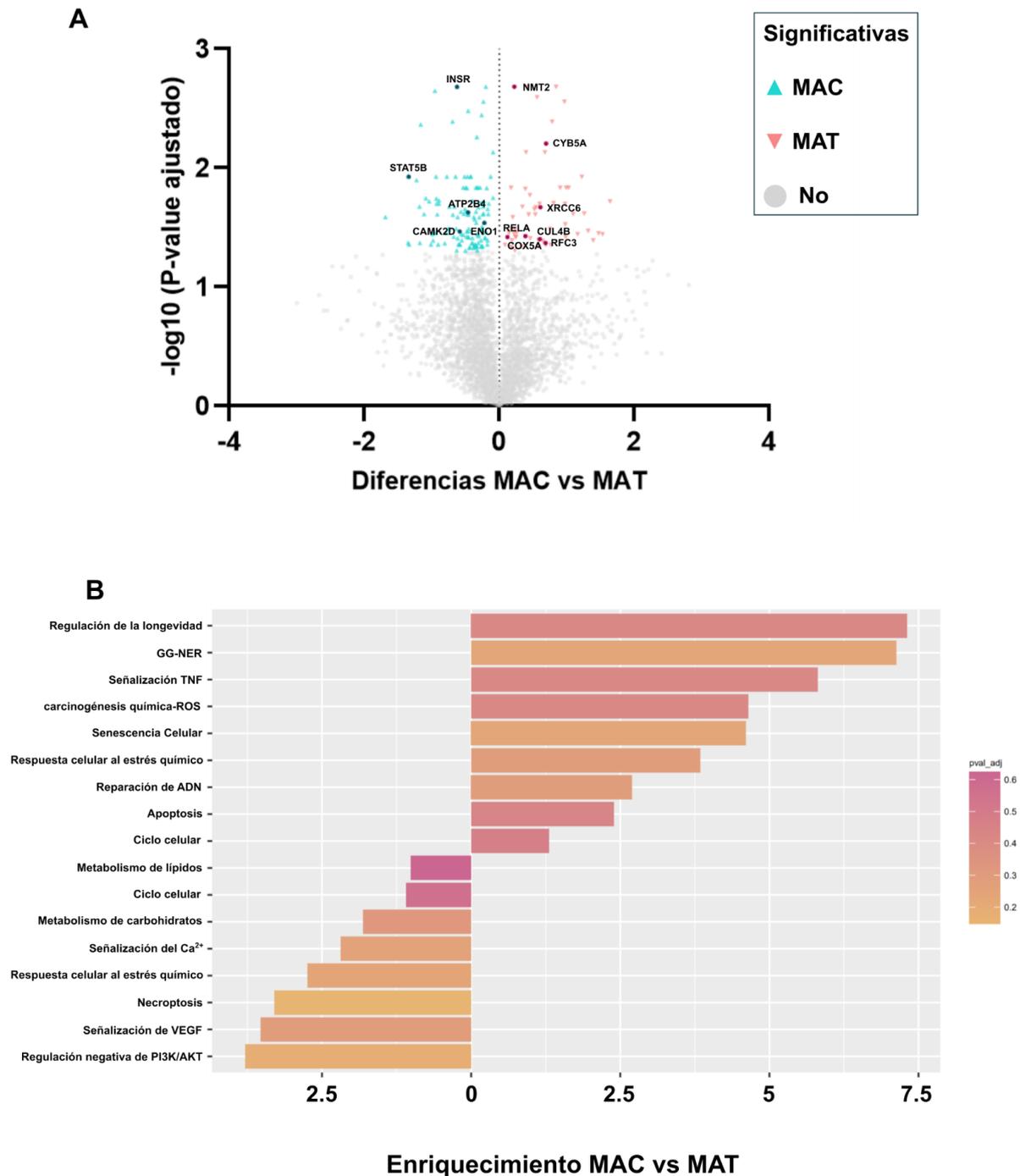
Las muestras MAC, por su parte, enriquecieron vías como la vía de señalización del calcio, que, de acuerdo a la homeostasis de este ion, media procesos que pueden contribuir al desarrollo y progresión del cáncer. También destacó la vía de señalización de VEGF, implicada en la angiogénesis y metástasis en el cáncer [112], la vía de necroptosis, que ha demostrado promover la metástasis y la muerte de células T [113], entre otras vías (Figura 13B).

Al analizar las muestras tratadas con el inhibidor selectivo de SIRT3, es decir, las muestras TAT, observamos un mayor enriquecimiento de la vía del TCA y la CTE en comparación con las muestras TAC, así como un aumento en el metabolismo de la glucosa (Figura 12B). Además, en las muestras TAT se detectó un enriquecimiento en la vía de detoxificación de ROS y una disminución en la vía de endocitosis (Figura 12B), la cual se ha encontrado desregulada en células cancerosas [114], y en muestras MAT se observó un aumento en la vía de reparación del ADN, específicamente a través de la reparación por escisión de nucleótidos (GG-NER).

Estos resultados podrían darnos indicios de cómo es que SIRT3 regula en cierta forma el metabolismo celular. La inhibición de SIRT3 podría estar promoviendo procesos críticos que podrían frenar la progresión de la enfermedad, como la detoxificación de ROS, la endocitosis y la reparación del ADN, lo que nos brinda una mayor comprensión de su papel como oncogén.



**Figura 12.** El tratamiento con 3-TYP enriquece la vía de detoxificación de ROS y reduce el enriquecimiento de la endocitosis. (A) Volcano plot TAC vs TAT. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama. (B) Enriquecimiento de vías biológicas relevantes TAC vs TAT, se utilizó en programa GeneCodis con las anotaciones KEGG Pathways, Reactome Pathways y WikiPathways.



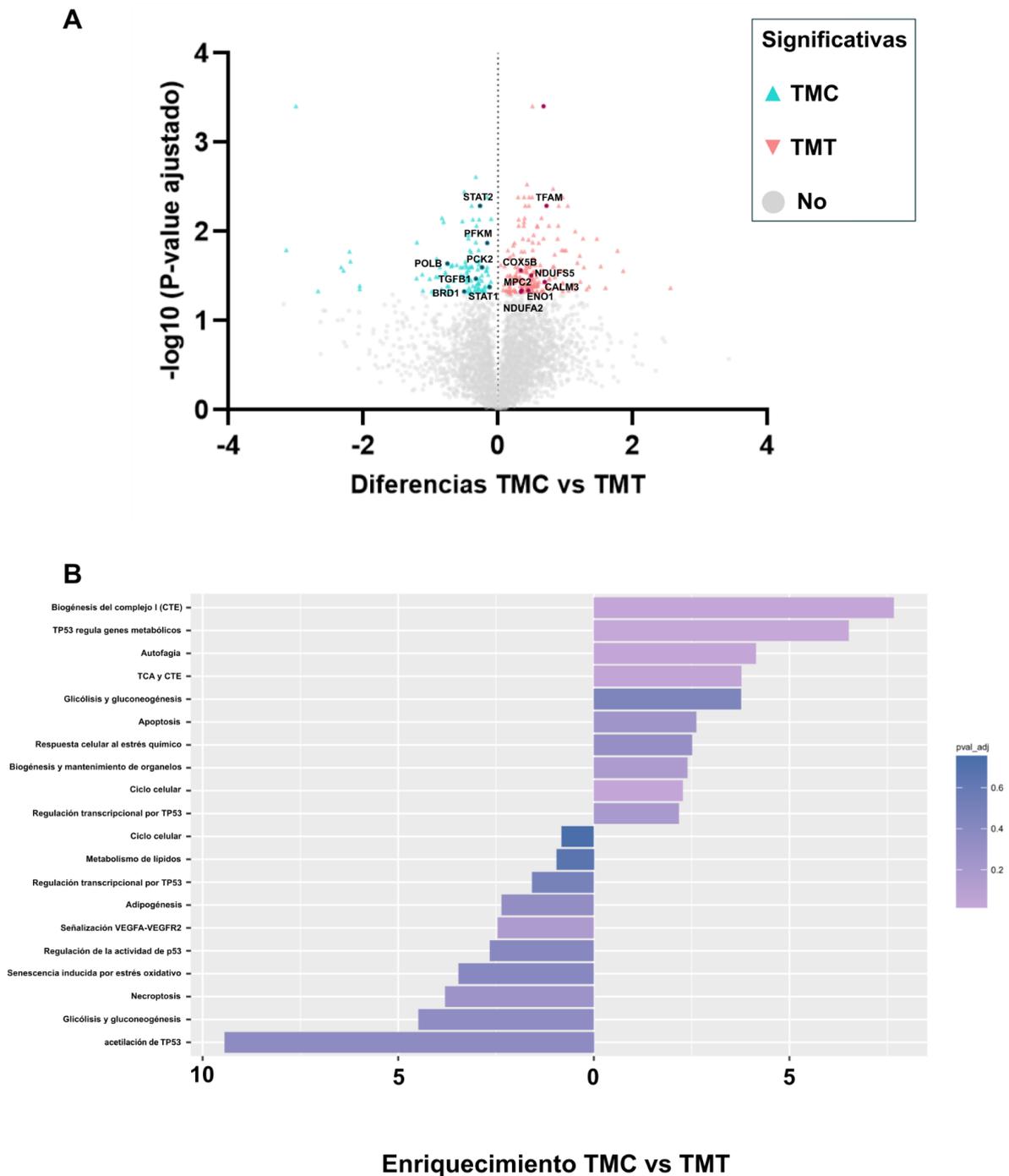
**Figura 13.** El tratamiento con 3-TYP reveló un aumento en la reparación de ADN en las mitocondrias, específicamente a través de la reparación por escisión de nucleótidos (GG-NER). (A) Volcano plot MAC vs MAT. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama. (B) Enriquecimiento de vías biológicas relevantes MAC vs MAT, se utilizó en programa GeneCodis con las anotaciones KEGG Pathways, Reactome Pathways y WikiPathways.

### ***7.7 La reducción en la expresión de SIRT3 con 3-TYP en células MCF7 podría estar relacionada con un fenotipo de cáncer más agresivo.***

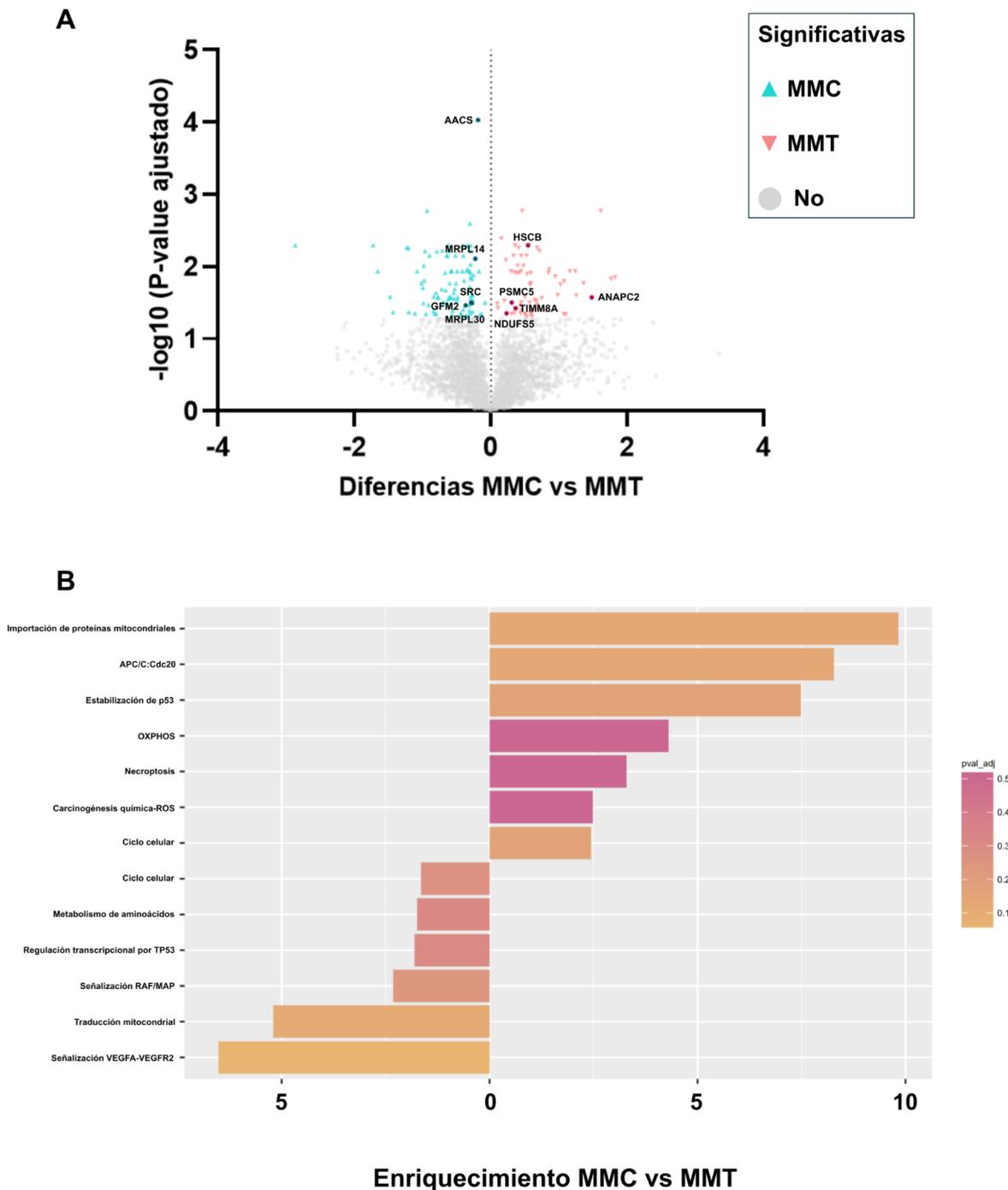
En el cáncer de mama, se ha establecido que SIRT3 tiene un papel como supresor de tumores. Esta observación ha sido respaldada por diversos grupos de investigación, donde se ha demostrado que restablecer la expresión de esta deacetilasa tiene la capacidad de regular los procesos implicados en la reprogramación metabólica, es decir, puede revertir el metabolismo glucolítico característico de este tipo de cáncer [88]. Nuestros resultados anteriores confirmaron la baja expresión de SIRT3 en la línea celular MCF7 en comparación con la línea celular A549 (Figura 6 y Figura 10A).

El análisis proteómico entre TMC y TMT mostró que tanto las muestras TMC como las muestras TMT enriquecieron vías del metabolismo glucolítico (Figura 14B). No obstante, observamos más vías del metabolismo oxidativo en las muestras TMT, específicamente las vías del TCA y la CTE, así como la vía de biogénesis del complejo I de la CTE (Figura 14B). Esto es consistente con lo observado en las proteínas mitocondriales, donde las muestras MMT enriquecieron la vía de OXPHOS (Figura 15B). Además, en las muestras TMT notamos un menor enriquecimiento de la vía de glucólisis y gluconeogénesis en comparación con las TMC.

En las muestras MMT, observamos también el enriquecimiento de la vía de necroptosis, y de la vía de activación del complejo promotor de anafase/ciclosoma (APC/C y APC/CCdc20). El APC/C, una ubiquitina ligasa E3, desempeña un papel crucial en la degradación de proteínas clave del ciclo celular al interactuar con las subunidades reguladoras Cdh1 y Cdc20. Cdc20 se ha asociado con la tumorigénesis al actuar como un oncogén [115]. La sobreexpresión de Cdc20 puede desregular el sistema de control del huso mitótico (SAC), permitiendo a las células evadir puntos de control y proliferar de manera descontrolada [116].



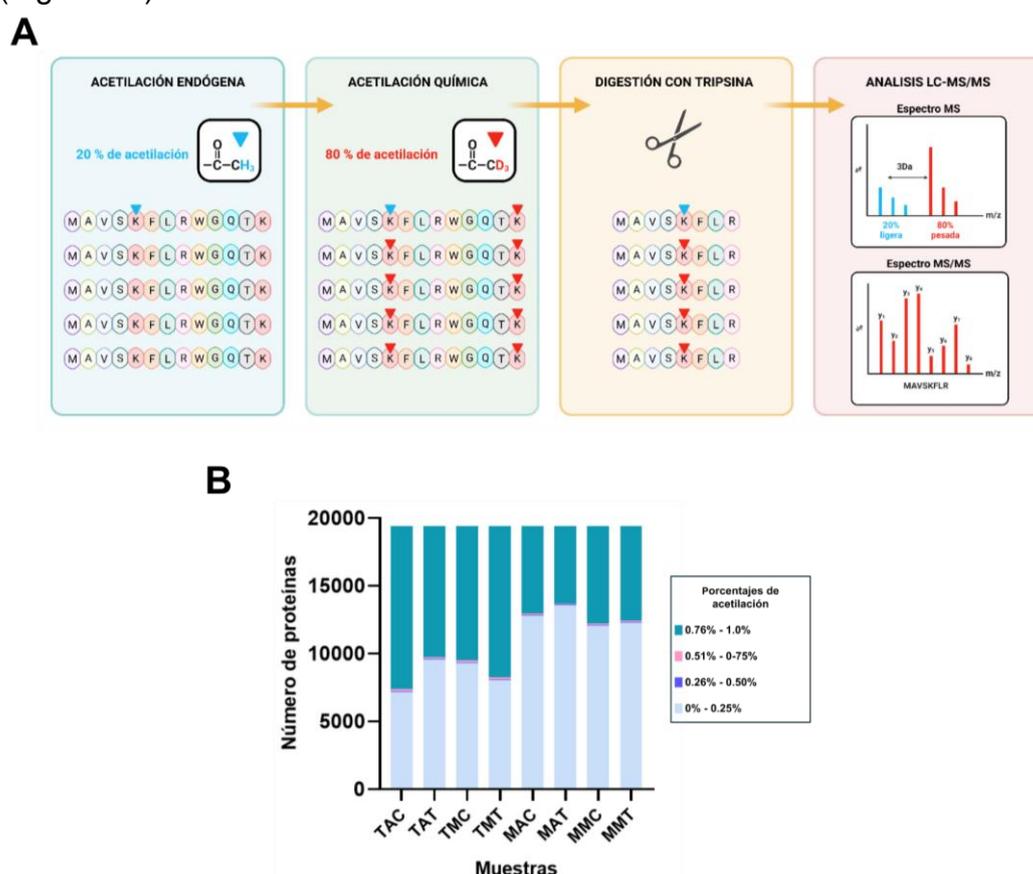
**Figura 14.** El tratamiento con 3-TYP disminuyó el enriquecimiento de vías relacionadas con el metabolismo glucolítico y aumentó el enriquecimiento de vías asociadas a la OXPHOS en células MCF7. (A) Volcano plot TMC vs TMT. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama. (B) Enriquecimiento de vías biológicas relevantes TMC vs TMT, se utilizó en programa GeneCodis con las anotaciones KEGG Pathways, Reactome Pathways y WikiPathways.



**Figura 15.** El tratamiento con 3-TYP reveló un aumento en el enriquecimiento de la vía de necroptosis y la vía de activación del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C y APC/CCdc20) en las mitocondrias de células MCF7, ambas asociadas con un pronóstico desfavorable en el cáncer. **(A)** Volcano plot MMC vs MMT. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama. **(B)** Enriquecimiento de vías biológicas relevantes MMC vs MMT, se utilizó en programa GeneCodis con las anotaciones KEGG Pathways, Reactome Pathways y WikiPathways.

## 7.8 Determinación de la estequiometría de acetilación y análisis de proteínas sobreacetiladas en las líneas celulares A549 y MCF7

Con el fin de determinar la estequiometría de acetilación, nuestros extractos de proteínas totales y mitocondriales de las líneas celulares A549 y MCF7, tanto en condiciones control (TAC, MAC, TMC y MMC) como tratadas con 3-TYP (TAT, MAT, TMT, MMT), fueron sometidos a acetilación química. Este proceso se llevó a cabo utilizando el reactivo Nas-d3, tal como se detalla en la sección 5.6 de este escrito. De esta manera, logramos diferenciar entre las proteínas acetiladas de forma endógena y aquellas acetiladas químicamente, identificando una variación en la relación m/z de 3 Da (Figura 16).



**Figura 16. Determinación de la estequiometría de acetilación.** (A) Representación gráfica de la metodología utilizada para la determinación de la estequiometría de acetilación. (B) Porcentajes de acetilación encontrados entre las comparaciones de muestras: TAC/TAT, MAC/MAT, TMC/TMT y MMC/MMT. Las proteínas con un porcentaje de acetilación  $\geq 0.4$  % se consideraron como sobreacetiladas.

De las 6,457 proteínas identificadas en nuestro proteoma, detectamos 19,412 péptidos acetilados en 6,004 proteínas distintas. Clasificamos como sobreacetiladas aquellas que mostraban un porcentaje de acetilación igual o superior al 0.4% (Figura 16). Se realizaron las mismas comparaciones que en el proteoma: TAC/TMC, MAC/MMC, TAC/TAT, MAC/MAT, TMC/TMT y MMC/MMT, y se llevó a cabo un enriquecimiento de las vías biológicas relevantes de las proteínas sobreacetiladas utilizando la plataforma GeneCodis [96].

### **7.9 La sobreacetilación de proteínas en células A549 y MCF7 tiene un impacto significativo en el metabolismo del cáncer**

Dentro de las vías biológicas enriquecidas de proteínas sobreacetiladas en TAC, encontramos la vía de señalización de VEGFA-VEGFR2 (Figura 17), vinculada con angiogénesis y metástasis tumoral. También de manera interesante observamos vías relacionadas con apoptosis, necroptosis y endocitosis. La regulación de la apoptosis y la necroptosis es fundamental en el cáncer, como se destacó en la *sección 1.3.4*, donde mencionamos que las células cancerosas se caracterizan por evadir la muerte celular. Además, se ha documentado la desregulación de las vías endocíticas en el cáncer, debido a su impacto en la regulación de las vías de señalización, así como en la configuración lipídica de la membrana plasmática y el potencial osmótico [114,117].

En muestras MAC, las proteínas sobreacetiladas enriquecieron vías de señalización como la vía PI3K-Akt, además de la interacción de matriz extracelular (MEC)-receptor (Figura 17). La vía de señalización PI3K-Akt desempeña un papel crucial en la regulación del crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia, la estabilidad del genoma, el metabolismo de la glucosa y la neovascularización. Sin embargo, se ha observado que la sobreactivación de esta vía está vinculada al desarrollo de cáncer [118].

Por otro lado, la MEC experimenta cambios importantes en su organización durante el desarrollo del cáncer. Estas alteraciones están relacionadas con la cantidad y el entrecruzamiento de los elementos que la constituyen, lo que resulta en un aumento de la rigidez del tejido y, en consecuencia, contribuye a una mecanotransducción aberrante que favorece la transformación maligna de las células [119]. Sumado a esto, se ha observado que las variantes en el ADNmt pueden afectar el funcionamiento adecuado de la MEC al alterar la expresión génica [120].

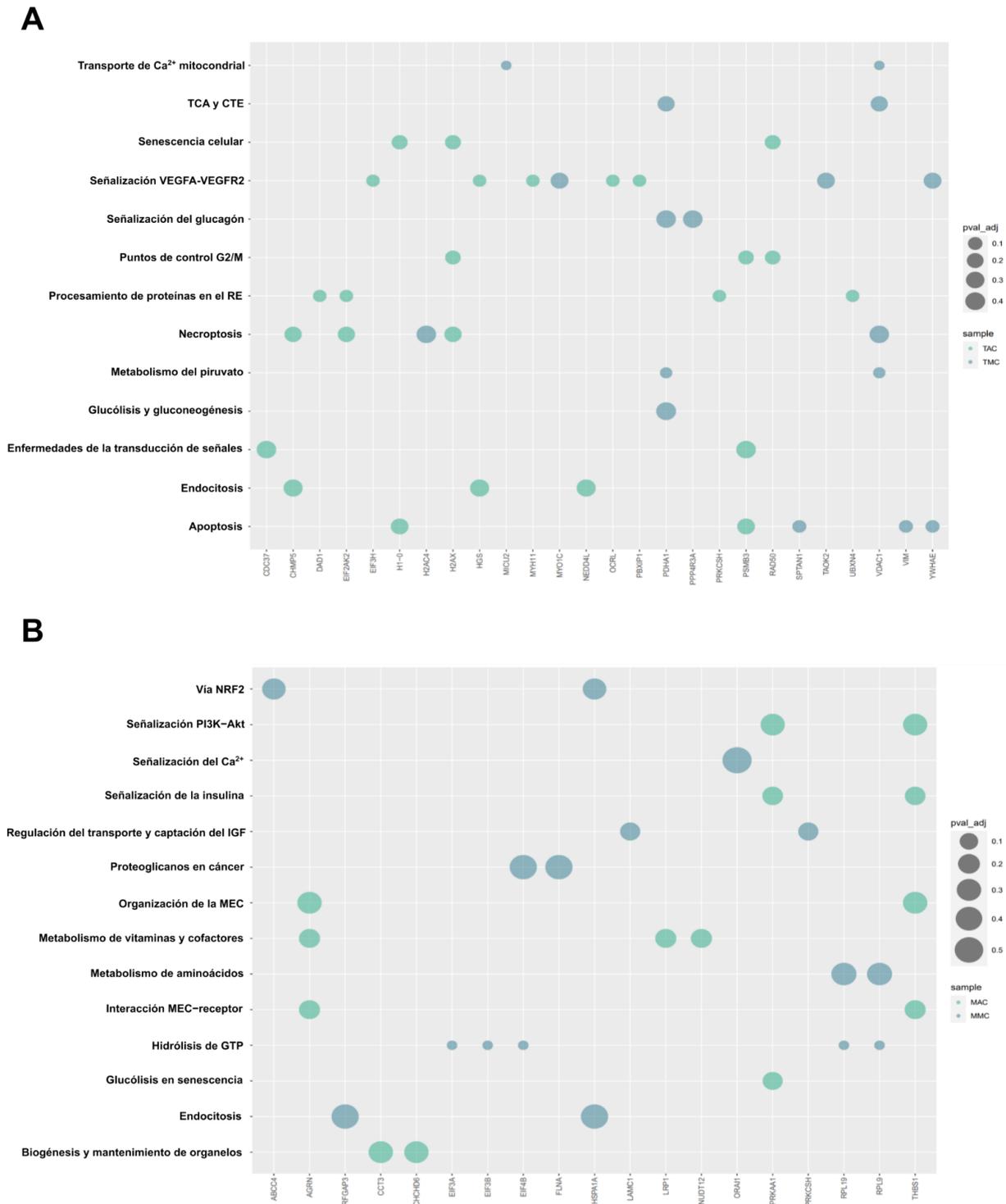
Las proteínas sobreacetiladas presentes en las muestras TMC también exhibieron enriquecimiento en la vía de VEGFA-VEGFR2 y en la vía de necroptosis, así como un enriquecimiento evidente en la vía de transporte de iones mitocondriales (Figura 17). Dentro de esta última vía, destacan la proteína de absorción de calcio mitocondrial 2 (MICU2) y la proteína del canal selectivo aniónico dependiente del voltaje 1 (VDAC1). El uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial está compuesto por la subunidad MCU, la proteína auxiliar EMRE y las subunidades reguladoras MICU1/MICU2. Es importante señalar que la acción de MICU2 está condicionada por la presencia de MICU1, y juntas desempeñan un papel crucial en la regulación de la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial [121,122]. Mientras que VDAC1 juega un papel esencial en la conexión entre el metabolismo mitocondrial y celular al facilitar la entrada de moléculas clave como piruvato, malato, succinato y NADH, elementos fundamentales para el TCA y la CTE. Además, VDAC también participa en el flujo de entrada y salida de  $\text{Ca}^{2+}$  [123].

Actualmente, no hay investigaciones sobre la acetilación de la proteína MICU2. A pesar de ello, en la proteína VDAC1 se ha propuesto que SIRT3 desempeña un papel

importante en el rescate de la función mitocondrial en células donde existe una anomalía en la función o una baja expresión de SIRT3, como es el caso de células de cáncer de mama [124].

Otra proteína sobreacetilada que llamó nuestra atención en muestras TMC fue la subunidad alfa E1 de la piruvato deshidrogenasa (PDHA1), que constituye la primera enzima del complejo PDH. Este complejo cataliza la conversión de piruvato en acetil-CoA y CO<sub>2</sub>, donde como se ha señalado se utilizan posteriormente en el TCA y la OXPHOS para la generación de ATP. Se ha observado que SIRT3 interactúa con PDHA1 y aumenta la actividad del complejo PDH [125].

Las proteínas sobreacetiladas presentes en muestras MMC, enriquecieron la vía del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (NRF2) (Figura 17). Como se mencionó anteriormente, las ROS desempeñan un papel crucial en la progresión del cáncer de mama, y la principal regulación de este estrés oxidativo ocurre a través de NRF2. Las células cancerosas suelen mostrar una sobreexpresión de NRF2, fenómeno asociado con la resistencia a fármacos. Este fenómeno, a su vez, se vincula con una mayor expresión de transportadores del casete de unión a ATP (ABC), como ABCC4, que también se observa sobreacetilado en nuestros resultados (Figura 17) [126].



**Figura 17. Cambios en el metabolismo de líneas celulares A549 y MCF7 en proteínas totales y mitocondriales. (A) Bubble plot TAC vs TMC y (B) Bubble plot MAC vs MMC. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama.**

### **7.10 SIRT3 podría estar participando en la deacetilación de múltiples proteínas clave en el metabolismo de células A549.**

Al contrastar el enriquecimiento de las proteínas sobreacetiladas entre TAC/MAC y TAT/MAT, también se observaron hallazgos interesantes. En las muestras TAC, destacó el enriquecimiento del ciclo RAC3 GTPasa, con una sobreacetilación específica en la proteína 1 asociada a Nck (NCKAP1) y en la proteína Fosfatidilinositol Polifosfato 5-Fosfatasa (OCRL) (Figura 18). Estudios previos respaldan estos hallazgos al confirmar la expresión positiva de RAC3 en tejido de adenocarcinoma de pulmón. La inhibición de esta proteína se asoció con resultados favorables, contribuyendo a detener el desarrollo del cáncer [127]. También observamos sobreacetilación en la proteína SMARCC1 relacionada con la vía de actividad supresora de tumores de SMARCB1.

En las muestras MAC, las proteínas sobreacetiladas enriquecieron la vía de senescencia y autofagia en cáncer (Figura 18), que se sabe desempeñan un papel activo en el respaldo a la supervivencia de las células cancerosas. Entre las proteínas sobreacetiladas identificadas, la proteína A1 del grupo de alta movilidad (HMGA1) enriqueció la vía del metabolismo de NAD en la senescencia inducida por oncogenes y la senescencia asociada a la disfunción mitocondrial. También observamos un enriquecimiento significativo en la vía de endocitosis, la cual ha sido previamente asociada con el desarrollo del cáncer debido a su desregulación. Identificamos sobreacetilación en la proteína endofilina-B1 (SH3GLB1) y en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR); sin embargo, no se dispone de información sobre la acetilación y su función en ninguna de estas dos proteínas.

Adicionalmente vimos sobreacetilación de la proteína CHCM1/CHCHD6, la cual ha sido asociada con la biogénesis mitocondrial (Figura 18), especialmente en lo que respecta al mantenimiento de la morfología de las crestas mitocondriales, la producción de ATP y el consumo de oxígeno [128]. Cabe destacar que hasta el momento tampoco se ha informado sobre el papel específico de la acetilación en esta proteína.

En cuanto a muestras tratadas TAT, destacaron las vías relacionadas con la proteína p53 (Figura 18). La vía de regulación por p53 de genes reparadores del ADN mostró sobreacetilación en las proteínas Subunidad B del ARN pol II (POLR2B) y en el factor de transcripción general IIF subunidad 2 (GTF2F2).

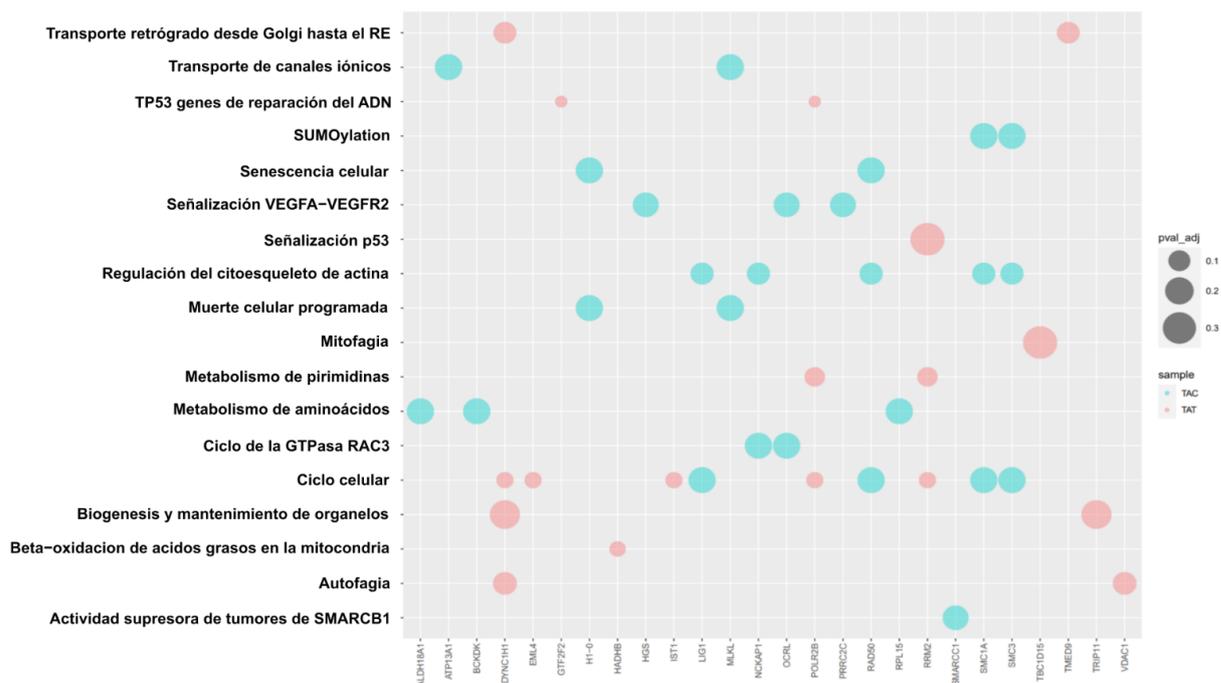
En la vía de señalización p53, la subunidad M2 de la ribonucleósido-difosfato reductasa (RRM2) mostró sobreacetilación. La ribonucleótido reductasa (RNR) cataliza la conversión de ribonucleótidos en 2'-desoxirribonucleótidos, proporcionando así precursores esenciales para la síntesis y reparación del ADN. Se ha demostrado que la actividad de RNR está sujeta a regulación mediante el proceso de

acetilación/deacetilación de RRM2. Cuando RRM2 se acetila, la actividad de RNR se inactiva; cuando se deacetila, se activa nuevamente para cumplir su función [129].

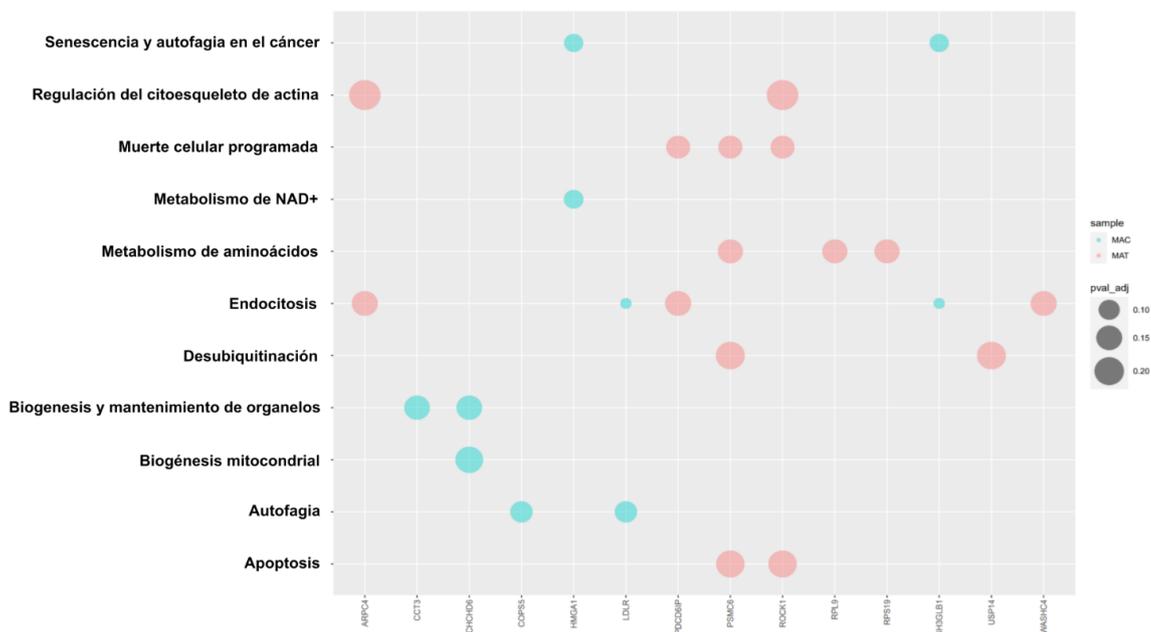
Otra vía interesante que enriqueció las proteínas sobreacetiladas de las muestras TAT fue el transporte retrógrado del aparato de Golgi al RE. Aunque esta vía no ha sido extensamente investigada en el contexto del cáncer, es un mecanismo para regular el retorno de las proteínas mal plegadas residentes en el aparato de Golgi al RE [130]. Las proteínas sobreacetiladas incluyen la proteína de interacción con el receptor tiroideo 11 (TRIP11), la dineína citoplasmática 1 cadena pesada 1 (DYNC1H1) y la proteína de tráfico transmembrana P24 9 (TMED9). Sin embargo, la información acerca de la acetilación y su función específica en estas proteínas es limitada.

A diferencia de los resultados obtenidos en nuestras muestras totales, la proteína sobreacetilada que captó principalmente nuestra atención en muestras MAT fue el factor de ensamblaje 4 del complejo succinato deshidrogenasa (SDHAF4) (Figura 18). El complejo II de la CTE o SDH desempeña un papel crucial en el TCA y la OXPHOS, y diversos grupos de investigación han visto que su correcto funcionamiento está intrínsecamente vinculado al ensamblaje adecuado de las subunidades SDH, mediado por factores de ensamblaje de SDH (SDHAF) [131,132]. Sin embargo, la información y comprensión de la función del factor SDHAF4 es limitada en la actualidad, lo poco que se conoce es acerca de su papel en respuesta al estrés cardíaco [133].

**A**



**B**



**Figura 18. Cambios en la acetilación de proteínas en la línea celular A549, tanto en proteínas totales como mitocondriales, bajo condiciones de control y tratamiento con 3-TYP. (A) Bubble plot TAC vs TAT y (B) Bubble plot MAC vs MAT. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama.**

### **7.11 La baja expresión de SIRT3 potencia la acetilación de proteínas relacionadas con el cáncer**

Las proteínas sobreacetiladas en las muestras TMC enriquecieron diversas vías, incluyendo la mitofagia, la vía de señalización del receptor de muerte, la hidroxilación de prolina dependiente de oxígeno del HIF- $\alpha$  y la detección de ROS por NFE2L2 (Figura 19).

Como señalamos previamente, la mitofagia, también denominada autofagia mitocondrial, busca prevenir el daño en las mitocondrias. Cualquier alteración en la regulación de este proceso conlleva a la pérdida de la capacidad de control de calidad mitocondrial. Hemos observado sobreacetilación en la proteína caseína cinasa II alfa 1 (CSNK2A1), que forma parte de las proteínas que regulan la mitofagia, aunque actualmente no se conoce el efecto específico de su acetilación.

En la vía de señalización del receptor de muerte, observamos sobreacetilación en las proteínas tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (YWHAZ) y en la proteína nicastrina (NCSTN). YWHAZ participa en diversos procesos celulares, como el crecimiento, la diferenciación, la mitosis y la transformación oncogénica.

Adicionalmente, identificamos sobreacetilación en la ubiquitina conjugadora a la enzima E2 D3 (UBE2D3) y en la caseína cinasa 2 alfa 1 (CSNK2A1), relacionadas con la hidroxilación de prolina y la detección de ROS, respectivamente. Como mencionamos anteriormente, la degradación del HIF-1 $\alpha$  implica la hidroxilación de residuos de prolina, seguida del reconocimiento por VHL, que funciona como una enzima ligasa de ubiquitina E3. Para que la E3 pueda desempeñar su función, es esencial la participación de la enzima de activación E1 y la enzima de conjugación E2. La acetilación de UBE2D3 podría estar interfiriendo con la transferencia de la ubiquitina de E1 a E2, lo que podría resultar en la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .

En relación con CSNK2A1, su sobreexpresión se ha asociado con la promoción de procesos carcinogénicos en cáncer de mama, activando vías de señalización relacionadas con el desarrollo del cáncer. Varias de estas vías modulan la reparación por escisión de nucleótidos (NER) un proceso activado en respuesta a agentes genotóxicos. En resultados previos mencionamos que el aumento en NFE2L2/NRF2 confiere a las células cancerosas una mayor capacidad antioxidante, lo que podría ser regulado por CSNK2A1.

En muestras MMC, se observó una sobreacetilación en la subunidad reguladora de la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDPR), asociada al metabolismo del piruvato. Un estudio en 2023 señaló que el aumento en la cinasa 1 de la piruvato deshidrogenasa (PDK1) y PDPR conlleva a la inhibición de la activación de la PDH, resultando en la supresión de la OXPHOS [134]. Esta modificación de PDPR a través de la acetilación

podría desempeñar un papel crucial en la reprogramación metabólica en el cáncer de mama. Además, se identificó una sobreacetilación en la proteína acil-CoA oxidasa 3, pristanoilo (ACOX3), involucrada en la degradación de ácidos grasos y el metabolismo de  $\beta$ -alanina (Figura 19); sin embargo, su función en el cáncer de mama ha sido poco estudiada.

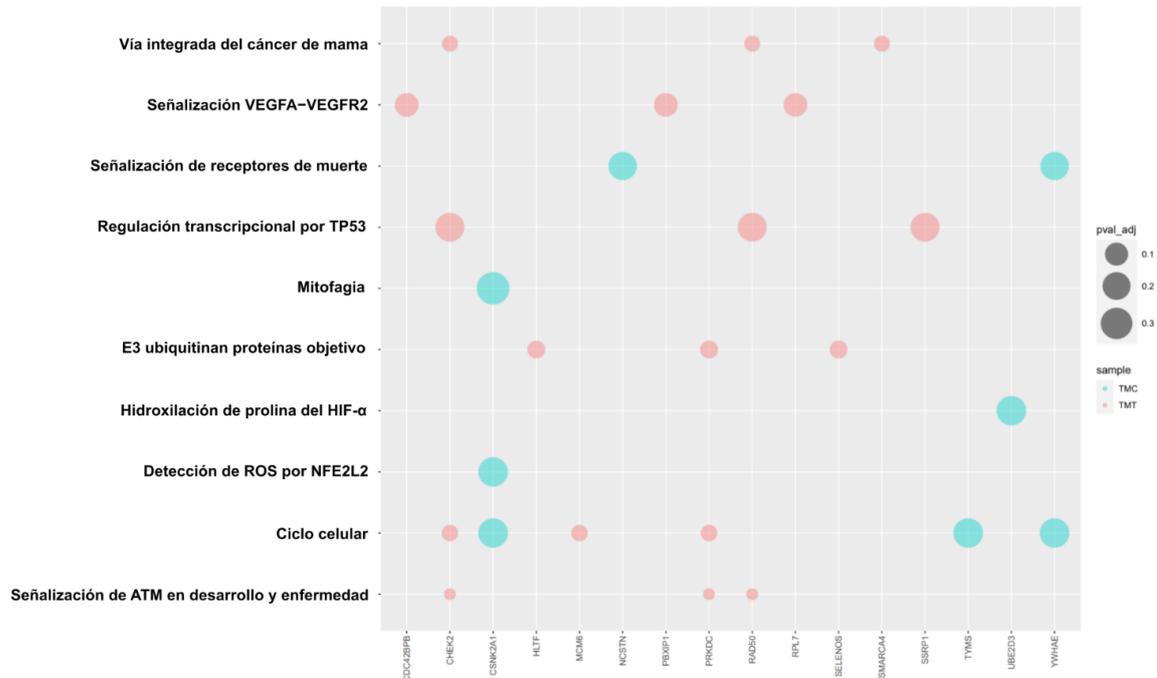
En el caso de las muestras TMT, se detectó sobreacetilación en el punto de control cinasa 2 (CHEK2), en la proteína de reconocimiento específico de estructura 1 (SSRP1) y en la proteína reparadora de roturas de doble hebra (RAD50).

RAD50 forma parte del complejo Mre11 – Rad50 – Nbs1 (MRN), crucial para la respuesta celular ante roturas de doble cadena del ADN (DSB), asociadas con defectos en el metabolismo en diversas enfermedades que presentan inestabilidad genómica [135]. El complejo MRN integra los procesos de reparación del ADN con la activación de la señalización de la proteína cinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM), una vía que también se destaca en nuestros datos (Figura 19). Estudios anteriores han confirmado que el MRN potencia la actividad de ATM hacia sus sustratos, entre los que se incluyen p53, CHEK2 e histona H2AX [136]. Esto resalta la importancia de la regulación mediada por acetilación de RAD50.

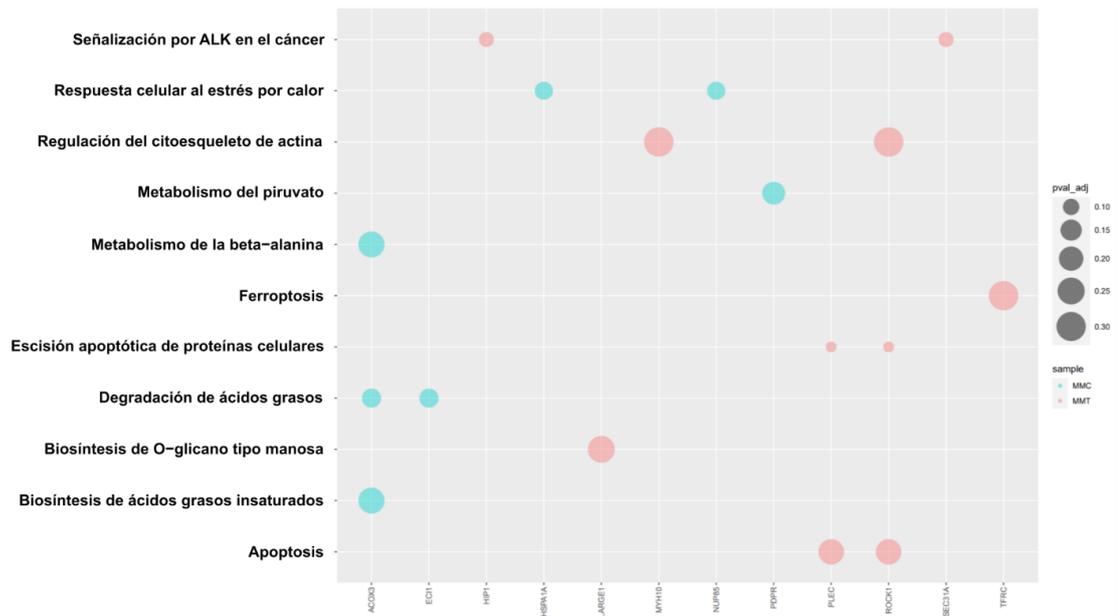
Las proteínas de las muestras MMT enriquecieron dos vías importantes: la vía de escisión apoptótica de proteínas celulares y la vía de señalización por la cinasa del linfoma anaplásico (ALK) en cáncer. El proceso de apoptosis se ejecuta mediante la escisión, a cargo de caspasas, de proteínas vitales. Dentro de la lista de sustratos de las caspasas encontramos a la proteína plectina (PLEC) y a la proteína cinasa 1 que contiene bobina en espiral asociada a Rho (ROCK1) [137], que mostraron un aumento en la acetilación de acuerdo con nuestros resultados (ver Figura 19).

La vía de señalización AKL desempeña un papel oncogénico crucial, y se postula que está mediada por la activación de tirosina cinasas que promueven la supervivencia celular mediante la activación de vías de señalización específicas o por la inhibición de la apoptosis.

**A**



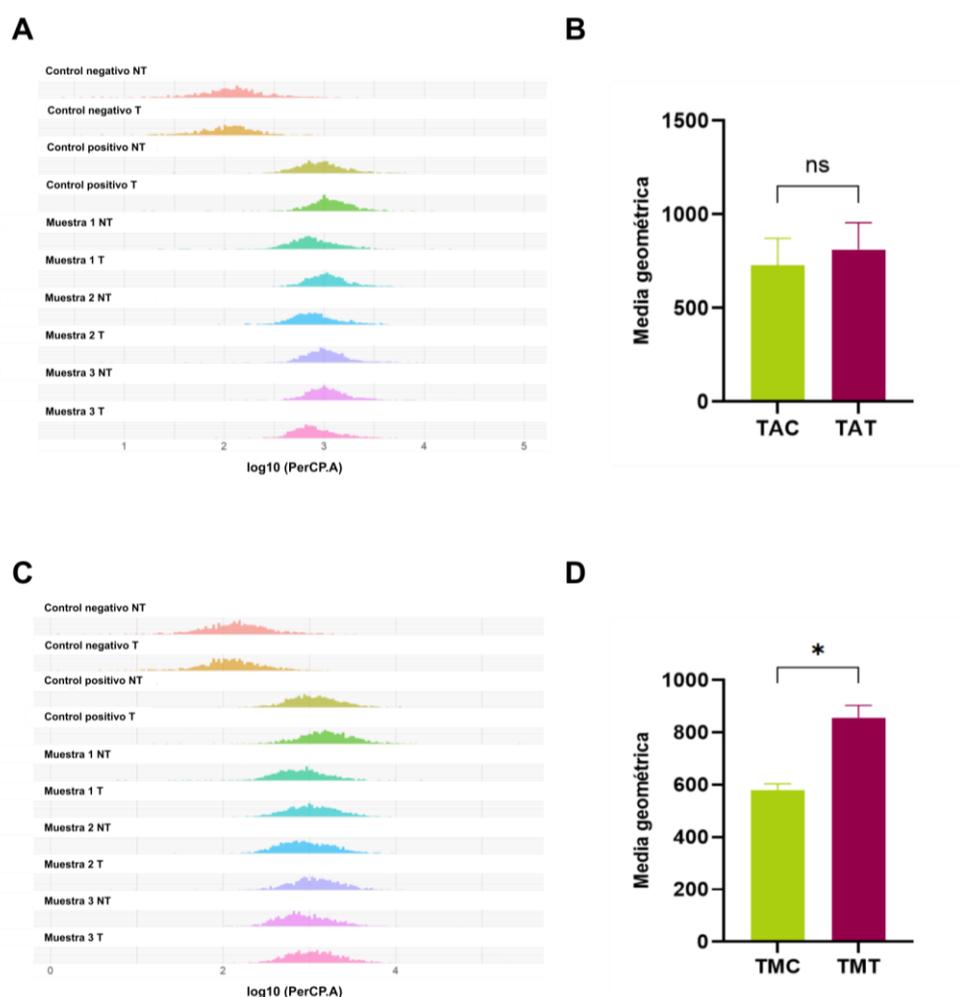
**B**



**Figura 19. Cambios en la acetilación de proteínas en la línea celular MCF7, tanto en proteínas totales como mitocondriales, bajo condiciones de control y tratamiento con 3-TYP. (A) Bubble plot TMC vs TMT y (B) Bubble plot MMC vs MMT. Los nombres de las proteínas relacionadas con las vías enriquecidas más relevantes de cada una de las líneas celulares se encuentran resaltadas en el diagrama.**

**7.12 SIRT3 desempeña un papel crucial como regulador en la producción de ROS en la línea celular MCF7; la intensificación de su inhibición conlleva a un aumento en los niveles de producción de dichas especies en las células.**

Para tener un mejor entendimiento del metabolismo de estas líneas celulares y su relación con las ROS, determinamos las ROS mitocondriales mediante el uso del reactivo MitoSOX. Como control positivo utilizamos Antimicina A, un inhibidor del complejo III de la CTE, que en consecuencia incrementa la producción de ROS en las células. Nuestros resultados revelaron la ausencia de diferencias significativas entre las muestras TAC y TAT, pero sí se observaron diferencias entre las muestras TMC y TMT (Figura 20B y D). Los histogramas de la línea celular A549 indican que solo en la réplica 1 hay un ligero desplazamiento en la fluorescencia de TAT (Figura 20A). Mientras que en las muestras de la línea celular MCF7 si se observa mayor fluorescencia de las muestras TMT respecto a las TMC en las tres réplicas (Figura 20C).



**Figura 20. SIRT3 no ejerce un efecto directo en los niveles de ROS en la línea celular A549, pero sí en la línea MCF7. (A) histograma de la línea A549: control (TAC) y células tratadas con el inhibidor 3-TYP (TAT). (B) histograma de la línea MCF7: control (TMC) y células tratadas con el inhibidor 3-TYP (TMT). Se utilizó la prueba estadística T pareada.**

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer de pulmón y el cáncer de mama son dos de los tipos de cáncer más estudiados, ya que son las principales causas de muerte por cáncer en hombres y mujeres, respectivamente [80]. Actualmente, numerosos estudios se centran en una comprensión más profunda del metabolismo de estas células cancerosas, con el propósito de identificar potenciales blancos terapéuticos. Entre estos blancos se tiene un interés particular en la deacetilasa mitocondrial SIRT3, ya que se ha observado su papel como supresor u oncogén en ciertos tipos de cáncer [78].

Como se puede apreciar en la Figura 6, las células A549 exhiben una expresión notablemente elevada de SIRT3, mientras que las células MCF7 muestran una expresión más baja. Esta información podría ofrecer indicios sobre la función diferencial de SIRT3 en estos dos tipos de cáncer. El papel de SIRT3 como supresor de tumores en cáncer de mama ha sido mejor estudiado, y a través de estudios funcionales se ha confirmado que el restablecimiento de la expresión de SIRT3, tiene efectos positivos en contrarrestar la reprogramación metabólica, y en consecuencia el desarrollo del cáncer [88].

En el caso del NSCLC, el papel de SIRT3 resulta controvertido. Por un lado, algunos estudios respaldan que, en células de adenocarcinoma, como las células A549, SIRT3 actúa como supresor de tumores [138]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de esta deacetilasa está relacionada con procesos que favorecen el desarrollo del cáncer y también con la resistencia a la radioterapia [83,85]. Con el fin de confirmar lo ya establecido y obtener un mejor entendimiento del papel de SIRT3 en estos dos tipos de cáncer, utilizamos el inhibidor selectivo 3-TYP. Nuestros resultados mostraron que el inhibidor 3-TYP no tiene influencia en la expresión de SIRT3 (Figura 7).

Para obtener una visión más completa del papel de SIRT3 en estos dos tipos de cáncer, llevamos a cabo investigaciones en proteómica, acetilómica y producción de ROS de nuestras dos líneas celulares.

En el NSCLC, se han llevado a cabo estudios para explorar la reprogramación metabólica asociada con este tipo de cáncer. Por ejemplo, un estudio realizado en 2020 por Jiangang Zhao y colaboradores respalda la idea de que la reprogramación metabólica en el tejido tumoral de pacientes con NSCLC está directamente relacionada con mutaciones en el factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (NFE2L2/NRF2) [139]. Nuestros resultados mostraron un enriquecimiento en la vía de detección de ROS por NFE2L2, tanto en muestras totales como en muestras mitocondriales de células A549. Sin embargo, no se observó directamente la proteína NFE2L2, sino proteínas relacionadas con su actividad. Por lo tanto, se requieren más investigaciones funcionales para comprender el papel específico de esta vía en esta línea celular de NSCLC.

Además, otro estudio realizado en 2019 por Pei-Hsuan Chen y colaboradores observó una débil correlación entre el consumo de glucosa y la tasa de crecimiento en diversas líneas celulares de NSCLC. Sin embargo, encontraron una correlación positiva

interesante con el consumo de glutamina [140], un aminoácido que da lugar a intermediarios del TCA, lo que podría facilitar la generación continua de energía a través de la fosforilación oxidativa en este tipo de células.

La comparación entre los metabolismos de las líneas A549 y MCF7, reveló que la línea A549 parece tener una predominancia hacia el metabolismo oxidativo, evidenciada por el enriquecimiento de diversas vías asociadas a este. Dentro de estas vías, identificamos aquellas relacionadas con la biosíntesis y el metabolismo del NAD<sup>+</sup>, una molécula crucial para el funcionamiento de las sirtuinas. Como esperábamos, observamos la sobreexpresión de SIRT3 en las muestras TAC y MAC (Figura 10 y Figura 11), pero de manera interesante también la sobreexpresión de SIRT1 en las muestras TAC (Figura 10).

En la sección 6.5 de los resultados, destacamos que el metabolismo del NAD<sup>+</sup> juega un papel crucial en algunos tipos de cáncer, ya que esta molécula es aprovechada por proteínas como PARP y SIRT1 para el crecimiento y proliferación celular [102]. Aunque la información sobre SIRT3 es limitada, nuestros resultados proteómicos indicaron que la inhibición de SIRT3 en A549 enriqueció vías metabólicas significativas, tales como la glucólisis, la detoxificación de ROS y la reparación de ADN, al mismo tiempo que redujo la expresión de vías reconocidas por su desregulación en el cáncer, como la vía de endocitosis (Figura 12B y Figura 13B).

Los resultados del análisis acetilómico en las muestras de células tumorales (TAC) y células mitocondriales aisladas (MAC) revelaron una sobreacetilación de proteínas relacionadas con el desarrollo del cáncer, así como una sobreacetilación de la proteína CHCM1/CHCHD6 asociada a la biogénesis mitocondrial (ver Figura 18). Aunque la regulación por acetilación de muchas de estas proteínas aún no se comprende completamente, estos hallazgos establecen una base para investigaciones futuras.

En contraste, el análisis acetilómico en las muestras de células tumorales (TAT) y células mitocondriales aisladas (MAT) identificó sobreacetilación en proteínas relacionadas con p53, como la proteína RRM2. A pesar de que la deacetilación de RRM2 puede ser mediada por diversas deacetilasas citoplasmáticas, entre las cuales podría considerarse a SIRT3, nuestros resultados indican que SIRT3 no desempeña un papel significativo, ya que no previene la acetilación de esta proteína. También de manera interesante, observamos sobreacetilación en proteínas involucradas en el transporte retrógrado desde el aparato de Golgi al retículo endoplásmico (RE). Aunque este fenómeno no se ha estudiado en detalle, se reconoce que el mal plegamiento de proteínas es un mecanismo que puede desencadenar enfermedades como el cáncer [141]. Por lo tanto, la acetilación en estas proteínas podría desempeñar un papel importante en contrarrestar la enfermedad.

Los resultados en la línea A549 proporcionan evidencia de preferencia por un metabolismo de tipo oxidativo, sin embargo, para comprender mejor cómo SIRT3 se encuentra regulando este metabolismo es necesario realizar análisis funcionales. El análisis de la generación de ROS mitocondriales a través de citometría de flujo no

mostró cambios significativos en la producción de estas especies al utilizar el inhibidor 3-TYP. Por lo tanto, parece que SIRT3 no tiene un papel activo en el control de estas especies y más bien se encuentra regulando otras proteínas.

Por otro lado, nuestros resultados proteómicos de la comparación entre los metabolismos de las líneas A549 y MCF7, destacan la predominancia en el enriquecimiento de vías biológicas relacionadas con el metabolismo glucolítico en las células MCF7. Dentro de estas vías podemos destacar la misma glucólisis y la señalización del HIF-1 (Figura 10). Resultado respaldado por numerosos estudios que han documentado una evidente reprogramación metabólica en esta línea celular y en este tipo de cáncer [105,106].

Sin embargo, también identificamos vías biológicas enriquecidas en las muestras TMC y MMC relacionadas con la función mitocondrial, así como la generación y detección de ROS (Figura 10 y Figura 11). Esto probablemente se debe a la relación existente entre la disfunción mitocondrial, responsable de la generación de ROS, y la participación de estas especies en la estabilización del HIF1- $\alpha$ , una subunidad clave para desencadenar la reprogramación metabólica.

Nuestros resultados de esta comparación también coinciden con investigaciones previas [88,89] y con nuestros resultados en la Figura 6. A diferencia de la línea celular A549, la línea MCF7 no exhibe sobreexpresión de SIRT3 (ver Figura 6 y Figura 11); de hecho, parece presentar una expresión más baja de esta proteína. Por esta razón, en nuestros resultados utilizando el inhibidor 3-TYP, no esperábamos cambios drásticos en cuanto al enriquecimiento de vías biológicas. Sin embargo, se sabe que la pérdida de la función de SIRT3 puede contribuir a un fenotipo más agresivo en ciertos tipos de cáncer [142].

Nuestros resultados sugieren que el enriquecimiento de vías relacionadas con el metabolismo oxidativo, como aquellas que involucran proteínas como COX5B, MPC2, NDUFA10, NDUFS5, entre otras (ver Figura 14A y Figura 15A), podría indicar un estado anormal de estas proteínas. Esto podría contribuir a la generación de ROS, las cuales, además de estar implicadas en la estabilización del factor de transcripción HIF- $\alpha$  y en el metabolismo glucolítico, están vinculadas con procesos celulares clave como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular [143].

El notable enriquecimiento de vías relacionadas con la necroptosis, APC/C y APC/CCdc20, las cuales están altamente implicadas en el cáncer, sugiere que intensificar la inhibición de SIRT3 podría tener un impacto significativo en la agresividad del cáncer.

Los resultados proteómicos coincidieron con los resultados acetilómicos. Las proteínas que presentaron sobreacetilación en las muestras TMC y MMC, en nuestra comparación entre A549 y MCF7, están involucradas en la regulación del metabolismo, a través del complejo PDH y la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> y ROS. Entre las proteínas destacadas se encuentran VDAC y PDHA1 (Figura 17), que desempeñan un papel crucial en el funcionamiento de OXPHOS y de las que se sabe SIRT3 se encuentra mediando su deacetilación [124,125]. De manera similar, en nuestra comparación entre proteínas totales y mitocondriales control y tratadas, observamos

que en muestras TMC se encuentran sobreacetiladas proteínas como UBE2D3 y CSNK2A1, también relacionadas con el HIF-1 $\alpha$  y la detección de ROS (Figura 19).

También detectamos en TMC la sobreacetilación en las proteínas (YWHAZ) y en la proteína nicastrina (NCSTN). En el cáncer de mama, la inhibición de YWHAZ ha demostrado restablecer la sensibilidad a fármacos basados en doxorrubicina [144]. Creemos que la acetilación podría estar regulando la actividad de esta proteína. NCSTN también está vinculada al desarrollo del cáncer, y se ha observado que está altamente expresada en el cáncer de mama [145,146], lo que sugiere que la acetilación también desempeña un papel en su regulación.

Además de la sobreacetilación en la proteína PDPR en las muestras MMC, y según un artículo publicado en 2023, el aumento en la cinasa 1 de la piruvato deshidrogenasa (PDK1) y PDPR se relaciona con la inhibición de la activación de la PDH, afectando la obtención de energía a través de OXPHOS [134].

Por otro lado, en las muestras TMT, el análisis acetilómico también reveló la sobreacetilación de proteínas asociadas a un mal pronóstico en el cáncer, como aquellas relacionadas con la señalización de VEGF (Figura 19). Asimismo, destacó la sobreacetilación de las proteínas CHEK2, SSRP1 y RAD50. Estas proteínas contribuyeron al enriquecimiento de la regulación transcripcional por TP53 (ver Figura 19), la cual desempeña un papel esencial en la supresión de tumores [147].

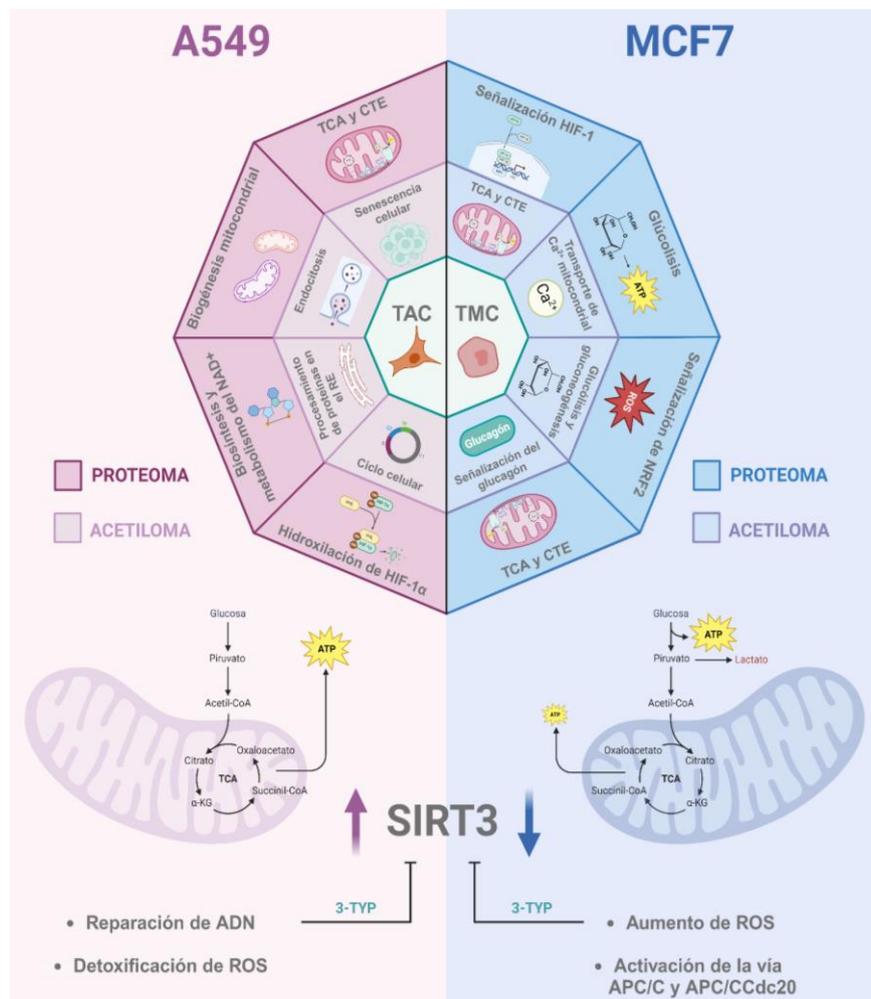
Existe una estrecha relación entre CHEK2 y p53, dado que CHEK2 contribuye a la estabilización de p53, lo que a su vez afecta las vías subsecuentes relacionadas con la supresión de tumores. Por otro lado, SSRP1, una subunidad del complejo del factor de elongación transcripcional de la cromatina (FACT), ha mostrado una expresión elevada en tejidos tumorales, y se ha observado que la inactivación de este complejo modula la actividad de p53 [148]. RAD50, por su parte, también está vinculada a la regulación de p53, actuando como parte del complejo MRN que activa la proteína ATM.

En las proteínas sobreacetiladas en las muestras MMT, se observó un enriquecimiento en la vía de escisión apoptótica de proteínas celulares (Figura 19) Consideramos que la sobreacetilación en las proteínas PLEC y ROCK, conocidos sustratos de las caspasas [137]. La escisión apoptótica de ROCK1 activa la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina, lo que conduce a la formación de protuberancias (ampollas de membrana) en la superficie de las células apoptóticas, un proceso necesario para que las células generen cuerpos apoptóticos [149]. Mientras que PLEC desempeña un papel crucial en la organización de los filamentos intermedios de citoqueratina y vimentina; la escisión de esta proteína contribuye a los cambios apoptóticos en la forma de las células [137]. La acetilación de estas proteínas podría estar interfiriendo con la escisión por las caspasas, alterando así el proceso de apoptosis.

En las muestras MMT, también se observó un aumento en la actividad de la vía de señalización de ALK. En el cáncer de mama, la inhibición de ALK ha demostrado ser

efectiva para reducir el crecimiento celular [150]. La sobreexpresión de esta proteína se ha observado en casos de cáncer de mama triple negativo, correlacionándose con tumores poco diferenciados y con un alto índice de proliferación [151]. La sobreacetilación de Huntingtina-Interactuante Proteína 1 (HIP1) y del homólogo A del complejo del revestimiento COPII, componente 2 (SEC31A), podría desempeñar un papel clave en la activación de esta vía de señalización.

En términos generales, nuestros resultados indican que la reducción en la expresión de SIRT3 tiene un impacto significativo en la línea celular MCF7. La exacerbación en la inhibición de SIRT3 resulta en el enriquecimiento de vías biológicas vinculadas con un fenotipo de cáncer más agresivo, y esto podría confirmarse con nuestro estudio funcional en la generación de ROS mitocondriales, ya que el tratamiento con 3-TYP aumenta la producción de dichas especies (Figura 20). Estas especies, además de participar en la estabilización del HIF-1 $\alpha$ , que es clave en la reprogramación metabólica, también median otros procesos que contribuyen a la progresión del cáncer.



**Figura 21. Diferencias metabólicas en las líneas celulares A549 y MCF7.** (A) Representación esquemática de los resultados obtenidos mediante análisis de proteómica y acetilómica, destacando las vías biológicas más relevantes de células A549 y MCF7. (B) Representación esquemática de la expresión endógena de SIRT3 y el impacto del tratamiento con 3-TYP a nivel proteómico y acetilómico de las líneas celulares A549 y MCF7.

## 9. CONCLUSIONES

La deacetilasa SIRT3 se encuentra sobreexpresada en células A549 y subexpresada en células MCF7, lo que sugiere que la regulación a través de la deacetilación mediada por SIRT3 desempeña un papel fundamental en la progresión de estos dos tipos de cáncer.

La inhibición de SIRT3 en células A549 parece tener un efecto protector al prevenir la progresión de la enfermedad mediante el enriquecimiento de vías como la reparación del ADN y la detoxificación de ROS.

La inhibición de SIRT3 en células MCF7 parece potenciar la activación de vías asociadas con un pronóstico desfavorable en el cáncer, como la vía APC/CCdc20, la vía VEGF y las vías relacionadas con la OXPHOS, las cuales podrían estar comprometidas. Esto concuerda con nuestros resultados de citometría que muestran un aumento en los ROS mitocondriales.

El uso de herramientas proteómicas nos permitió tener un mayor entendimiento de la regulación mediante la acetilación y deacetilación de proteínas, tanto a nivel total como mitocondrial. Además, ha proporcionado una visión más clara del papel que podría desempeñar SIRT3 en estos dos tipos de cáncer. Por un lado, la sobreexpresión endógena de SIRT3 en células A549 y la restauración de sus funciones tras la inhibición sugieren un posible papel como oncogén. Por otro lado, la subexpresión endógena en células MCF7 y el aumento en el enriquecimiento de vías de mal pronóstico en cáncer tras su inhibición sugieren que la expresión de SIRT3 en este tipo de cáncer podría ser necesaria para el restablecimiento de funciones y podría revertir el efecto Warburg, sugiriendo su papel como supresor de tumores. No obstante, se requieren más estudios funcionales para corroborar estas observaciones.

## **10. PERSPECTIVAS**

Dada la limitación de tiempo y el alcance de este estudio, se recomienda llevar a cabo experimentos funcionales para respaldar los resultados obtenidos a través del análisis proteómico y acetilómico de las líneas celulares A549 y MCF7, tanto en condiciones de control como con tratamiento 3-TYP.

Se propone realizar estudios metabolómicos para obtener una comprensión más completa de las variaciones y diferencias en el metabolismo de las líneas celulares A549 y MCF7.

Se sugiere llevar a cabo un análisis proteómico y acetilómico de las líneas celulares A549 y MCF7, centrándose en la evaluación de la sobreexpresión de la deacetilasa SIRT3.

## 11. REFERENCIAS

1. Know L. *Mitochondria and the Future of Medicine: The Key to Understanding Disease, Chronic Illness, Aging, and Life Itself*. Chelsea Green Publishing; 2018.
2. Kleine T, Maier UG, Leister D. DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu Rev Plant Biol*. 2009;60: 115–138.
3. Nadalutti CA, Ayala-Peña S, Santos JH. Mitochondrial DNA damage as driver of cellular outcomes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022;322: C136–C150.
4. Memme JM, Erlich AT, Phukan G, Hood DA. Exercise and mitochondrial health. *J Physiol*. 2021;599: 803–817.
5. El-Gammal Z, Nasr MA, Elmehrath AO, Salah RA, Saad SM, El-Badri N. Regulation of mitochondrial temperature in health and disease. *Pflügers Arch*. 2022;474: 1043–1051.
6. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005;39: 359–407.
7. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 2000;25: 319–324.
8. Ramaccini D, Montoya-Urbe V, Aan FJ, Modesti L, Potes Y, Wieckowski MR, et al. Mitochondrial Function and Dysfunction in Dilated Cardiomyopathy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8: 624216.
9. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 2018;20: 745–754.
10. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21: 204–224.
11. Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23: 141–161.
12. Vikramdeo KS, Sudan SK, Singh AP, Singh S, Dasgupta S. Mitochondrial respiratory complexes: Significance in human mitochondrial disorders and cancers. *J Cell Physiol*. 2022;237: 4049–4078.
13. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger : principios de bioquímica*. 2014.
14. Sousa JS, D'Imprima E, Vonck J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell Biochem*. 2018;87: 167–227.
15. Wallace DC. Colloquium paper: bioenergetics, the origins of complexity, and the ascent of man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107 Suppl 2: 8947–8953.
16. Ng YS, Lim AZ, Panagiotou G, Turnbull DM, Walker M. Endocrine Manifestations and New Developments in Mitochondrial Disease. *Endocr Rev*. 2022;43: 583–

609.

17. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482: 426–431.
18. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun.* 2020;11: 102.
19. Labow BI, Souba WW. Glutamine. *World J Surg.* 2000;24: 1503–1513.
20. Ma Y, Temkin SM, Hawkrigde AM, Guo C, Wang W, Wang X-Y, et al. Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer. *Cancer Lett.* 2018;435: 92–100.
21. Yang C, Ko B, Hensley CT, Jiang L, Wasti AT, Kim J, et al. Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol Cell.* 2014;56: 414–424.
22. Rani V, Yadav UCS. *Free Radicals in Human Health and Disease.* 2014.
23. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010;44: 479–496.
24. Jin P, Jiang J, Zhou L, Huang Z, Nice EC, Huang C, et al. Mitochondrial adaptation in cancer drug resistance: prevalence, mechanisms, and management. *J Hematol Oncol.* 2022;15: 97.
25. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12: 685–698.
26. Chen M-M, Li Y, Deng S-L, Zhao Y, Lian Z-X, Yu K. Mitochondrial Function and Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Skeletal Muscle. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10: 826981.
27. Nicholls DG, Chalmers S. The integration of mitochondrial calcium transport and storage. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36: 277–281.
28. Sterea AM, El Hiani Y. The Role of Mitochondrial Calcium Signaling in the Pathophysiology of Cancer Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1131: 747–770.
29. Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96: 13807–13812.
30. Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Rimessi A, Wieckowski MR, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium.* 2018;69: 62–72.
31. Williams GSB, Boyman L, Lederer WJ. Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78: 35–45.
32. Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death. *Essays Biochem.* 2010;47: 99–114.

33. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* 2013;23: 620–633.
34. *Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer.* International Review of Cell and Molecular Biology. Academic Press; 2016. pp. 43–87.
35. Denecker G, Vercammen D, Steemans M, Vanden Berghe T, Brouckaert G, Van Loo G, et al. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ.* 2001;8: 829–840.
36. Ju E, Park KA, Shen H-M, Hur GM. The resurrection of RIP kinase 1 as an early cell death checkpoint regulator—a potential target for therapy in the necroptosis era. *Exp Mol Med.* 2022;54: 1401–1411.
37. Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 2010;17: 922–930.
38. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21: 85–100.
39. Zhang Y, Su SS, Zhao S, Yang Z, Zhong C-Q, Chen X, et al. RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. *Nat Commun.* 2017;8: 14329.
40. Yang Z, Wang Y, Zhang Y, He X, Zhong C-Q, Ni H, et al. RIP3 targets pyruvate dehydrogenase complex to increase aerobic respiration in TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol.* 2018;20: 186–197.
41. van Gisbergen MW, Voets AM, Starmans MHW, de Coo IFM, Yadak R, Hoffmann RF, et al. How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. *Mutat Res - Rev Mut Res.* 2015;764: 16–30.
42. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410: 103–123.
43. Hönigova K, Navratil J, Peltanova B, Polanska HH, Raudenska M, Masarik M. Metabolic tricks of cancer cells. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2022;1877: 188705.
44. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123: 309–314.
45. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989;49: 6449–6465.
46. Soga T. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci.* 2013;104: 275–281.
47. Chan DA, Sutphin PD, Yen S-E, Giaccia AJ. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol.*

2005;25: 6415–6426.

48. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*. 2009;29: 2570–2581.
49. Lee K, Roth RA, LaPres JJ. Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol Ther*. 2007;113: 229–246.
50. Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet*. 2005;14: 2231–2239.
51. Yeung SJ, Pan J, Lee M-H. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65: 3981–3999.
52. Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313: 459–465.
53. Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal M, Tanson K, Philp N, Curry J, et al. Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Semin Oncol*. 2017;44: 198–203.
54. Hsu C-C, Tseng L-M, Lee H-C. Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Exp Biol Med*. 2016;241: 1281–1295.
55. Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, et al. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria. *Cell*. 2010;142: 270–283.
56. Marchi S, Lupini L, Patergnani S, Rimessi A, Missiroli S, Bonora M, et al. Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. *Curr Biol*. 2013;23: 58–63.
57. Weisthal S, Keinan N, Ben-Hail D, Arif T, Shoshan-Barmatz V. Ca<sup>2+</sup>-mediated regulation of VDAC1 expression levels is associated with cell death induction. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843: 2270–2281.
58. Um H-D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget*. 2016;7: 5193–5203.
59. Del Bufalo D, Biroccio A, Leonetti C, Zupi G. Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB J*. 1997;11: 947–953.
60. Choi J, Choi K, Benveniste EN, Rho SB, Hong Y-S, Lee J-H, et al. Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res*. 2005;65: 5554–5560.
61. Boulton DP, Caino MC. Mitochondrial Fission and Fusion in Tumor Progression

- to Metastasis. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10: 849962.
62. Fung TS, Chakrabarti R, Higgs HN. Publisher Correction: The multiple links between actin and mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023;24: 688.
  63. Kleele T, Rey T, Winter J, Zaganelli S, Mahecic D, Perreten Lambert H, et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature.* 2021;593: 435–439.
  64. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 2008;27: 433–446.
  65. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol.* 2018;28: R170–R185.
  66. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem.* 2003;72: 291–336.
  67. Minguéz P, Parca L, Diella F, Mende DR, Kumar R, Helmer-Citterich M, et al. Deciphering a global network of functionally associated post-translational modifications. *Mol Syst Biol.* 2012;8: 599.
  68. Gil J, Ramírez-Torres A, Encarnación-Guevara S. Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. *Journal of Proteomics.* 2017. pp. 297–309. doi:10.1016/j.jprot.2016.10.003
  69. Alonso-Bastida R, Encarnación-Guevara S. Proteomic insights into lysine acetylation and the implications for medical research. *Expert Rev Proteomics.* 2019;16: 1–3.
  70. Ali I, Conrad RJ, Verdin E, Ott M. Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics. *Chem Rev.* 2018;118: 1216–1252.
  71. Narita T, Weinert BT, Choudhary C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20: 156–174.
  72. Wagner GR, Mark Payne R. Widespread and Enzyme-independent Nε-Acetylation and Nε-Succinylation of Proteins in the Chemical Conditions of the Mitochondrial Matrix\*. *Journal of Biological Chemistry.* 2013. pp. 29036–29045. doi:10.1074/jbc.m113.486753
  73. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1864: 1372–1401.
  74. Anderson KA, Hirschey MD. Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism. *Essays in Biochemistry.* 2012. pp. 23–35. doi:10.1042/bse0520023
  75. Torrens-Mas M, Oliver J, Roca P, Sastre-Serra J. SIRT3: Oncogene and Tumor Suppressor in Cancer. *Cancers.* 2017. p. 90. doi:10.3390/cancers9070090
  76. Stram AR, Payne RM. Post-translational modifications in mitochondria: protein

- signaling in the powerhouse. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73: 4063–4073.
77. Baeza J, Smallegan MJ, Denu JM. Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2016;41: 231–244.
  78. Chen Y, Fu LL, Wen X, Wang XY, Liu J, Cheng Y, et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death & Disease.* 2014. pp. e1047–e1047. doi:10.1038/cddis.2014.14
  79. Ouyang S, Zhang Q, Lou L, Zhu K, Li Z, Liu P, et al. The Double-Edged Sword of SIRT3 in Cancer and Its Therapeutic Applications. *Front Pharmacol.* 2022;13: 871560.
  80. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71: 209–249.
  81. Li X, Liu M, Liu H, Chen J. Tumor metabolic reprogramming in lung cancer progression. *Oncol Lett.* 2022;24: 287.
  82. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83: 584–594.
  83. Cao K, Chen Y, Zhao S, Huang Y, Liu T, Liu H, et al. Sirt3 Promoted DNA Damage Repair and Radioresistance Through ATM-Chk2 in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *J Cancer.* 2021;12: 5464–5472.
  84. Xiong Y, Wang M, Zhao J, Wang L, Li X, Zhang Z, et al. SIRT3 is correlated with the malignancy of non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2017;50: 903–910.
  85. Xiong Y, Wang L, Wang S, Wang M, Zhao J, Zhang Z, et al. SIRT3 deacetylates and promotes degradation of P53 in PTEN-defective non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018;144: 189–198.
  86. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med.* 2004;23: 1111–1130.
  87. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA.* 2019;321: 288–300.
  88. Finley LWS, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 $\alpha$  destabilization. *Cancer Cell.* 2011;19: 416–428.
  89. Pinterić M, Podgorski II, Hadžija MP, Filić V, Paradžik M, Proust BLJ, et al. Sirt3 Exerts Its Tumor-Suppressive Role by Increasing p53 and Attenuating Response to Estrogen in MCF-7 Cells. *Antioxidants (Basel).* 2020;9. doi:10.3390/antiox9040294
  90. Desouki MM, Doubinskaia I, Gius D, Abdulkadir SA. Decreased mitochondrial SIRT3 expression is a potential molecular biomarker associated with poor

outcome in breast cancer. *Hum Pathol.* 2014;45: 1071–1077.

91. Hansen BK, Gupta R, Baldus L, Lyon D, Narita T, Lammers M, et al. Analysis of human acetylation stoichiometry defines mechanistic constraints on protein regulation. *Nat Commun.* 2019;10: 1055.
92. Baeza J, Dowell JA, Smallegan MJ, Fan J, Amador-Noguez D, Khan Z, et al. Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome. *J Biol Chem.* 2014;289: 21326–21338.
93. Gil J, Ramírez-Torres A, Chiappe D, Luna-Peñaloza J, Fernandez-Reyes FC, Arcos-Encarnación B, et al. Lysine acetylation stoichiometry and proteomics analyses reveal pathways regulated by sirtuin 1 in human cells. *J Biol Chem.* 2017;292: 18129–18144.
94. Gil J, Encarnación-Guevara S. Lysine Acetylation Stoichiometry Analysis at the Proteome Level. *Methods Mol Biol.* 2022;2420: 73–86.
95. Fernández-Coto DL, Gil J, Ayala G, Encarnación-Guevara S. Dynamics of Mitochondrial Proteome and Acetylome in Glioblastoma Cells with Contrasting Metabolic Phenotypes. *Int J Mol Sci.* 2024;25. doi:10.3390/ijms25063450
96. Garcia-Moreno A, López-Domínguez R, Villatoro-García JA, Ramirez-Mena A, Aparicio-Puerta E, Hackenberg M, et al. Functional Enrichment Analysis of Regulatory Elements. *Biomedicines.* 2022;10. doi:10.3390/biomedicines10030590
97. Zhang J, Xiang H, Liu J, Chen Y, He R-R, Liu B. Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics.* 2020;10: 8315–8342.
98. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics.* 2007;8: 118–127.
99. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol.* 2011;85: 241–272.
100. Agledal L, Niere M, Ziegler M. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Rep.* 2010;15: 2–10.
101. Chowdhry S, Zanca C, Rajkumar U, Koga T, Diao Y, Raviram R, et al. NAD metabolic dependency in cancer is shaped by gene amplification and enhancer remodelling. *Nature.* 2019;569: 570–575.
102. Griffiths HBS, Williams C, King SJ, Allison SJ. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>): essential redox metabolite, co-substrate and an anti-cancer and anti-ageing therapeutic target. *Biochem Soc Trans.* 2020;48: 733–744.
103. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell.* 2005;123: 437–448.

104. Yuan J, Minter-Dykhouse K, Lou Z. A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J Cell Biol.* 2009;185: 203–211.
105. Park JS, Lee S, Jeong AL, Han S, Ka HI, Lim J-S, et al. Hypoxia-induced IL-32 $\beta$  increases glycolysis in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2015;356: 800–808.
106. Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, Ingels JF, Jensen LC, Smith KD, et al. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14: R6.
107. Lunetti P, Di Giacomo M, Vergara D, De Domenico S, Maffia M, Zara V, et al. Metabolic reprogramming in breast cancer results in distinct mitochondrial bioenergetics between luminal and basal subtypes. *FEBS J.* 2019;286: 688–709.
108. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003;278: 36027–36031.
109. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life.* 2001;52: 159–164.
110. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem.* 2000;275: 25130–25138.
111. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 2005;1: 401–408.
112. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3: 4–10.
113. Necroptosis and Cancer. *Trends Cancer Res.* 2017;3: 294–301.
114. Banushi B, Joseph SR, Lum B, Lee JJ, Simpson F. Endocytosis in cancer and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2023;23: 450–473.
115. Schrock MS, Stromberg BR, Scarberry L, Summers MK. APC/C ubiquitin ligase: Functions and mechanisms in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* 2020;67: 80–91.
116. Greil C, Engelhardt M, Wäsch R. The Role of the APC/C and Its Coactivators Cdh1 and Cdc20 in Cancer Development and Therapy. *Front Genet.* 2022;13: 941565.
117. Sorkin A, von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10: 609–622.
118. Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep.* 2020;47: 4587–4629.

119. Huang J, Zhang L, Wan D, Zhou L, Zheng S, Lin S, et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6: 153.
120. Schaefer PM, Scherer Alves L, Lvova M, Huang J, Rathi K, Janssen K, et al. Combination of common mtDNA variants results in mitochondrial dysfunction and a connective tissue dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119: e2212417119.
121. Tsai C-W, Liu T-Y, Chao F-Y, Tu Y-C, Rodriguez MX, Van Keuren AM, et al. Evidence supporting the MICU1 occlusion mechanism and against the potentiation model in the mitochondrial calcium uniporter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;120: e2217665120.
122. De Mario A, D'Angelo D, Zanotti G, Raffaello A, Mammucari C. The mitochondrial calcium uniporter complex-A play in five acts. *Cell Calcium.* 2023;112: 102720.
123. Shoshan-Barmatz V, Mizrahi D. VDAC1: from structure to cancer therapy. *Front Oncol.* 2012;2: 164.
124. Chang Y, Wang C, Zhu J, Zheng S, Sun S, Wu Y, et al. SIRT3 ameliorates diabetes-associated cognitive dysfunction via regulating mitochondria-associated ER membranes. *J Transl Med.* 2023;21: 494.
125. SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 2014;76: 163–172.
126. Sargazi Z, Yazdani Y, Tahavvori A, Youshanlouei HR, Alivirdiloo V, Beilankouhi EAV, et al. NFR2/ABC transporter axis in drug resistance of breast cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2023;50: 5407–5414.
127. Wang G, Wang H, Zhang C, Liu T, Li Q, Lin X, et al. Rac3 regulates cell proliferation through cell cycle pathway and predicts prognosis in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 2016;37: 12597–12607.
128. An J, Shi J, He Q, Lui K, Liu Y, Huang Y, et al. CHCM1/CHCHD6, novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem.* 2012;287: 7411–7426.
129. Chen G, Luo Y, Warncke K, Sun Y, Yu DS, Fu H, et al. Acetylation regulates ribonucleotide reductase activity and cancer cell growth. *Nat Commun.* 2019;10: 3213.
130. Spang A. Retrograde traffic from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5. doi:10.1101/cshperspect.a013391
131. The Assembly Factor SDHAF2 Is Dispensable for Flavination of the Catalytic Subunit of Mitochondrial Complex II in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2016;291: 21414–21420.
132. Van Vranken JG, Bricker DK, Dephoure N, Gygi SP, Cox JE, Thummel CS, et

- al. SDHAF4 promotes mitochondrial succinate dehydrogenase activity and prevents neurodegeneration. *Cell Metab.* 2014;20: 241–252.
133. Wang X, Zhang X, Cao K, Zeng M, Fu X, Zheng A, et al. Publisher Correction: Cardiac disruption of SDHAF4-mediated mitochondrial complex II assembly promotes dilated cardiomyopathy. *Nat Commun.* 2022;13: 4690.
134. Rasam S, Lin Q, Shen S, Straubinger RM, Qu J. Highly Reproducible Quantitative Proteomics Analysis of Pancreatic Cancer Cells Reveals Proteome-Level Effects of a Novel Combination Drug Therapy That Induces Cancer Cell Death via Metabolic Remodeling and Activation of the Extrinsic Apoptosis Pathway. *J Proteome Res.* 2023;22: 3780–3792.
135. Stracker TH, Roig I, Knobel PA, Marjanović M. The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet.* 2013;4: 37.
136. Lee J-H, Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science.* 2004;304: 93–96.
137. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2003;10: 76–100.
138. Xiao K, Jiang J, Wang W, Cao S, Zhu L, Zeng H, et al. Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013;30: 1323–1328.
139. Zhao J, Lin X, Meng D, Zeng L, Zhuang R, Huang S, et al. Nrf2 Mediates Metabolic Reprogramming in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2020;10: 578315.
140. Chen P-H, Cai L, Huffman K, Yang C, Kim J, Faubert B, et al. Metabolic Diversity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Mol Cell.* 2019;76: 838–851.e5.
141. Nagaraj NS, Singh OV, Merchant NB. Proteomics: a strategy to understand the novel targets in protein misfolding and cancer therapy. *Expert Rev Proteomics.* 2010;7: 613–623.
142. Giralt A, Villarroya F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J.* 2012;444: 1–10.
143. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 2005;10: 1881–1896.
144. Li Y, Zou L, Li Q, Haibe-Kains B, Tian R, Li Y, et al. Amplification of LAPT4B and YWHAZ contributes to chemotherapy resistance and recurrence of breast cancer. *Nat Med.* 2010;16: 214–218.
145. Lombardo Y, Filipović A, Molyneux G, Periyasamy M, Giamas G, Hu Y, et al. Nicastrin regulates breast cancer stem cell properties and tumor growth in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109: 16558–16563.
146. Filipović A, Gronau JH, Green AR, Wang J, Vallath S, Shao D, et al. Biological

and clinical implications of nicastrin expression in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125: 43–53.

147. Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2: 877–886.
148. Gasparian AV, Burkhart CA, Purmal AA, Brodsky L, Pal M, Saranadasa M, et al. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF- $\kappa$ B and activate p53 by targeting FACT. *Sci Transl Med.* 2011;3: 95ra74.
149. Tixeira R, Phan TK, Caruso S, Shi B, Atkin-Smith GK, Nedeva C, et al. ROCK1 but not LIMK1 or PAK2 is a key regulator of apoptotic membrane blebbing and cell disassembly. *Cell Death Differ.* 2019;27: 102–116.
150. Robertson FM, Petricoin EF Iii, Van Laere SJ, Bertucci F, Chu K, Fernandez SV, et al. Presence of anaplastic lymphoma kinase in inflammatory breast cancer. *Springerplus.* 2013;2: 497.
151. Siraj AK, Beg S, Jehan Z, Prabhakaran S, Ahmed M, R Hussain A, et al. ALK alteration is a frequent event in aggressive breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2015;17: 127.