



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones

Isoenzimas Glutaminasa en la Terapia Metabólica del Cáncer

*Glutaminase Isoenzymes in the Metabolic Therapy of
Cancer*

Juan De los Santos Jiménez

Programa de Doctorado de Biotecnología Avanzada

Director:

José Manuel Matés Sánchez

Málaga, 2023

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Juan De los Santos Jiménez

 <https://orcid.org/0000-0003-3495-047X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D. JUAN DE LOS SANTOS JIMÉNEZ

Estudiante del programa de Doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor en la Universidad de Málaga, titulada: ISOENZIMAS GLUTAMINASA EN LA TERAPIA METABÓLICA DEL CÁNCER.

Realizada bajo la tutorización de JOSÉ MANUEL MATÉS SÁNCHEZ, y bajo la dirección de JOSÉ MANUEL MATÉS SÁNCHEZ

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 26 de Julio de 2023.

Fdo.: JUAN DE LOS SANTOS JIMÉNEZ Doctorando	Fdo.: JOSÉ MANUEL MATÉS SÁNCHEZ Tutor de la tesis
Fdo.: JOSÉ MANUEL MATÉS SÁNCHEZ Director de tesis	



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Don JOSÉ MANUEL MATÉS SÁNCHEZ, catedrático del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga

Certifica

Que D. JUAN DE LOS SANTOS JIMÉNEZ, graduado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado la presente Tesis Doctoral bajo su dirección, titulada: “Isoenzimas Glutaminasa en la Terapia Metabólica del Cáncer”, en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga.

Que revisado el trabajo, considera que reúne el contenido científico suficiente y las condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el correspondiente Tribunal, optando además a la mención de Doctor Internacional.

Para que conste, a efecto de lo establecido en el Real Decreto Regulador de los estudios de Tercer Ciclo-Doctorado RD99/2011, modificado por los Reales Decretos 534/2013, 43/2015 Y 195/2016, AUTORIZA la presentación de la mencionada Tesis Doctoral en la Universidad de Málaga.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones

D. JOSÉ MANUEL MATÉS SÁNCHEZ, director de la presente Tesis Doctoral, titulada “Isoenzimas Glutaminasa en la Terapia Metabólica del Cáncer”

INFORMA

Que el doctorando JUAN DE LOS SANTOS JIMÉNEZ ha realizado la presente Tesis Doctoral bajo su tutorización y dirección en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga.

Que la presente Tesis Doctoral está avalada por las siguientes publicaciones obtenidas durante el desarrollo de la Tesis Doctoral, publicadas en revistas de prestigio en nuestra área de investigación y que no han sido presentadas en otras Tesis Doctorales:

De Los Santos-Jiménez J, Campos-Sandoval JA, Márquez-Torres C, Urbano-Polo N, Brøndegaard D, Martín-Rufián M, Lobo C, Peñalver A, Gómez-García MC, Martín-Campos J, Cardona C, Castilla L, da Costa Souza F, Cheng T, Segura JA, Alonso FJ, Curi R, Colquhoun A, DeBerardinis RJ, Márquez J, Matés JM. Glutaminase isoforms expression switches microRNA levels and oxidative status in glioblastoma cells. *J Biomed Sci.* 2021 Feb 20;28(1):14. doi: 10.1186/s12929-021-00712-y.

De Los Santos-Jiménez J, Rosales T, Ko B, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Márquez J, DeBerardinis RJ, Matés JM. Metabolic Adjustments following Glutaminase Inhibition by CB-839 in Glioblastoma Cell Lines. *Cancers (Basel).* 2023 Jan 15;15(2):531. doi: 10.3390/cancers15020531.

Matés JM, Campos-Sandoval JA, De Los Santos-Jiménez J, Márquez J. Dysregulation of glutaminase and glutamine synthetase in cancer. *Cancer Lett.* 2019 Dec 28;467:29-39. doi: 10.1016/j.canlet.2019.09.011.



Que en el caso de tercera y última publicación citada, en la que el doctorando figura como tercer autor, el doctorando ha sido expresamente autorizado por la Comisión Académica del Programa de Doctorado de Biotecnología Avanzada, al que pertenece, así como por la Comisión de Posgrado de la Universidad de Málaga, a utilizar dicha publicación como aval de la presente Tesis Doctoral, y por tanto, a que contribuya a la presentación de la misma por la modalidad de “Tesis por Compendio de Publicaciones”.

Que en consecuencia a todo lo expuesto anteriormente, la presente Tesis Doctoral cumple con los requisitos necesarios para ser presentada por la modalidad de “Tesis por Compendio de Publicaciones”.

Fdo. José Manuel Matés Sánchez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Biología Celular, Genética y Fisiología

Carmen R. Beuzón

CARMEN ROSARIO BEUZÓN LÓPEZ, Catedrática de Genética de la Universidad de Málaga y Coordinadora del Programa de Doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

INFORMA:

Que ante la situación expuesta por el alumno de doctorado Juan De los Santos Jiménez, en relación a la Escuela de Doctorado de la Universidad de Málaga, de poder presentar su tesis por compendio de publicaciones computándosele como tercera publicación la que se cita a continuación,

José Manuel Matés Sánchez; José Ángel Campos Sandoval; Juan De los Santos Jiménez; Javier Márquez Gómez. Dysregulation of glutaminase and glutamine synthetase in cancer. Cancer Letters. 467, pp. 29 - 39. ELSEVIER, 2019.

Y teniendo en cuenta las razones expuestas en su solicitud, la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biotecnología, considera apropiado que la publicación sea computada a fines del cumplimiento de los requisitos para el depósito de su tesis por compendio de publicaciones.

En Málaga, a 10 de mayo de 2023

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos s/n. 29071 Málaga.
Tlf. +34 95 213 1959 Fax: +34 95 213 2001 e-mail: cbeuzon@uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El doctorando, JUAN DE LOS SANTOS JIMÉNEZ, obtuvo una beca del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de Formación de Profesorado Universitario (FPU) en la convocatoria de 2017, con referencia FPU17/04084.

El trabajo de la presente Tesis Doctoral ha recibido financiación de los siguientes proyectos de investigación:

SAF-2015-64501-R del Ministerio de Economía y Competitividad

RTI2018-096866-B-I00 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades

UMA18-FEDERJA-082 de la Junta de Andalucía

JUAN DE LOS SANTOS JIMÉNEZ realizó una estancia de investigación de tres meses bajo la dirección del Prof. Ralph J. DeBerardinis en su laboratorio, en el Children's Research Institute de la University of Texas Southwestern Medical Center (UTSW) en Dallas, TX, USA. Durante la mencionada estancia, llevada a cabo entre los meses de septiembre y diciembre de 2021, el doctorando pudo aprender y utilizar la metodología del grupo receptor en la realización de estudios de metabolómica y trazado isotópico estable en los modelos de estudio utilizados en la presente Tesis Doctoral. El doctorando obtuvo para la realización de dicha estancia la beca de movilidad para estancias asociada al programa FPU del Ministerio de Universidades de España y la beca de movilidad del Instituto Biomédico de Málaga IBIMA-plataforma BIONAND.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

Me gustaría comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a mi director y tutor, José Manuel, con quién empezó mi travesía en el que hoy es mi grupo de investigación. Gracias por tu inestimable ayuda tanto en el ámbito académico como en lo personal, y por tu comprensión infinita y apoyo incondicional, en todo momento, desde el primer día.

Asimismo, deseo extender mi agradecimiento a los demás miembros de nuestro grupo de investigación, sin los cuales esta Tesis no sería la que es. Javier, tu liderazgo, perseverancia y vocación son un ejemplo para mí. A Francis, con el que tantas conversaciones y momentos de debate he compartido, tanto en el ámbito científico como fuera de él. A José Ángel, una persona excepcional, de mente brillante y con disposición incondicional para contribuir. A José Carlos Paz, gracias por tu constante interés y por los valiosos momentos y charlas científicas.

También deseo expresar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, con lo que tantísimas horas he compartido estos años. A Mamen, mi compañera en los buenos y malos momentos de esta Tesis, gracias por los momentos de reflexión compartida y tu inestimable ayuda. A Anabel, por estar siempre presente y con quien he compartido no solo investigación, sino también muchas horas de docencia. Vicky, siempre has aportado un toque de humor al laboratorio y recordaré con cariño todas las anécdotas de estos años, algunas de ellas peligrosas. También a Carolina Roza y a Merche por todos los ratos compartidos. Y cómo olvidar a Ana Peñalver, a pesar de no haber coincidido tanto tiempo como hubiera deseado, agradezco sinceramente tu guía durante mis primeros pasos en el laboratorio.

No puedo dejar de agradecer a Ralph DeBerardinis por acogerme en su laboratorio en Dallas durante mi estancia, brindándome la oportunidad de llevar a cabo investigación en un entorno verdaderamente excepcional. También quiero agradecer a todos los miembros de su laboratorio por su trato cercano. Especialmente, a Tracy, Bookyung y a Trevor, quienes me brindaron orientación y ayuda durante mi estancia con amabilidad y paciencia, y la hicieron mejor.

Además, deseo expresar mi agradecimiento a aquellos con quienes no he compartido laboratorio, pero sí innumerables horas en los espacios comunes del departamento y en el laboratorio de cultivos, así como fuera de ellos. A Paloma, la alegría personificada, te admiro. Mary, gracias por tantas conversaciones y por permitirme compartir inquietudes contigo. Alba y Clara, ¡cómo se echan de menos los momentos después del trabajo! Ana Dácil, Isa y Laura Castilla, gracias por el apoyo mutuo y por nuestros almuerzos de los viernes. Nieves, eres una persona inteligente y generosa. Y, por supuesto, al que hoy

considero uno de mis mejores amigos, José Antonio, un ser de luz verdadero, de generosidad sin límites. Hemos compartido intereses e innumerables horas de conversaciones sobre ciencia y más allá. Qué suerte haber coincidido contigo.

Y en el ámbito más personal, me gustaría agradecer de corazón a mis amigos, quienes me han ayudado a mantener el rumbo y han estado a mi lado en los mejores y peores momentos. A Casti, mi amigo desde hace ya 25 años. A Jesús, con quien tanto tengo en común. A Mauro, siempre en mi equipo. Yisus, Manu, Patri, Ángel, Mario, Carmen, Iván, Nahi, Nuria, Nieves, Ale...

Raquel, qué puedo decirte. Gracias por estar siempre, y por tu interés por todo. Los metabolitos se volvieron más interesantes contigo.

Por último, dar las gracias a toda mi familia, quienes siempre han estado ahí para mí. A mis padres y a mi hermana, para los que no existen palabras suficientes. Siempre han sido mi referencia y mi apoyo incondicional en cada paso que he dado. Gracias por inculcarme el valor del esfuerzo, por estar a mi lado y por sostenerme en los momentos difíciles. Si he logrado algo, ha sido gracias a vosotros.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice

Listado de abreviaturas	3
Summary	9
Introducción	25
1. Cáncer y Metabolismo	27
2. Reprogramación Metabólica	30
3. Metabolismo de la Glucosa en Cáncer	35
4. Reprogramación del Metabolismo de la Glutamina en Cáncer	43
5. Metabolismo Redox y Cáncer	53
6. Gliomas y Glioblastoma	63
7. Isoenzimas Glutaminasa	67
7.1. Isoenzimas Glutaminasa y Reprogramación Metabólica en Cáncer	71
7.2. Isoenzimas Glutaminasa como Diana Terapéutica en Cáncer	77
Hipótesis y Objetivos	84
Hypothesis and Aims	88
Material y Métodos	92
Resultados y Discusión	105
1. Dysregulation of Glutaminase and Glutamine Synthetase in Cancer	109
2. Glutaminase Isoforms Expression Switches microRNA Levels and Oxidative Status in Glioblastoma Cells	111
3. Metabolic Adjustments following Glutaminase Inhibition by CB-839 in Glioblastoma Cell Lines	114
4. Resultados no Publicados y Discusión	116
4.1. Modelos de Sobreexpresión GLS2 en LN229	118
4.2. Efecto de GLS2 sobre la Proliferación Celular y Tratamiento con Inhibidores de Glutaminasa	119
4.3. Trazado Isotópico con U- ¹³ C-Gln en Modelos con Sobreexpresión GLS2	123
4.4. Análisis Metabólico en Modelos con Sobreexpresión GLS2	129
4.5. Ensayo de Actividad Piruvato Deshidrogenasa (PDH)	144
Conclusiones	148
Conclusions	153
Bibliografía	158
Anexos	186
1. Metabolic Reprogramming of Cancer by Chemicals that Target Glutaminase Isoenzymes	188
2. Glutaminases Regulate Glutathione and Oxidative Stress in Cancer	190
3. Antioxidant Responses Related to Temozolomide Resistance in Glioblastoma	192



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Listado de abreviaturas

2-HG: 2-hidroxiglutarato

3MA: 3-metiladenina

3meLys: N, N, N-trimetil lisina

4-HNE: 4-hidroxinonenal

5-FU: 5-fluoro uracilo

ACC: Acetil-CoA carboxilasa

ACLY: ATP citrato liasa

ADP: Adenosina difosfato

AKT/PKB: Proteína quinasa B

ALL: Leucemia linfoblástica aguda

AMP: Adenosina monofosfato

ASNS: Asparagina sintetasa

AST: Aspartato transaminasa

ATP: Adenosina trifosfato

BCA: Ácido bicinconínico

BPTES: Bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro

BSA: Albúmina sérica bovina

BSO: L-butionina sulfoximina

CAD: Carbamoil fosfato sintetasa 2

CAT: Catalasa

CMP: Citidina monofosfato

DHAP: Dihidroxi acetona fosfato

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNMT: ADN metil transferasa

EATC: Células de carcinoma de ascitis de Ehrlich

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMT: Transición epitelio-mesénquima

ETC: Cadena de transporte de electrones

FASN: Ácido graso sintasa

FBS: Suero fetal bovino

FC: Veces de cambio (*Fold Change*)

FH: Fumarato hidratasa

G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GA: Glutaminasa

GAB: Transcrito e Isoenzima glutaminasa B

GAC: Transcrito e Isoenzima glutaminasa C

GBM: Glioblastoma

GC-MS: Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

GDH/GLUD: Glutamato deshidrogenasa

Gln: Glutamina

GLS: Isoenzima glutaminasa GLS

GLS2: Isoenzima glutaminasa GLS2

GMP: Guanosina monofosfato

GPD1: Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1

GPx: Glutatión peroxidasa

GR: Glutatión reductasa

GS: Glutamina sintetasa

GSH: Glutatión reducido

GSSG: Glutatión oxidado

HAT: Histona acetil transferasa

HCC: Carcinoma hepatocelular

HIF: Factor inducible por hipoxia

HMT: Histona metil transferasa

HRP: Peroxidasa de rábano

IC50: Concentración a la que se obtiene un 50% de inhibición

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

IMP: Inosina monofosfato

KGA: Transcrito e Isoenzima glutaminasa K, tipo riñón

LC-MS: Cromatografía líquida-Espectrometría de masas

LDH: Lactato deshidrogenasa

L-DON: 6-diazo-5-oxo L-norleucina

LGA: Transcrito e Isoenzima glutaminasa L, tipo hígado

LOOH: Hidroperóxido de lípido

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MCT1: Transportador de monocarboxilatos 1

MDA: Malondialdehído

ME: Enzima málica

MEM: Minimum Essential Medium

miR: micro ARN

MSO: L-metionina sulfoximina

mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos/mecanística (*Mammalian/Mechanistic Target Of Rapamycin*)

NADK: NAD quinasa

NRF2: Factor nuclear eritroide similar al factor 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

NSCLC: Cáncer de células de pulmón no pequeñas

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PBS: Tampón fosfato salino

PC: Piruvato carboxilasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDA: Adenocarcinoma ductal pancreático

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PDK: Piruvato deshidrogenasa quinasa

PDP: Piruvato deshidrogenasa fosfatasa

PDZ: Siglas de PSD95\Dlg\ZO1

PEPCK: Fosfoenol piruvato carboxiquinasa

PHGDH: Fosfoglicerato deshidrogenasa

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PK: Piruvato quinasa

PKC: Proteína quinasa C

POX: Prolina oxidasa

PP2A: Proteína fosfatasa 2A

PPP: Ruta de las pentosas fosfato

PRPP: Fosforribosil pirofosfato

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog* (Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa)

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

PYCR1: Pirrolina-5-carboxilato reductasa

Q-TOF: Cuadrupolo-tiempo de vuelo

RIPA: Radioimmunoprecipitation Assay

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-q-PCR/qRT-PCR: Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa

SAM: S-adenosil metionina

SDH: Succinato deshidrogenasa

SDS: Dodecil sulfato sódico

SOD: Superóxido dismutasa

TAC: Capacidad antioxidante total

TBARS: Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico

TBDMS: tert-butildimetilsilil éter

TBST: Tampón tris salino con Tween-20

TCA: ácidos tricarboxílicos

TMZ: Temozolomida

TNBC: Cáncer de mama triple negativo

UDP: Uridina difosfato

UMP: Uridina monofosfato

VHL: Von Hippel-Lindau

α -KG: Alfa-cetoglutarato (ó 2-oxoglutarato)

α -KGDH: α -KG deshidrogenasa



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Summary



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introduction

Cancer is nowadays considered as a set of pathologies that share common characteristics including the loss of homeostatic mechanisms controlling cell proliferation, implying the malignant transformation of normal cells to cancer cells. Cancer cells proliferate indiscriminately and will form a tumor, having the potentiality to metastasize and colonize new locations in the body, to form secondary tumors. Cancer cells have a series of acquired capabilities that differentiate them from normal cells and allow them to behave as they do. There are a lot of molecular alterations that can cause cancer or drive its development. However, mutations are a key factor since they can modulate gene function affecting many cellular processes. Certain mutations in oncogenes and tumor suppressor genes can promote cancer by overactivating or inactivating gene function, respectively. Hanahan and Weinberg described a series of hallmarks of cancer cells, that allow them to perform their activities. The number of hallmarks has been growing with the years, but nowadays metabolic reprogramming is widely considered as a hallmark of cancer, so it creates the conditions for the cancer cell to survive, growth, proliferate and metastasize (see Fig. 1; Hanahan, 2022). Metabolic reprogramming allows to adapt metabolism for the requirements of cancer cells, which may be variable. Cancer metabolism is characterized by its flexibility and adaptability, and normally cancer cells show convergent metabolic adaptations regarding the generalized need for increased energy generation, biosynthetic purposes, and protection against oxidative stress. The metabolic reprogramming may be caused by mutations disrupting the activity of oncogenes or tumor suppressor genes. For example, oncogenic MYC or KRAS are known to be capable of inducing metabolic changes in a cell autonomous fashion, since they regulate several critical steps of diverse pathways. However, there are also cases of tumors lacking mutations in known oncogenes or tumor suppressors that display a reprogrammed metabolism. This fact suggests that, sometimes, an initial metabolic perturbation may mimic the conditions of some known mutations to promote molecular alterations that drive oncogenesis, such as could be the example of succinate accumulation that leads to prolyl-hydroxylases inhibition causing HIF-1 α stabilization. This scenario mimics a situation of hypoxia, activating mutations in mTORC1 or inactivating mutations in VHL tumor suppressor. All of these may cause oncogenic changes, such as an hyperglycolytic phenotype.

Glucose Metabolism in Cancer

Glucose has been known for decades to be the most consumed nutrient in cancer, so its metabolism is normally reprogrammed in cancer cells. Otto Warburg observed almost a century ago that tumor slices showed increased glucose consumption compared to normal tissue. In 1956, he described the preference of tumors for aerobic glycolysis and lactate generation instead of the complete oxidation of glucose in the mitochondria for maximizing energy production, as it happens normally in healthy and differentiated tissues. This phenotype was called “The Warburg Effect”, and Warburg thought it was

Summary

the cause of malignancy, originated by dysfunctional mitochondria. Nowadays, it is known that most cancer cells have functional mitochondria and mitochondrial metabolism is needed for the cell to survive and proliferate. In normal differentiated cells, glycolytic pyruvate enters the mitochondria for generating Acetyl-CoA in the reaction catalyzed by pyruvate dehydrogenase (PDH). Acetyl-CoA may enter the Tricarboxylic Acid (TCA) cycle for complete oxidation of glucose carbon to CO₂ and concomitant generation of NADH and FADH₂, that will donate electrons to the Electron Transport Chain (ETC) for further ATP generation by ATP synthase, in the process of oxidative phosphorylation (OXPHOS). The Warburg Effect is increasingly being considered as a metabolic preference for proliferating cells. This is thought because although less efficient, it allows for fast ATP generation that may be advantageous in a situation of nutrient abundance and, most importantly, promotes higher levels of glycolytic intermediate metabolites that may serve as substrates for a set of biosynthetic pathways. Thus, more glycolytic intermediates can be redirected to biosynthetic pathways such as the pentose phosphate pathway (PPP) for generating NADPH, needed in multiple biosynthetic reactions, and ribose-5-phosphate, essential for nucleotide *de novo* biosynthesis (see Fig. 3, Pavlova and Thompson, 2016). In fact, some tumors show overexpression of key enzymes of the PPP and inactivating mutations in tumor suppressor p53 also promotes the pathway. Another glycolytic intermediate, dihydroxyacetone phosphate (DHAP), may be used for synthesizing glycerol-3-phosphate, needed for phospholipid biosynthesis. 3-Phosphoglycerate fuels the synthesis of nonessential amino acids serine and glycine, and thus works as a substrate for one carbon metabolism and NADPH synthesis. In fact, the rate-limiting enzyme in this pathway, phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), is overexpressed in several tumors. Oncogenes such as c-Myc promote this hyperglycolytic phenotype by inducing expression of proteins involved, like pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), lactate dehydrogenase A (LDH-A) or monocarboxylate transporter 1 (MCT1). PDK1 phosphorylates PDH to inhibit its activity, minimizing the flux from glucose to the TCA cycle. LDH-A reduces pyruvate to lactate, and MCT1 favors lactate transport out of the cell. Oncogenic TGF/β-catenin signaling promotes PDK1 and MCT1 expression, and hypoxic or oncogenic HIF-1α stabilization promotes glucose transporter GLUT1, PDK1 and LDH-A expression. Oncogenic signaling pathways also favor the expression in cancer cells of pyruvate kinase isoenzyme PKM2, which has lower activity than the normally expressed in adults, isoenzyme PKM1.

Along with glycolysis, the TCA cycle is another prominent pathway that provides a set of substrates for many biosynthetic pathways. Glucose and glutamine (Gln) are the two main anaplerotic substrates in cancer cells. Glucose-derived pyruvate may be carboxylated by pyruvate carboxylase (PC) to form oxaloacetate, an intermediate of the TCA cycle. On the other hand, Gln may serve to generate alpha-ketoglutarate (α-KG) which enters the TCA cycle.

Reprogramming of Glutamine Metabolism in Cancer

Gln is the most abundant amino acid in plasma, and it has been reported to be consumed by many tumors and by most cells cultured *in vitro*. Gln is a nonessential amino acid, and most tissues and cancer cells retain the capability to synthesize it. However, due to the requirements of cancer cells, Gln may behave in this context as a conditionally essential amino acid. In fact, Gln is the second nutrient most consumed by tumors after glucose, and there are tumors that depend on Gln, being called “glutamine-addicted”. Gln has in its structure two atoms of nitrogen, being a flexible nutrient since it may be a source of reduced carbon and nitrogen for energy production, biosynthesis and is also related to redox regulation. Besides, Gln is also known to have a role as a signaling molecule. Gln may enter the cell through its transporters, such as ASCT2, and once in the cytosol it may serve for protein synthesis, or act as a nitrogen donor by providing its amido group in the biosynthesis of purine and pyrimidine nucleotides, and hexosamines, in reactions catalyzed by amidotransferases, producing glutamate (Glu). In cells expressing the amino acid antiporter LAT1, Gln serves for the import of several nonessential and essential amino acids, including leucine. Moreover, Gln may enter the mitochondria where it can be substrate of glutaminases (GAs). GAs catalyze the oxidative deamidation of Gln to produce free ammonia and Glu. GAs catalyze the first step in glutaminolysis and are commonly overexpressed in cancer. Gln-derived Glu may follow several metabolic fates. Glu may participate in transamination reactions in which the amino group of Glu is transferred by aminotransferase enzymes to a α -ketoacid acceptor, to form a nonessential amino acid (such as aspartate, alanine, or serine) and α -KG. Glu-derived α -KG may also be generated by the reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase (GDH), which releases the amino group as free ammonia and generates NADH. In any case, α -KG is a metabolic intermediate of the TCA cycle and may follow oxidation reactions for ATP generation by OXPHOS. Gln-derived α -KG may follow the TCA cycle to generate oxaloacetate, which may act as an amino group acceptor to form the nonessential amino acid aspartate, reaction in which Gln-derived Glu may also be involved. Aspartate may further accept the amido group of Gln to synthesize asparagine. In fact, Gln can favor nucleotide biosynthesis not only by acting as an amido donor, but also by promoting aspartate biosynthesis, which is essential in the biosynthesis of both, purines and pyrimidines. A synthesis of Gln metabolism is depicted in Fig. 5 (Matés et al., 2020b).

Glu might also participate in the biosynthesis of glutathione (GSH), the most abundant antioxidant in the cell. GSH is a tripeptide composed by Glu, cysteine, and glycine. Glu has an important role here because it also serves for importing cysteine (in the form of the oxidized dimer cystine) to the cell, by the antiporting system xCT, which is commonly upregulated in tumors.

Summary

Gln metabolism is frequently reprogrammed in cancer cells. The oncogene c-Myc is an important coordinator of glucose and Gln metabolism, and it promotes Gln import to the cell by upregulating ASCT2, and the first enzymes implied in its metabolism, GAs (GLS isoenzymes) and carbamoyl phosphate synthase II (CAD), a cytosolic enzymatic complex that use Gln as an amido donor in pyrimidine *de novo* biosynthesis. Oncogenic signaling from EGFR promotes ASCT2 translocation to the cell membrane, and inactivating mutations in Rb tumor suppressor promote ASCT2 and GLS expression.

In fact, Gln-derived α -KG may serve for citrate synthesis by a non-canonical reductive carboxylation reaction catalyzed by isocitrate dehydrogenases (IDH1/2). Citrate can be exported to the cytosol to generate cytosolic acetyl-CoA which may serve for lipid biosynthesis or as an acetyl group donor in acetylation reactions. Hypoxic conditions, oncogenic EGFR signaling or inactivating mutations in VHL tumor suppressor induce reductive carboxylation. Gln metabolism may impact epigenetics by producing acetyl-CoA and, importantly, α -KG. Acetyl-CoA may participate in histone acetylation reactions, while α -KG is a substrate for α -KG dependent dioxygenases. This group of dioxygenases includes enzymes involved in demethylation reactions, like the TET family of DNA hydroxylases, the Jumonji C family of histone demethylases, RNA demethylases and prolyl-hydroxylases, the latter regulating the levels of HIF-1 α . These enzymes oxidize α -KG to succinate and may be inhibited because of structural similarity with its substrate by succinate, fumarate and the oncometabolite 2-hydroxiglutarate (2-HG) (See Fig. 7, Pavlova et al., 2022).

Redox Metabolism and Cancer

The accelerated metabolism of cancer cells leads to an increased rate of reactive oxygen species (ROS) formation. ROS are molecules derived from oxygen capable of oxidizing cell components. ROS include superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) and lipid peroxides (LOOH). Most cellular ROS derive from $O_2^{\cdot-}$, which may be passively generated by the activity of the ETC or actively produced by NADPH oxidases. Superoxide dismutases (SOD) enzymes catalyze the conversion of two molecules of $O_2^{\cdot-}$ into H_2O_2 and water. H_2O_2 may react with free Fe^{2+} to produce $\cdot OH$ by the Fenton reaction. $\cdot OH$ may cause lipid peroxidation by its reaction with polyunsaturated fatty acids. These processes are involved in ferroptosis, a type of iron-dependent cell death. However, ROS not only cause indiscriminate oxidative damage to cell molecular components, but also have a role in cell signaling and homeostatic regulation, which is mostly carried out by H_2O_2 . H_2O_2 has characteristics that allow it to perform specific and regulated oxidation events, acting mainly by oxidizing accessible cysteine residues in proteins to alter their function. H_2O_2 is known to promote oncogenesis by regulating several signaling pathways, like its indirect activation of the PI3K/AKT pathway by oxidizing and inactivating phosphatases that negatively regulate the pathway, like phosphatase and tensin homolog (PTEN), protein phosphatase 2 (PP2A)

or protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), among others. ROS are also able to stabilize HIF α subunits. All these activities of ROS may induce a reprogramming of metabolism.

Since cancer cells have a higher rate of ROS production and oxidative stress, and given the fact that ROS may favor prooncogenic molecular changes, cancer cells need to tightly regulate the redox balance to maintain optimal levels of ROS for the cell's activities (see Fig. 8, Sullivan and Chandel, 2014). Tumor cells rely on upregulated antioxidant systems to this end, and they normally upregulate the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), a master regulator of the antioxidant response. Oncogenes like KRAS, B-RAF or c-Myc induce NRF2 overexpression. NRF2 favors the expression of multiple proteins involved in antioxidant function, like glutathione peroxidase 4 (GPX4), GSH biosynthesis genes, xCT transporter or proteins involved in NADPH biosynthesis, which is needed to recycle antioxidant proteins and cofactors.

Gliomas and Glioblastoma

Gliomas account for the most common malignancy affecting the central nervous system, among them, glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and lethal type, characterized by high invasiveness, proliferation rates, resistance to apoptosis and short survival times. New therapeutic options are needed, given that the only chemotherapeutic treatment that has shown some modest effectiveness is the alkylating agent temozolomide (TMZ), also known for inducing oxidative stress. However, resistance to TMZ usually develops and compromise efficacy, which has been related to upregulation of antioxidant defenses. Multiple combination treatments are being assayed with TMZ in clinical studies looking to improve efficacy. In IDH-mutant glioblastomas, IDH causes the accumulation of the oncometabolite D-2-hydroxyglutarate (D-2-HG), which impairs α -KG-dependent dioxygenase function leading to an hypermethylated phenotype. On the other hand, Gln metabolism is commonly reprogrammed in GBM, and GAs (GLS isoenzymes) are usually overexpressed, as well as the antiporter xCT. In a set of GBMs, Gln import and GA function favors intracellular generation of Glu, which among other things promotes antioxidant defense by both direct providing of Glu for GSH synthesis, and export of Glu coupled to cystine import. In fact, translocation of Glu to the extracellular space usually causes excitotoxicity to the surrounding normal tissue by overactivating the NMDA receptor, which leads to cell death and benefits tumor growth. Given the flexibility of Gln metabolism and its role in favoring antioxidant capacity, therapies targeting Gln metabolism are being assessed in combination with TMZ, including a combination of TMZ and a GA (GLS) inhibitor called CB-839.

Glutaminase Isoenzymes

GAs catalyze oxidative deamidation of Gln to Glu and ammonia. In humans, two genes code for GAs: *GLS* and *GLS2*. *GLS* encodes two isoforms arising by alternative splicing, named KGA and GAC, and both are referred to as GLS isoenzymes. *GLS2* encodes two

Summary

isoenzymes: the canonical GAB isoform, and LGA, the latter originated by an alternative transcription start site, and both isoforms are referred to as GLS2 isoenzymes (see Fig. 13, Campos-Sandoval et al., 2015). GLS and GLS2 share high sequence homology in the GA domains, but lower in the N and C-terminal regions, which has been related to differential subcellular location and protein-protein interactions. In fact, GLS2 shows a PDZ recognition domain in its C-terminal region. Besides, a nuclear localization of GLS2 has been reported, which may suggest that GAs perform functions beyond their catalytic role in the mitochondria.

GA isoenzymes also differ in their kinetics and expression patterns: while GLS is expressed ubiquitously, GLS2 expression is more specific, being restricted to the liver, brain, pancreas and a few more tissues. Their role in cancer is also variable. GLS is commonly considered as a prooncogenic factor, since it is usually overexpressed in cancer cells compared to the normal ones, especially the GAC isoform. GLS expression is induced by oncogenes such as c-Myc, which acts indirectly by targeting its negative regulators miR23a/b. Several other miRNAs have been characterized as negative regulators of GLS, and are downregulated in different types of cancer, including miR 153, miR 1-3p, miR 137, miR 513c, miR 122 and miR 203. Additionally, oncogene c-Jun induces GLS expression, and oncogenic signaling mediated by NF- κ B and EGFR-MAPK cause GLS phosphorylation to boost its activity.

GLS2 isoenzymes appear to have a more complicated role in cancer, having been associated with context-dependent tumor suppression properties. GLS2 expression is silenced in some cancers. In GBM, GLS2 is usually silenced by promoter hypermethylation while GLS is overexpressed. In fact, GLS2 expression is directly induced by tumor suppressor p53, and by p63 and p73. GLS2 function has been related to lower activation of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma (HCC) and GBM models. In GBM cells, GLS2 expression was associated with lower proliferation capacity and its effect on PI3K/AKT downregulation increased sensitivity to oxidative damage and TMZ treatment. GLS2 expression has been also related to lower metastatic capacity by binding and inactivating Rac1. GLS2 also appears to have a role in epigenetic regulation as it binds to Dicer to stabilize it, favoring miR 34a maturation and Snail repression. However, there are also examples where GLS2 is overexpressed in cancer and has been assigned an oncogenic role. Hence, in neuroblastoma, GLS2 expression was induced by oncogene n-Myc and related to cell proliferation. In cervical cancers, GLS2 expression increased radiotherapy resistance, and in luminal subtype breast cancer cell lines and tumors, GLS2 overexpression was induced by GATA3 and related to cell proliferative capacity (see Fig. 14).

Since GAs expression and function are commonly altered in cancer, the search and use of inhibitors of their activity has been of interest. GA inhibitors are thought to potentially improve efficacy of treatments, especially in combination with other classic or targeted treatments. Nowadays there are two main types of inhibitors: Gln analogs and allosteric

inhibitors. Gln analogs such as L-DON, acivicin and azaserin were tried decades ago and showed efficacy, but also high toxicity, since they lack selectivity and inhibit not only GAs but also amidotransferases. In the last years, JHU-083, a prodrug for L-DON was found. JHU-083 showed efficacy and minimize toxicity since it is administered as an inactive form and is activated in the tumor microenvironment. On the other hand, allosteric inhibitors bind to GAs monomers and prevent the formation of an active tetramer. BPTES is an allosteric inhibitor of GLS and stabilizes the formation of an inactive tetramer. However, BPTES was poorly soluble and showed modest inhibitory capacity. A derivative of BPTES, named CB-839 was later developed and showed much higher inhibitory capacity and solubility, being orally bioavailable. CB-839 showed important antitumor efficacy in several cell models and has been assayed in clinical trials in combination with diverse treatments, including the tyrosine kinase inhibitor cabozantinib in renal cell carcinoma and TMZ in GBM. However, results showed no improvement in these combined treatments compared to monotherapy without CB-839. Nevertheless, CB-839 has shown efficacy in combination treatments in some contexts. For example, its combination with thymidylate synthase inhibitor 5-fluoro uracil showed improved efficacy in colorectal cancer models only in the cases that cells have mutated *PIK3CA*. Consequently, it remains important to find molecular signatures indicating CB-839 potential efficacy.

Compound 968 is another allosteric inhibitor that acts by binding between two GA monomers, preventing oligomerization. 968 has been shown to inhibit both GLS and GLS2 isoenzymes but has lower inhibitory potential than CB-839. For GLS2 specific inhibitors, only alkyl benzoquinones have shown relevant inhibitory capacity and specificity. Compound AV-1 is nowadays the most promising of these compounds, showing antitumor efficacy in HCC and lung tumor cell lines.

The present PhD thesis has been focused in studying the differential functions of GA isoenzymes in cancer, particularly in GBM. Genetically modified GBM cell lines cultured *in vitro* for altering GA isoenzyme expression or treated pharmacologically to target their activity were used as study models. The models were employed for analyzing GA isoenzyme function on cell metabolism, redox balance and antioxidant defenses, as well as in miRNA regulation.

Methods, Results and Discussion

Three published papers support this PhD thesis: one review article and two research articles. A summary of the methodology employed, results obtained, and its discussion is included below, organized by articles. An additional section containing unpublished results and its discussion is also included after the papers that support the present PhD thesis.

Review article

Matés JM, Campos-Sandoval JA, De Los Santos-Jiménez J, Márquez J. Dysregulation of Glutaminase and Glutamine Synthetase in Cancer. *Cancer Lett.* 2019 Dec 28;467:29-39. doi: 10.1016/j.canlet.2019.09.011.

Due to its flexibility and ability to feed a great number of metabolic pathways, Gln metabolism is commonly reprogrammed in cancer cells. Gln metabolism is involved in ATP generation, synthesis of building blocks for anabolic purposes including amino acids, nucleotides, lipids, and NADPH; and has an important role in the cell antioxidant defense and redox regulation through biosynthesis of glutathione. Gln and its derived metabolites also have a function in cell signaling. Glutaminases catalyze the conversion of Gln to Glu and ammonia in the mitochondria and are commonly upregulated in Gln-consuming tumors. On the other hand, glutamine synthetase (GS) allows ATP-dependent Gln synthesis from Glu and ammonia. GAs and GS are determinant enzymes for Gln metabolism adaptation in cancer.

Targeting Gln metabolism appears as a promising strategy for combination therapies due to its involvement in multiple central molecular processes for tumor cells. In the last years, novel improved GA allosteric inhibitors have been developed, showing higher inhibitory capacity, selectivity, and solubility. GA inhibitors impairs glutaminolytic flux thus affecting a broad number of pathways downstream of Gln, mimicking a nutrient-starvation situation. In fact, treatment with GA inhibitor 968 induced autophagy as a mechanism of resistance in NSCLC cells. Combination of 968 with autophagy inhibitor chloroquine showed synergistic efficacy. GA targeting impacts mTORC1 functions, since Gln and derived metabolites induce mTORC1 activation, and glutaminolysis can be overactivated as a compensatory resistance mechanism to overcome impairment of glucose metabolism caused by mTORC1 inhibition therapies. Combination of GA inhibitors 968 or CB-839 and mTORC1 inhibitors PP242, AZD8055 or MLN128 showed synergistic effects in several *in vitro* and *in vivo* models. GA inhibition also synergized with oxidative stress inducer Dihydroartemisinin in HCC cells, and with DNA targeting drug cisplatin in TNBC cells. Interestingly, in hypoxia-resistant gastric cancer *in vitro* and *in vivo* models, GA and pyruvate kinase M2 inhibition showed synergistic antitumor effects.

GS status in cancer cells is variable. In many tumors, GS expression is silenced, and GAs are overexpressed, so they behave as net consumers of Gln. However, some tumors overexpress GS and its inhibition showed anticancer efficacy. This complex interplay is likely dependent on tumor nutrient availability, and GS activity may be considered in many cases as a resistance mechanism to Gln deprivation. In some cancer models, GS activity was essential to provide Gln for nucleotide *de novo* biosynthesis. Some oligodendroglioma cells showed the need of Gln supply or GS activity for activating mTOR and Wnt/ β -catenin pathways, and pancreatic cancer cells showed higher

resistance to gemcitabine mediated by elevated mTOR activation when overexpressing GS and LAT2, the latter importing several amino acids to the cell in antiport with Gln. Gastric cancer models showed a synergistic decreased in oncogenic capacity when treated with a combination of Gln transporter ASCT2 inhibitor benzyl-serine and GS inhibitor L-methionine sulfoximine (MSO). Importantly, a metabolic interplay has been noted in several tumors regarding Gln metabolism in the tumor microenvironment. In acute lymphoblastic leukemia (ALL) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA), it was found that adipocytes synthesize and secrete Gln through GS overexpression to be consumed for tumor cells. In these cases, PDA cells induced adipocytes to silence GA expression to maximize Gln synthesis and export. In ALL, GS expression in adipocytes protected from asparaginase (ASNase) therapy, and HCC cells treated with ASNase overexpressed GS as a resistance mechanism, which was overcome by GS inhibition with MSO.

Gln metabolic reprogramming in cancer is complex and flexible, since it not only involves cancer cells but also implies the metabolic coupling between them and tumor associated cells. However, combination therapies targeting several key metabolic steps may represent promising strategies to selectively target tumor cells and overcome resistance mechanisms. GA and GS activities move Gln metabolism in opposite directions, but targeting its differential expression in tumor and stromal cells may constitute a promising therapeutic strategy.

Research article 1

de Los Santos-Jiménez J, Campos-Sandoval JA, Márquez-Torres C, Urbano-Polo N, Brøndegaard D, Martín-Rufián M, Lobo C, Peñalver A, Gómez-García MC, Martín-Campos J, Cardona C, Castilla L, da Costa Souza F, Cheng T, Segura JA, Alonso FJ, Curi R, Colquhoun A, DeBerardinis RJ, Márquez J, Matés JM. Glutaminase Isoforms Expression Switches microRNA Levels and Oxidative Status in Glioblastoma Cells. *J Biomed Sci.* 2021 Feb 20;28(1):14. doi: 10.1186/s12929-021-00712-y.

GA isoenzymes GLS and GLS2 differ in their kinetics, expression patterns and role in cancer. While GLS is widely considered as a prooncogenic factor, GLS2 has been proven to behave context-dependently, being associated with both tumor suppressive and prooncogenic functions. Cancer cells display reprogrammed metabolism, redox balance, and genetic and epigenetic regulation. In the last years, GAs have been reported to perform non catalytical functions, including GLS2 stabilization of Dicer to promote miRNA maturation. Besides, GLS2 function was associated with PI3K/AKT signaling downregulation and sensibilization to oxidative stress in glioma cells. In view of all these changes and activities by GAs, we wanted to analyze the relationship between GA isoenzymes' function and oxidative stress status, antioxidant systems and its impact on miRNA regulation in GBM cells. We employed two GBM cell lines, T98G and LN229,

Summary

genetically modified to silence GLS expression or to overexpress GLS2 (GAB isoenzyme), otherwise silenced. A microarray for exploring the expression of 993 miRNAs was used to discriminate GA-dependent alterations in miRNA expression in these models. Changes in selected miRNAs were further analyzed by qRT-PCR. On the other hand, we analyzed in these cell models a total of seven oxidative stress parameters, including total antioxidant capacity (TAC), lipid peroxidation and protein carbonylation assays to address GA isoenzyme function' relationship with the cell overall antioxidant capacity, and oxidative damage to lipids and proteins. Additionally, four assays for specific antioxidant activities were carried out: quantification of total glutathione (GSH) levels, glutathione reductase (GR) activity, global superoxide dismutase (SOD) activity and catalase (CAT) activity.

Six miRNAs were shown to significantly change their expression upon altering expression of GLS or GAB isoenzymes. MiRNA 21-5p, miRNA 92a-3p, miRNA 140-3p, miRNA 146a-5p and miRNA 1260a were downregulated and miRNA 1246 was upregulated when GLS was silenced in both cell lines. MiRNA 21-5p, miRNA 140-3p, miRNA 146a-5p, miRNA 1260a and miRNA 1246 were upregulated when GAB was overexpressed in both cell lines. On the other hand, lipid peroxidation and protein carbonylation decreased in all cases when GLS was silenced, or GAB was overexpressed. TAC and total GSH levels were lower in GLS-silenced LN229 and T98G cells but higher in GAB overexpressing cells. GR activity was higher in all GLS-silenced and GAB overexpressing models. SOD activity decreased significantly in LN229 cells silencing GLS or overexpressing GAB but was higher in T98G silencing GLS or overexpressing GAB. CAT activity was lower in all GAB overexpressing models, but behave the opposite when silencing GLS: was elevated in T98G-GLS(-) but lower in LN229-GLS(-).

GA isoenzymes' functions demonstrated to be linked with these 6 miRNAs expression, however, the mechanism by which they cause these changes remains as an open question. GAs may be altering miRNAs expression by either catalytic or non-catalytic activities. Of note, miRNA 1246 behave oppositely for GLS and GAB function, since it was elevated in both cases when GLS was silenced and GAB was overexpressed, which may point to a catalytic-independent mechanism, since its expression did not correlate with global GA activity in the cell. Most of these miRNAs have been related to both tumor suppressive and oncogenic functions in different types of cancer.

Apparently, GA activity of GLS and GAB isoenzymes correlate with the cell antioxidant capacity, noted by TAC and GSH changes. In accordance with these changes, oxidation of lipids and proteins decreased when GAB was overexpressed, attributable to higher antioxidant capacity. But oxidative damage was also lower with GLS-silencing, despite lower antioxidant capacity. These changes may be explained considering the lower proliferative activity observed in GLS-silenced cells due to the lack of Gln-derived substrates, which is likely to be limiting ROS production rate and therefore, oxidative damage. Interestingly, GR activity was higher when GLS was silenced and when GAB was

overexpressed, pointing to a differential function between GAs isoenzymes on GR activity modulation. Results demonstrated that GAs expression affect SOD and CAT activities. However, the pattern linking GA function with SOD and CAT seems to be more complex and modulated by the molecular background of the cell, since it behaves differently between cell lines with the same genetic modification. In conclusion, it was found that GAs are related to miRNA expression and redox regulation, and some of the results pointed to differential GA isoenzyme effect on these parameters.

Research article 2

De Los Santos-Jiménez J, Rosales T, Ko B, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Márquez J, DeBerardinis RJ, Matés JM. Metabolic Adjustments following Glutaminase Inhibition by CB-839 in Glioblastoma Cell Lines. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 15;15(2):531. doi: 10.3390/cancers15020531.

Many tumors use glutamine for both energy production and biosynthetic purposes. GAs catalyze the oxidative deamidation of Gln into Glu and free ammonia in the mitochondria, in the first step of glutaminolysis. In humans, two genes encode for GAs: *GLS* and *GLS2*. *GLS* is widely expressed and considered as a prooncogenic factor, encoding two isoforms named KGA and GAC. *GLS* isoenzymes are usually overexpressed in tumors, including GBM. We analyzed the metabolic changes occurred after inhibiting *GLS* activity in three GBM cell lines (LN229, T98G and U87MG) using the allosteric inhibitor CB-839.

We employed a broad metabolomic approach for analyzing changes in the levels of hundreds of metabolites, and we also performed isotope tracing experiments using U-¹³C-labeled Gln and ¹⁵N-labeled Gln in the amide group to ascertain the metabolic fates of Gln carbon and nitrogen. In all cases, cells were treated with 1 μM CB-839 or vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) for 24h. For isotope tracing experiments, following treatment, cells were traced using stably labeled Gln for 6 hours. After that, cells were scraped, metabolites were extracted in methanol (U-¹³C-Gln) or acetonitrile (¹⁵N-Gln) and dried to obtain a metabolite pellet. For carbon tracing, metabolites were derivatized with tert-butyldimethylsilyl ether (TBDMS) and analyzed in a GC-MS system. For nitrogen tracing, metabolites were analyzed in a LC-MS system. For metabolomics, after treatment with CB-839 or DMSO, metabolites were extracted in methanol, dried, and analyzed in a Quadrupole Time of Flight (Q-TOF) LC-MS platform.

Carbon tracing experiments showed that labeling in TCA cycle metabolites was significantly lower compared to the control when treated with CB-839. Of note, carbon tracing results also showed an important proportion of reductively generated citrate from Gln in these cells, which was equally impaired by CB-839. Accordingly, metabolomics showed lower levels of TCA cycle intermediates when treated with CB-839, as well as lower levels of related amino acids such as aspartate and alanine. There were also higher levels of purine biosynthesis intermediates inosine monophosphate or

Summary

the adenosine monophosphate analogue 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), and lower levels of uridine monophosphate (UMP), an intermediate metabolite from pyrimidine synthesis. Nitrogen tracing experiments only showed relevant changes in treated T98G cell line, in which significant lower labeling from Gln amide group was observed for adenosine monophosphate (AMP), guanosine monophosphate (GMP), cytidine monophosphate (CMP) and UMP. Interestingly, metabolomics showed accumulation of methylated metabolites upon CB-839 treatment, including trimethyl lysine and 5-methyl-cytosine.

Carbon tracing and metabolomics results stated that CB-839 treatment prevented Gln anaplerosis with variable efficacy between the assayed cell lines. Metabolomics and nitrogen tracing results point to an impairment in *de novo* purine and pyrimidine biosynthesis pathways caused by CB-839, likely due to GA inhibition causing aspartate depletion, which otherwise would probably be synthesized from Gln-derived Glu. Additionally, higher abundances of methylated metabolites could be representative of methylated proteins, including histones, and DNA. CB-839 could be impacting epigenetic regulation in this way by altering the ratio between α -KG and succinate or fumarate. α -KG is substrate of a set of demethylases which oxidize it to succinate, and these enzymes can be inhibited by succinate or fumarate. Although overall succinate levels are lower with CB-839, the latter caused α -KG to be proportionally lower to succinate, whose drop is much smaller than other TCA cycle metabolites. Thus, CB-839 caused an imbalance in succinate levels compared to other TCA cycle metabolites, a situation that may impact α -KG dependent dioxygenase function. In conclusion, GLS inhibition by CB-839 caused a great number of metabolites to change in these cells, showing the impact of Gln metabolism in diverse essential pathways. Information about pathways affected by CB-839 that can be limiting for cell survival and proliferation may be of interest to be exploited therapeutically in future combination treatments.

Unpublished Results and its Discussion

To investigate the effects of GLS2 on cell metabolism and its potential relationship with the previously reported context-dependent tumor suppressor role ascribed to GLS2, we employed the glioblastoma cell line LN229 to generate two GLS2-overexpressing models at different levels (see Fig. 16). We analyzed the GLS2 effect on cell proliferation in these models, as well as its protective effect against treatment with CB-839. Additionally, carbon tracing experiments using U-¹³C-labeled Gln and metabolomics experiments were performed in these models, also including the condition of treating them with the GLS-specific inhibitor CB-839, looking for an experimental situation in which GA activity of GLS is substituted for the activity of GLS2.

Results showed that GLS2 expression correlated with a higher cell doubling time, so higher levels of GLS2 expression induced lower proliferation capacity (see Fig. 17, A). However, cell proliferation was barely or no affected in the GLS2-expressing models

when treated with CB-839 (Fig. 17, C and D). On the other hand, carbon tracing results showed that GLS2 induced a higher contribution of Gln carbon to most of the TCA cycle intermediates, having a higher carbon labeling in these metabolites with higher GLS2 expression (Fig. 20, A). CB-839 treatment decreased labeling in the model expressing lower levels of GLS2 but has almost no effect in the model with higher GLS2 expression (Fig. 20, B). This pattern was similar for oxidative-related labeling and reductive carboxylation-related labeling, except for citrate. In this last case, GLS2 expression induced lower oxidative labeling of citrate while importantly increasing reductive-associated labeling (Fig. 22, A), and these changes were not affected by CB-839 (Fig. 22, B), showing to be a dominant effect of GLS2 over GLS function.

Besides, metabolomics results showed that GLS2 caused a rise in the levels of AMP, while lowering GMP and UMP (Fig. 30), so affecting nucleotide metabolism. Furthermore, GLS2 caused the accumulation of methylated metabolites 3-methyladenine and N,N,N-thimethyllysine (Fig. 31), maybe reflecting higher levels of methylation in proteins and nucleic acids. Regarding the TCA cycle and related metabolites, metabolomics results showed that GLS2 expression correlated with higher levels of the four and five carbon TCA cycle intermediates but caused much lower levels of the six carbon TCA cycle metabolites citrate, aconitate and isocitrate (Fig. 26). Together with the carbon tracing results, these results likely suggest that GLS2 is somehow limiting citrate synthesis, which would be in accordance with hypothetical lower acetyl-CoA levels that would be limiting for the condensation reaction with oxaloacetate to form citrate. We hypothesize that GLS2 may be negatively impacting PDH activity to cause lower mitochondrial acetyl-CoA levels. Higher pyruvate and alanine levels support this hypothesis, while lower levels of acetyl-carnitine (Fig. 28) and N-acetyl-amino acids (Fig. 29) observed in the GLS2 expressing models may be reflecting lower acetyl-CoA levels. To test this hypothesis, a PDH activity assay was performed in the GLS2 expressing models, and it was found that PDH activity was reduced by GLS2 expression in more than a 50% (Fig. 33). These results showing the relationship between GLS2 and PDH functions might have implications on cell metabolism regarding bioenergetics, biosynthesis and epigenetic regulations, since acetyl-CoA is crucially involved in the acetylation reactions of histones, and may be potentially related to the context-dependent tumor suppressive role of GLS2.

It remains as an open question the mechanism by which GLS2 is causing lower PDH activity, which may imply an indirect regulatory effect on PDH kinases or phosphatases. Further research is needed to test this new GLS2 effect on PDH function in other cancer and physiological models, but it is tempting to speculate this activity of GLS2 to be related to its physiological functions in the organs and tissues where it is expressed, specially in the liver, considering that it is a gluconeogenic organ.



Introducción



1. Cáncer y Metabolismo

El cáncer está actualmente considerado como un conjunto de enfermedades que comparten una serie de características comunes, implicando la transformación maligna de células del organismo en células cancerosas en las que se altera el control del ciclo celular y tiene lugar una proliferación descontrolada que lleva a la formación de una masa tumoral anormal, junto con la capacidad de invasión y colonización de otros tejidos, diferentes a los de la aparición del tumor primario. En cualquier caso, puede decirse que la célula cancerosa se caracteriza por presentar alteraciones clave en los circuitos de señalización a nivel molecular que llevan a la célula a escapar de la programación fisiológica normal y el equilibrio homeostático hacia una situación anómala, caracterizada por un estado de escasa diferenciación celular y una ávida actividad proliferativa. La transformación maligna, desde una célula sana a una cancerosa, constituye un proceso gradual en el que la célula acumula una serie de alteraciones a nivel molecular, incluyendo mutaciones y cambios a nivel epigenético, que llevarán a la adquisición por parte de la célula malignizada de un conjunto de capacidades adquiridas que la diferencian de las células sanas (Hanahan, 2022). Los diferentes tipos de cáncer reconocidos actualmente son nombrados en función del tejido u órgano de origen. De hecho, las características moleculares de las células del tejido de origen tienen una importante influencia en las que tendrá el tumor, ya que este heredará una serie de características epigenéticas que influirán en los patrones de expresión génicos. Con todo, existe igualmente una enorme heterogeneidad en cuanto a los aspectos moleculares entre los tumores de un mismo tipo de cáncer (Hoadley et al., 2018; Yuneva et al., 2012).

Las mutaciones son alteraciones genéticas con una importancia fundamental, que en muchos casos son responsables de la aparición de la patología o que promueven su desarrollo. Modificaciones en determinados genes que alteren sus funciones promueven un reordenamiento molecular que en última instancia altera la fisiología de la célula. A este respecto, se han definido dos categorías de genes atendiendo a las consecuencias que tienen las mutaciones que alteran sus funciones sobre el desarrollo del fenotipo maligno de la célula, debido a la actividad que lleva a cabo el gen: oncogenes y genes supresores tumorales. El concepto de oncogén se refiere a aquel gen en el que una mutación que otorga una ganancia de función causa o promueve el fenotipo maligno. Por ejemplo, mutaciones que causan una activación constitutiva de una proteína cuya función, de otra forma, está regulada, como ocurre de forma común con proteínas implicadas en vías de señalización. Este tipo de alteraciones son dominantes, ya que es suficiente la aparición de un alelo mutado del gen para que tenga lugar el cambio fenotípico en cuestión. Por otra parte, son genes supresores tumorales aquellos en los que una mutación de pérdida de función promueve ese fenotipo maligno. En este caso, dado que se trata de una mutación que inactiva o minimiza la actividad del gen, son alteraciones con un patrón recesivo, ya que, aunque aparezca la mutación en uno

de los alelos del gen, seguiría quedando otro alelo funcional que podría en la mayoría de los casos suplir la función molecular por sí solo. El cambio fenotípico aparecería entonces cuando ambos alelos del gen se vieran afectados (Hanahan y Weinberg, 2011).

La concepción del cáncer como enfermedad en su conjunto ha cambiado mucho en los últimos años. Como ejemplo ilustrativo, puede hablarse de la evolución en las muy conocidas publicaciones de Hanahan y Weinberg. En el año 2000, Hanahan y Weinberg proponen seis rasgos distintivos o “hallmarks” del cáncer, alteraciones fisiológicas esenciales que son responsables del fenotipo maligno, como son (i) la activación proliferativa descontrolada y a menudo independiente de factores de crecimiento, mediante la cual la célula maligna, a diferencia de las células sanas en las que la división celular es un proceso altamente regulado y controlado, activa constantemente un programa proliferativo; (ii) la insensibilidad ante señales anti proliferativas, lo que ocasiona que la célula cancerosa sea completamente autónoma en el control de la proliferación, no respondiendo ante señales moleculares externas que la regulen; (iii) la resistencia o inhibición de la apoptosis, mediante la cual la célula maligna consigue evadir este mecanismo de control fundamental; (iv) la inmortalidad replicativa, por la cual, a diferencia de las células normales en las cuales el número de divisiones celulares es limitado, la célula maligna pone en marcha una serie de mecanismos que le permiten dividirse de forma virtualmente indefinida; (v) la capacidad de promover y sostener la angiogénesis, induciendo la aparición de nuevos vasos sanguíneos en el entorno de la masa tumoral que sostienen su desarrollo al proveer al tumor de oxígeno y nutrientes, y (vi) la metástasis y colonización de otros tejidos o localizaciones (Hanahan y Weinberg, 2000). Posteriormente, en 2011 estos autores proponen dos actividades capacitadoras, que permiten la adquisición de esos “hallmarks”, como serían (a) la inestabilidad genómica, un estado en la célula que acelera y favorece la aparición de alteraciones genéticas que a su vez propulsan la transformación maligna, así como (b) la inflamación sostenida, que igualmente favorece el desarrollo tumoral, dando importancia al establecimiento de interacciones a nivel molecular entre las células tumorales y células sanas asociadas, lo que, simplificando mucho, constituye el llamado microambiente tumoral, que genera las condiciones para que el tumor se desarrolle y prolifere. Igualmente, proponen dos “hallmarks emergentes” como son (1) la reprogramación del metabolismo energético y (2) la evasión de la destrucción por parte del sistema inmune, lo que permite a la célula tumoral sobrevivir evitando la respuesta inmune del organismo (Hanahan y Weinberg, 2011). De nuevo, en 2022, Hanahan propone cuatro nuevas actividades esenciales, candidatas a ampliar la lista de “Hallmarks”: (i) la plasticidad fenotípica de la célula malignizada, por la cual en la célula maligna se altera la expresión o la función de determinados factores de transcripción, lo que promueve que la célula adquiera un estado des diferenciado, (ii) la reprogramación a nivel epigenético, que no implica cambios a nivel de secuencia en el ADN, pero ocasiona cambios en la función de una multitud de genes, (iii) la influencia del microbioma, reconociéndose un papel modulador que puede ser pro o anti oncogénico por parte del microbioma e incluso

hablándose de microbiomas intratumorales, y (iv) la importancia de las células senescentes, tanto cancerosas como células sanas asociadas al tumor, que favorecen la creación del microambiente tumoral, creando unas condiciones que favorezcan el desarrollo y progresión tumoral. Igualmente, en esta revisión pasa a considerar los que en 2011 propone como “hallmarks emergentes” como auténticos y consolidados “hallmarks”, siendo estos la evasión de la destrucción por el sistema inmune, y la reprogramación del metabolismo energético, pero que ahora rebautiza dando un enfoque más amplio llamándolo “reprogramación metabólica”, considerando la multitud de actividades y rutas metabólicas que comúnmente se encuentran alteradas y que no sólo están implicadas en la obtención de energía, sino en multitud de otros procesos (Hanahan, 2022). La figura 1 sintetiza el conjunto de hallmarks considerados en la actualidad. Actualmente la reprogramación del metabolismo es considerada como un requisito esencial para la supervivencia y proliferación de la célula tumoral, que debe cubrir tres aspectos fundamentales: la obtención de energía metabólica, la biosíntesis de nuevos componentes celulares y el mantenimiento en este contexto de una homeostasis bioquímica, que provea de las condiciones moleculares necesarias, incluyendo una adaptación y optimización del equilibrio redox celular (Cairns y Mak, 2016).

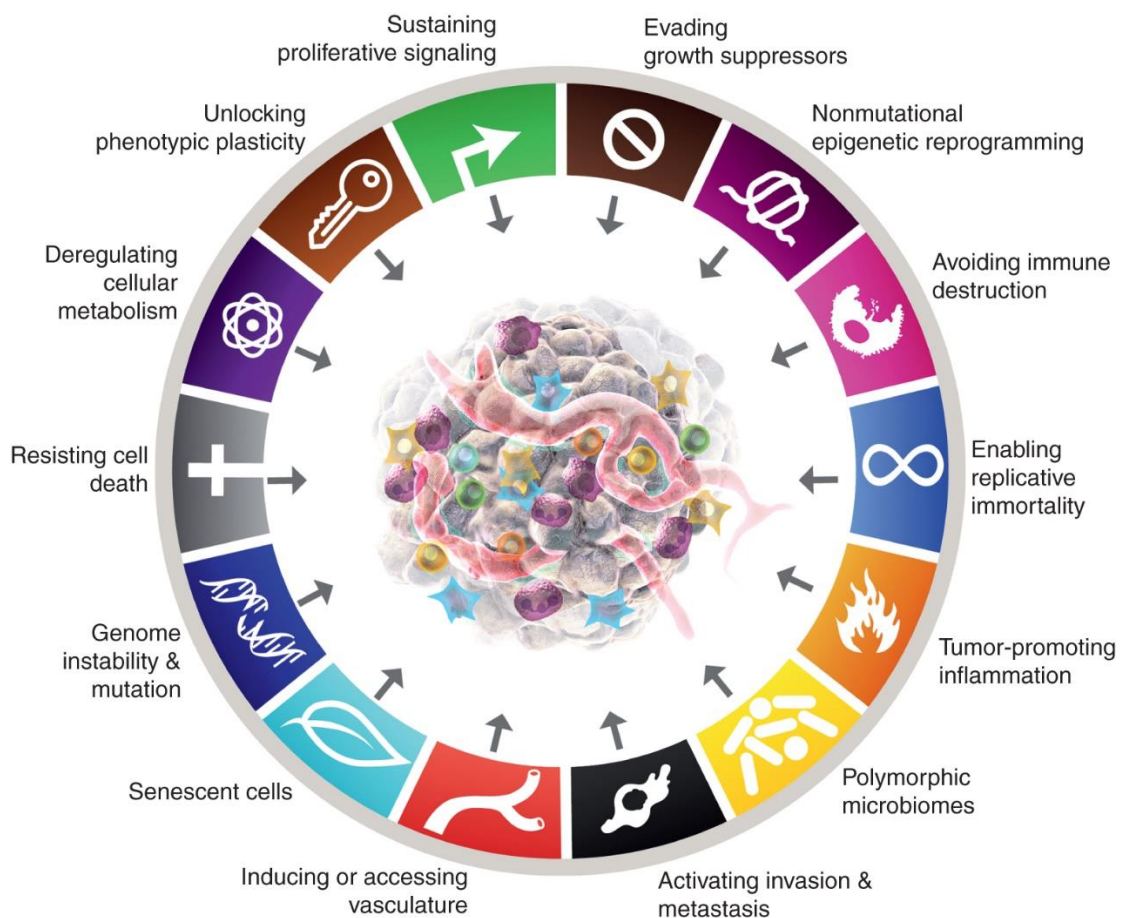


Figura 1. Los “Hallmarks” del Cáncer considerados en 2022. Este conjunto de rasgos adquiridos capacita a la célula tumoral para el desarrollo de las actividades que la diferencian del tejido sano. Figura tomada de Hanahan, 2022.

Son por tanto muchas las capas de complejidad asociadas al cáncer, ya que el proceso de transformación maligna desde una célula sana a una cancerosa no sigue un único itinerario ni cuenta siempre con los mismos actores moleculares implicados, sino que las alteraciones subyacentes a la adquisición de esas actividades esenciales o “hallmarks”, propios de la célula cancerosa, pueden diferir mucho entre tipos de cáncer, entre diferentes tumores de un mismo tipo de cáncer, e incluso entre regiones de un mismo tumor. Por tanto, múltiples cambios a nivel molecular pueden llevar a la aparición de la enfermedad o favorecer su desarrollo. Dado que la célula tumoral presenta unas características diferenciales respecto a las células normales, son necesarias una serie de adaptaciones moleculares que permitan sostener tales actividades. A este respecto, la reprogramación metabólica tiene una importancia principal, haciendo referencia al conjunto de cambios metabólicos que tienen lugar en las células cancerosas con respecto a las células sanas, que permiten y favorecen la actividad de la célula tumoral (Kim y DeBerardinis, 2019).

2. Reprogramación Metabólica

La reprogramación del metabolismo celular es causante de multitud de fenotipos, incluyendo muchos patológicos. Los cambios en el metabolismo asociados a enfermedades pueden ser fijos, como son aquellos causados por alteraciones genéticas, o transitorios, como los causados por cambios en las condiciones del medio, por ejemplo, alteraciones en el suministro de nutrientes u oxígeno (DeBerardinis y Keshari, 2022). El concepto de reprogramación metabólica o metabolismo del cáncer nace de la idea de que las células cancerosas presentan una serie de rasgos o alteraciones metabólicas que las diferencian de las células sanas, y que por tanto pueden representar una vulnerabilidad diferencial de los tumores que potencialmente podría explotarse terapéuticamente (DeBerardinis y Chandel, 2016; Faubert et al., 2020).

Esos cambios metabólicos son clave para permitir la adquisición de capacidades esenciales para la célula cancerosa como son sostener la supervivencia y proliferación celular o evadir al sistema inmune, y otorgan a la célula tumoral una ventaja adaptativa. Sin embargo, a menudo se establece la cuestión de si esta reprogramación del metabolismo siempre es consecuencia única de las mutaciones y otras alteraciones genéticas acaecidas con anterioridad en la célula, o si también puede darse el caso de que el orden de causalidad sea inverso, y sean alteraciones metabólicas las que generen las condiciones que favorezcan la aparición de un número de mutaciones en genes clave y que, ocurrido esto, el conjunto de alteraciones moleculares impulse el desarrollo tumoral (Faubert et al., 2020). Un ejemplo paradigmático de cambios metabólicos a

consecuencia de alteraciones genéticas es el caso de mutaciones en oncogenes clásicos, muy estudiados hasta la fecha, como MYC o KRAS, cuya actividad puede por sí sola ocasionar una reprogramación en un conjunto de rutas metabólicas de forma autónoma en la célula. No obstante, se han encontrado también casos de tumores que carecen de mutaciones recurrentes en oncogenes o supresores tumorales canónicos, pero que aun así muestran una reprogramación del metabolismo que claramente los diferencian del tejido sano. Este hecho sugiere como una posible hipótesis que una perturbación metabólica inicial pueda mimetizar una situación de aparición de alteraciones genéticas, poniendo en marcha la sucesión de eventos moleculares que llevan a la transformación maligna de la célula (Faubert et al., 2020; Xu J et al., 2019). Por ejemplo, se ha documentado que la acumulación de succinato o fumarato, metabolitos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, "Tricarboxylic acid cycle"), puede actuar inhibiendo a las enzimas prolil-hidroxilasas citosólicas, lo que lleva a la estabilización de HIF-1 α ("Hypoxia-inducible factor-1 α "). Esta situación mimetiza fenotípicamente la que se da cuando el tumor se encuentra en un microambiente hipóxico, o cuando ocurren mutaciones activadoras de mTORC1 ("mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1") o mutaciones de pérdida de función en el supresor tumoral Von Hippel-Lindau (VHL), que en condiciones normales media la degradación de HIF-1 α . En cualquiera de esos casos se alcanza un estado pseudohipóxico en la célula, que puede favorecer el desarrollo de características pro-oncogénicas. Por ejemplo, HIF-1 α induce la acción un conjunto de genes implicados en glucólisis, favoreciendo un fenotipo hiperglucolítico (DeBerardinis y Chandel, 2016; Selak et al., 2005).

La progresión tumoral implica que se produzca una amplificación clonal de las células tumorales, y en ese proceso de intensa proliferación celular suele tener lugar la aparición de nuevas mutaciones, originadas por la situación de inestabilidad genómica imperante. Se ha comprobado que en multitud de tumores aparecen ciertas mutaciones que están presentes en todas las células que componen el tumor, siendo estas troncales y habiendo sido heredadas por todas las células, mientras que hay otras que sólo aparecen en algunas de ellas. Estas últimas son mutaciones que se originaron en un momento dado durante la proliferación celular y que quedaron circunscritas a un linaje celular determinado dentro del tumor. Por tanto, esto lleva a que aparezca una diversidad celular en cuanto a alteraciones genéticas dentro del tumor, conteniendo diferentes combinaciones de mutaciones que pueden tener un impacto diferencial en el metabolismo. Ciertamente, el desarrollo tumoral está sujeto a una presión de selección; la generación de diferentes linajes celulares con diferentes combinaciones de alteraciones genéticas no deja de ser un proceso evolutivo que genera una variabilidad intratumoral en cuanto a características moleculares y metabólicas, lo que en última instancia incrementa la probabilidad de supervivencia general del tumor ante diferentes situaciones de estrés, como pueden ser sin ir más lejos la aplicación de tratamientos terapéuticos. Esta variabilidad intrínseca de las células cancerosas, unida también a variables del microambiente tumoral, como son la diferencial disponibilidad de oxígeno

y nutrientes, la interacción con diferentes tipos celulares asociados al tumor y con la matriz extracelular, genera una heterogeneidad en el tumor que lo dota de una gran flexibilidad metabólica. Es esencial tener esto en cuenta a la hora de diseñar un abordaje terapéutico, pues si se diseña contra un determinado fenotipo metabólico y este sólo está presente en parte del tumor, la efectividad se verá irremediablemente comprometida. Una estrategia terapéutica prometedora deberá explotar una vulnerabilidad metabólica que sea común al conjunto del tumor, como puede ser el caso de una creada por una mutación troncal a todas las células tumorales, y lo suficientemente esencial para estas de tal forma que las mutaciones subsecuentes o cambios en las condiciones microambientales no supongan la aparición de resistencias (Faubert et al., 2020; Kim y DeBerardinis, 2019).

Los tumores normalmente presentan alteraciones en una serie de rutas metabólicas comunes, comúnmente relacionadas con el metabolismo energético, biosintético y la homeostasis redox. Estas son adaptaciones metabólicas convergentes, esto es, que pueden aparecer y desarrollarse a causa de alteraciones moleculares diversas, pero que suelen encontrarse en diferentes tipos tumorales ya que son esenciales para las actividades de la célula cancerosa y por tanto son seleccionadas positivamente (DeBerardinis y Chandel, 2016).

Una de las primeras rutas metabólicas alterada en la que suele pensarse al hablar de adaptaciones metabólicas convergentes es la glucólisis. Esta puede ser activada por condiciones microambientales, como un entorno hipóxico, y también por condiciones intrínsecas de la célula, como puede ser la activación de diversos oncogenes como AKT (PKB), RAS o c-Myc, o por mutaciones de pérdida de función en supresores tumorales como p53. Igualmente, el metabolismo de la glutamina (Gln) en tumores ha venido cobrando mucha importancia al estar comúnmente reprogramado, lo que también es inducido por oncogenes como los antes mencionados (DeBerardinis y Chandel, 2016; Elstrom et al., 2004; Flier et al., 1987; Shim et al., 1997). Por otra parte, son cambios metabólicos divergentes aquellos específicos de determinados tipos o subtipos tumorales ya que son dependientes de unas condiciones o alteraciones moleculares concretas y específicas. En cuanto a su potencial explotación terapéutica, las adaptaciones metabólicas convergentes pueden parecer más apropiadas dado que aparecen en una mayoría de tipos tumorales y por tanto el tratamiento podría ser aplicable a un espectro amplio de tumores, sin embargo, estas rutas metabólicas son muy centrales e igualmente necesarias en las células sanas y por tanto la ventana terapéutica del tratamiento puede ser limitada, debido a la potencial toxicidad. Por otra parte, dirigir tratamientos contra las adaptaciones divergentes podría tener la ventaja de una mayor especificidad contra las células tumorales, pero la idoneidad del tratamiento quedaría restringida a casos muy específicos al ser dependiente de una determinada alteración concreta. La reprogramación del metabolismo en su conjunto es un fenómeno extremadamente diverso y a menudo flexible en función del conjunto de cambios

concretos que posee en cada tipo de cáncer, tumor, o regiones del tumor. La herencia molecular del tejido de origen, las alteraciones moleculares concretas que adquieran las células tumorales a lo largo del proceso de transformación maligna, y las condiciones microambientales a las que se vean expuestas serán variables clave que determinarán que en una determinada célula tumoral el metabolismo se re programe de una u otra forma (Kim y DeBerardinis, 2019).

Comúnmente, la reprogramación metabólica comienza en el estadio de una lesión premaligna, una situación de transición entre la transformación de células sanas en tumorales, que crea las condiciones moleculares que soportan el desarrollo oncogénico. Por ejemplo, en ratón se ha encontrado que la activación del oncogén *NRas*, junto con una versión mutante del regulador epigenético *Ezh2* son elementos causales del desarrollo de leucemia. El mutante de *Ezh2* hiperactiva la expresión de *BCAT1*, una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada cuya expresión favorece la acumulación de leucina en la célula, lo que a su vez activa a la proteína señalizadora mTOR, que constituye un nodo de señalización con capacidad de actuar como un sensor de los niveles de factores de crecimiento y nutrientes, incluyendo aminoácidos, en respuesta a los cuales sobre activa procesos que favorecen el crecimiento y la proliferación celular, como la biosíntesis proteica o la biogénesis de ribosomas. Igualmente, mutaciones activadoras en mTORC1 son comunes en tumores y ocasionarán esta misma situación (Faubert et al., 2020; Gu et al., 2019).

En los organismos pluricelulares, la viabilidad y supervivencia del organismo depende de la coordinación armónica entre las células que lo componen. Las células del organismo se encuentran adaptadas a la realización de una serie de funciones concretas (diferenciación celular), de forma que las funciones fisiológicas de la célula están finamente reguladas. Entre ellas, el control de la proliferación celular es esencial ya que normalmente las células del organismo se encuentran expuestas a niveles de nutrientes que permitirían la división celular. Esto es, a diferencia de los organismos unicelulares en los que la disponibilidad de nutrientes dicta la puesta en marcha de la proliferación, en organismos pluricelulares esto no ocurre, en aras de evitar un crecimiento aberrante que comprometa la viabilidad del organismo. Un mecanismo de regulación a ese respecto es el control de la importación de nutrientes por factores de crecimiento, de modo que aunque la célula tenga acceso a nutrientes ésta no los importa al interior celular a menos que se produzca una señalización a ese respecto (Vander Heiden et al., 2009), ya que existe una serie de proteínas clave implicadas en el transporte y primeros pasos del metabolismo de los nutrientes cuya expresión o actividad está regulada positivamente por factores de crecimiento, o bien por determinadas interacciones entre la célula y la matriz extracelular (Grassian et al., 2011; Schafer et al., 2009). En la célula cancerosa normalmente se encuentra una sobre activación de los mecanismos moleculares de adquisición de nutrientes y rutas de biosíntesis, por lo que la importación de nutrientes se produce de forma constitutiva. Por ejemplo, en el caso de la glucosa, las células

normales no la importan a niveles suficientes como para sostener el crecimiento y proliferación celular a no ser que sean estimuladas por factores de crecimiento específicos del tipo celular, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Existe una serie de receptores tirosina-quinasa para estos y otros factores de crecimiento cuya señalización corriente abajo de la unión del ligando promueve el importe de glucosa a la célula. Comúnmente, esta señalización converge en un nodo de señalización común: la ruta de PI3K/AKT(PKB). Por tanto, mutaciones de ganancia de función en proteínas implicadas en la ruta de señalización de PI3K, o de pérdida de función en sus reguladores negativos PTEN o INPP4B, consiguen que esta ruta esté constitutivamente activa sin la necesidad de activación por factores de crecimiento extracelulares, poniendo en marcha un programa génico enfocado en maximizar la importación de nutrientes y las rutas anabólicas (Goncalves MD et al., 2018; Lawrence et al., 2014; Pavlova y Thompson 2016). La sobre activación PI3K promueve tanto la expresión del transportador de glucosa GLUT1, como su translocación desde las endomembranas celulares a la membrana plasmática de la célula (Wieman et al., 2007). Por otra parte, AKT promueve un incremento en la actividad enzimática de la hexoquinasa, la primera enzima de la glucólisis que cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato, previniendo que pueda volver al salir del interior celular (Deprez et al., 1999; Gottlob et al., 2001). AKT también estimula a la fosfofructoquinasa, una enzima clave en la regulación de la vía glucolítica al catalizar una reacción irreversible. Por otra parte, el oncogén *KRAS* igualmente induce la sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 (Pavlova y Thompson, 2016). Estas alteraciones genéticas dan lugar a una mayor tasa de importación de glucosa en la célula tumoral respecto a las células sanas, y por tanto, otorga una ventaja competitiva al canalizar preferencialmente la importación de la glucosa hacia el interior de las células tumorales, consiguiendo un mayor suministro de glucosa que podrá ser empleada para la obtención de energía así como en biosíntesis, incrementado la capacidad proliferativa de la célula (Ying H et al., 2012; Yun J et al., 2009). La figura 2 toma como ejemplo una visión esquemática del metabolismo de la glucosa para ilustrar los cambios metabólicos que ocurren en cáncer, inducidos por mutaciones en oncogenes o supresores tumorales, y la evolución de la concepción de la reprogramación del metabolismo de la glucosa.

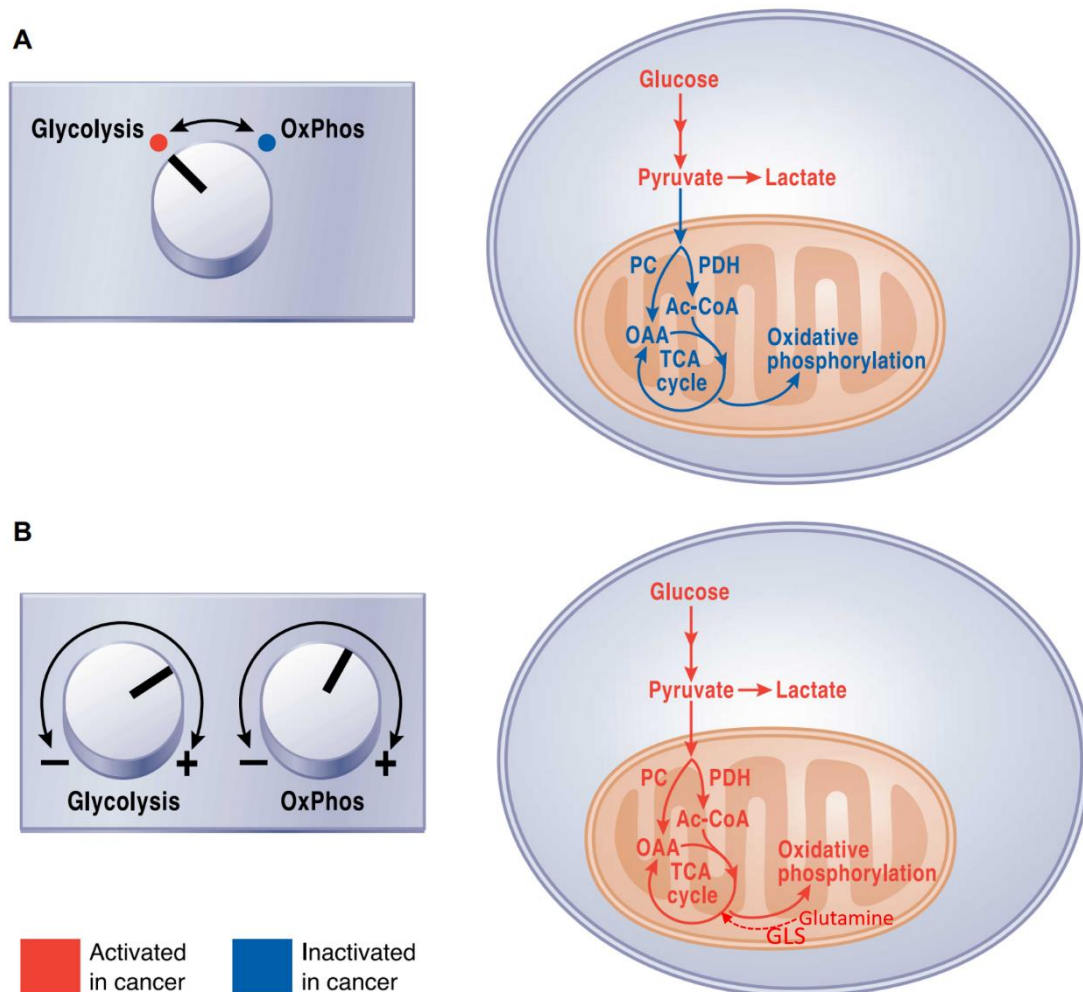


Figura 2. El metabolismo de la glucosa y metabolismo mitocondrial como ejemplo representativo de reprogramación metabólica en cáncer. (A) Visión clásica y generalizada de los cambios en el metabolismo de la glucosa en cáncer, donde se viene considerando que la célula tumoral inactiva la OXPHOS (rutas en azul) y sobreactiva la glucólisis aerobia y generación de lactato (rutas en rojo). (B) Visión más actualizada. El análisis metabólico de la mayoría de los modelos experimentales y tumores *in vivo* sugieren una sobreactivación de ambos procesos, tanto glucólisis aerobia como OXPHOS, así como la glutaminólisis, siendo común la sobreexpresión de la isoenzima glutaminasa GLS, en el contexto proliferativo de la célula tumoral. Figura modificada de DeBerardinis y Chandel, 2016.

3. Metabolismo de la Glucosa en Cáncer

La glucosa es un nutriente esencial, representando la principal fuente de carbono que consumen las células de mamífero. Normalmente, en el organismo, las células diferenciadas se encuentran en un entorno aeróbico en el cual metabolizan la glucosa por vía glucolítica hasta piruvato en el citosol. El piruvato es importado a la mitocondria donde es descarboxilado para dar acetil-CoA e ingresar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), donde el carbono procedente de la glucosa será oxidado en sucesivas reacciones para dar lugar a CO_2 . Estas reacciones de oxidación están acopladas

a la reducción de NAD^+ a NADH , un nucleótido que funciona como un par aceptor/donador de electrones, y que una vez reducido donará electrones a la cadena respiratoria mitocondrial o cadena de transporte de electrones (ETC, "Electron Transport Chain") para la creación de un gradiente de protones entre ambos lados de la membrana mitocondrial interna, que podrá ser utilizado posteriormente por el complejo ATPsintasa o complejo V, presente en dicha membrana, para la síntesis de Adenosina 5'-trifosfato (ATP) a partir de ADP y fosfato inorgánico, en el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS, "Oxidative Phosphorylation"). En la OXPHOS, el O_2 funciona como aceptor final de electrones. Es sólo en condiciones anaeróbicas, como por ejemplo puede ocurrir en situaciones de ejercicio físico en las fibras musculares, en las que el suministro de oxígeno no es suficiente para sostener la OXPHOS, que el piruvato procedente de glucosa es reducido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y secretado al medio (fermentación láctica), en lugar de seguir un metabolismo oxidativo en la mitocondria. Este "modo de funcionamiento" metabólico es muchísimo menos eficiente energéticamente en comparación a la OXPHOS. Muchas células cancerosas se caracterizan por la preferencia por la glucólisis y generación de lactato en condiciones aerobias, en detrimento de la oxidación completa de la glucosa hasta CO_2 y obtención de energía mediante OXPHOS. Las primeras observaciones de este fenómeno fueron realizadas por Otto Warburg en la década de 1920, cuando documentó que el tejido tumoral *in vitro* poseía un consumo incrementado de glucosa respecto al tejido sano, y posteriormente, en 1956 describió esa preferencia por la glucólisis aerobia, condición que fue llamada "Efecto Warburg", al cual consideró común al metabolismo de todas las células cancerosas. Warburg propuso que estos cambios metabólicos eran consecuencia de la existencia de mitocondrias disfuncionales incapaces de realizar OXPHOS, y creyó que esta era en última instancia la causa de la enfermedad. Sin embargo, es claro actualmente que el panorama no es tan simple y que existe una enorme heterogeneidad metabólica tanto entre tumores como en diferentes regiones de estos, habiéndose probado que el Efecto Warburg ni ocurre en todas las células tumorales, ni en todas las que ocurre existen mitocondrias disfuncionales, sino que más bien se considera al Efecto Warburg como una "preferencia metabólica" de ciertas células cancerosas. De hecho, en la mayoría de los casos, la célula tumoral sigue oxidando glucosa en la mitocondria en proporciones variables y necesita de una ETC funcional para proliferar. Actualmente hay evidencias de que en ciertos tipos celulares sanos se produce glucólisis aerobia cuando son estimulados para proliferar, como en linfocitos y células endoteliales, pero que siguen necesitando la actividad de la OXPHOS en la mitocondria (Diebold et al., 2019; Fitzgerald et al., 2018; Frauwirth et al., 2002; Martínez-Reyes y Chandel, 2021; Warburg, 1956; Weinberg et al., 2010).

En cualquier caso, es claro que la gran mayoría de células tumorales se caracterizan por un consumo incrementado de glucosa respecto al tejido normal, y desde hace décadas esto se ha aprovechado desde el punto de vista clínico. Actualmente, es común el empleo de la sonda análoga a la glucosa (18F)Fluorodesoxiglucosa (18F-FDG), marcada

radiactivamente, que tras su administración al paciente permite obtener imágenes del tumor por medio de tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), en base a la incorporación diferencial de la sonda en el tumor respecto al tejido normal, siendo indistinguible a este respecto de la molécula de glucosa (DeBerardinis y Keshari, 2022).

El efecto Warburg es un ejemplo muy ilustrativo de los cambios a nivel metabólico que pueden darse en la célula tumoral, y sigue siendo considerada una característica distintiva de los tumores, estando además regulado por oncogenes. La visión actual es que diferentes células tumorales poseen distintas preferencias metabólicas, pero desde luego el metabolismo tumoral se caracteriza por ser extremadamente adaptable (Kim y DeBerardinis, 2019; Pavlova y Thompson, 2016).

Para entender esa preferencia metabólica por la glucólisis aerobia es necesario ampliar la perspectiva más allá de la mera generación de ATP por parte del metabolismo de la glucosa. En células que activan continuamente la proliferación, se hace necesaria una muy elevada tasa biosintética, ya que la célula necesita duplicar sus componentes para poder dividirse. Por tanto, además de energía, la célula requiere aminoácidos, nucleótidos, lípidos y otros componentes celulares en cuyas rutas de biosíntesis la glucosa participa (Vander Heiden y DeBerardinis, 2017). La figura 3 resume los principales cambios en el metabolismo de la glucosa entre células quiescentes y proliferativas, así como los diferentes destinos metabólicos de los intermediarios de su metabolismo.

Por ejemplo, el acetyl-CoA derivado del piruvato glucolítico puede servir como sustrato para la biosíntesis de lípidos, como el palmitato, previa generación de citrato en la mitocondria y posterior exportación al citosol, donde puede ser sustrato de la enzima ATP Citrato Liasa (ACLY) para volver a generar acetyl-CoA en el citosol, y oxalacetato. Existen factores de crecimiento que activan esta conversión metabólica mediante la señalización de la ruta de PI3K/AKT (PKB). AKT activa a ACLY incrementando la disponibilidad citosólica de acetyl-CoA para la biosíntesis de lípidos, por lo que mutaciones activadoras en esta ruta de señalización favorecerán esta vía biosintética esencial en células tumorales al ser central en la biosíntesis de multitud de lípidos, no sólo para generar nueva membrana, sino también permitiendo alterar la composición lipídica de la misma por una más resistente al daño oxidativo, como mecanismo de adaptación a las condiciones redox de la célula tumoral. A partir del acetyl-CoA citosólico, actuarán enzimas clave en la biosíntesis lipídica como son la acetyl-CoA Carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FASN), que junto con ACLY suelen estar sobreexpresadas en tumores. Igualmente, el acetyl-CoA citosólico es sustrato para la biosíntesis de colesterol, y por otra parte, los niveles de acetyl-CoA extra mitocondrial son igualmente muy relevantes en tanto participa como donador de grupos acetilo en la modificación postraduccional de proteínas. Particularmente, las enzimas histona acetyl transferasas (HATs) catalizan la transferencia de grupos acetilo desde acetyl-CoA a determinados

residuos de las histonas, lo que generalmente resulta en una inducción de la transcripción ya que reducen la interacción electrónica entre las histonas y el ADN, cargado negativamente, y por tanto promueven la accesibilidad al ADN. De este modo, se ha visto que una sobre activación de la ruta PI3K-AKT consigue incrementar la expresión de determinados genes mediante el aumento de los niveles de acetil-CoA extra mitocondriales por activación de ACLY (Bauer et al., 2005; Berwick et al., 2002; Lee et al., 2014; Pavlova y Thompson, 2016; Rysman et al., 2010).

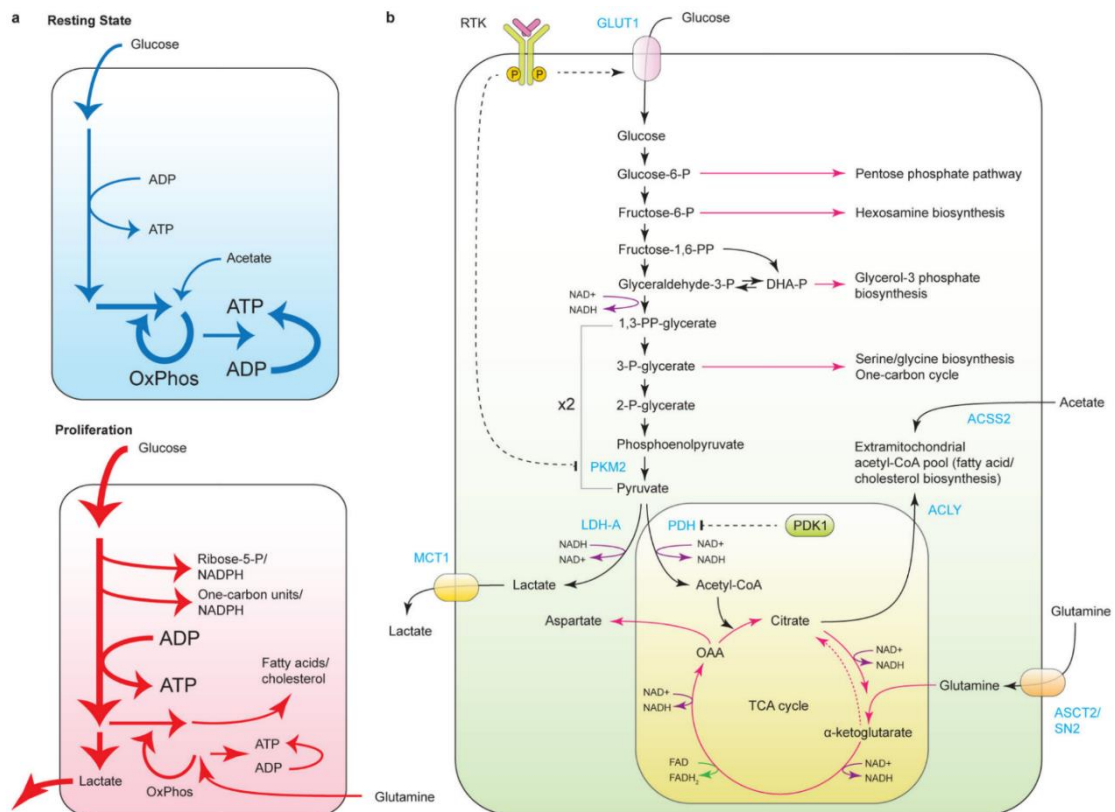


Figura 3. Reprogramación del metabolismo de la glucosa. (a) principales cambios en el destino metabólico de la glucosa entre situaciones de quiescencia (azul) y proliferación celular (rojo) (b) síntesis del metabolismo de la glucosa y algunas de las rutas metabólicas a las que alimenta, entre ellas, la ruta de las pentosas fosfato, biosíntesis de hexosaminas, de ácidos grasos o de algunos aminoácidos no esenciales. Figura tomada de Pavlova y Thompson, 2016.

Igualmente, la glucosa-6-fosfato derivada de glucosa puede seguir la ruta metabólica de las pentosas fosfato (PPP), de la cual es metabolito intermediario la ribosa, esencial en la biosíntesis *de novo* de nucleótidos. El Efecto Warburg favorece que una mayor cantidad de intermediarios glucolíticos pueda ser direccionado hacia la PPP, donde además de ribosa-5-fosfato, también se genera NADPH. El NADPH es esencial en este contexto celular, ya que muchas de las reacciones bioquímicas implicadas en biosíntesis son de naturaleza reductora, y por tanto requieren de la aportación de electrones por parte del NADPH, habiéndose comprobado que la disponibilidad de NADPH puede ser

un factor limitante en la proliferación tumoral, siendo ávidamente consumido en reacciones biosintéticas (Vander Heiden et al., 2009). En el ciclo TCA se genera en mayor medida NADH que donará electrones a la ETC para la obtención de energía metabólica (ATP), pero en un contexto de alta demanda biosintética la generación de NADPH puede ser incluso más importante, siendo la rama oxidativa de la PPP una ruta principal a ese respecto (Vander Heiden y DeBerardinis, 2017). De hecho, se ha comprobado que enzimas clave de la PPP, como TKTL1 (Xu et al., 2009) y TALDO (Wang et al., 2011) están comúnmente sobreexpresadas en tumores. Por otra parte, mutaciones activadoras del oncogén Ras llevan a la sobreexpresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de la ribosa-5-fosfato (Ying et al., 2012). El supresor tumoral p53 regula negativamente la PPP al inhibir la actividad de la enzima limitante de la ruta, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), habiéndose encontrado en tumores mutaciones inactivadoras de p53 que anulan la represión de la función G6PD (Jiang et al., 2011).

Igualmente, otra vía de generación de NADPH es a partir de la reacción catalizada por ACLY en el citosol, a partir de la cual se genera, junto con acetil-CoA, oxalacetato. El oxalacetato puede ser reducido a malato en el citosol acoplado a la oxidación de NADH a NAD⁺, y el malato puede ser sustrato de la enzima málica 1 (ME1), que cataliza su descarboxilación oxidativa a piruvato, acoplada a la reducción de NADP⁺ a NADPH, incrementando así los niveles de NADPH (Pavlova et al., 2022). De hecho, además de la relación NADPH/NADP⁺, los niveles globales de este nucleótido están regulados en función de la demanda de la célula por medio de las isoenzimas NAD quinetas 1 (NADK1, citosólica) y 2 (NADK2, mitocondrial), que catalizan la fosforilación de NAD⁺ a NADP⁺, incrementando los niveles de este último. AKT fosforila a NADK1 incrementando su actividad, por tanto, mutaciones que induzcan una activación de la ruta PI3K/AKT inducirán por esta vía un incremento en la disponibilidad de NADPH para propósitos biosintéticos (Hoxhaj et al., 2019).

Otro metabolito intermediario de la glucólisis, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), puede servir para sintetizar glicerol-3-fosfato por medio de la reacción catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1 (GPD1), sirviendo el glicerol-3-fosfato en la biosíntesis de fosfolípidos, componentes esenciales de las membranas celulares (Pavlova y Thompson, 2016).

Además, los metabolitos intermediarios de la glucólisis pueden servir para la biosíntesis de aminoácidos no esenciales, como es el caso del 3-fosfoglicerato, que sirve como sustrato inicial de la ruta de biosíntesis *de novo* de la serina, así como en la biosíntesis de glicina, generación de NADPH y de donadores de grupos metilo. El oncogén c-Myc favorece el flujo metabólico desde 3-fosfoglicerato hacia la biosíntesis de serina y glicina (Wahlstrom y Henriksson, 2015). La enzima limitante en la biosíntesis *de novo* de serina es la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PHGDH), y suele encontrarse amplificada en tumores de mama y melanoma, donde es considerada esencial. La serina tiene un papel crucial en el metabolismo del ciclo del folato o metabolismo de un carbono, una ruta

metabólica indispensable para la célula al ser esencial en la biosíntesis de glicina, nucleótidos, NADPH y reacciones de metilación en general, al producirse el metabolito S-adenosil-metionina (SAM), considerado como un “donador de metilos universal”. Enzimas implicadas en esta ruta metabólica están muy comúnmente sobreexpresadas en células tumorales. La SAM se produce en el ciclo de la metionina, acoplado a su vez al ciclo del folato, y funciona como donador de grupos metilo en reacciones de metilación de ADN y proteínas, incluyendo histonas, como las catalizadas por las enzimas metilasas de ADN (DNMTs), que metilan nucleótidos de citosina en el ADN, y las histona metiltransferasas (HMTs), implicadas en la metilación de residuos de lisina y arginina en proteínas histónicas. A ese respecto, se ha comprobado que los niveles de SAM pueden influenciar el grado de metilación de diferentes sustratos, incluyendo nucleótidos de citosina en el ADN e Histonas, lo que tendrá una repercusión en la expresión génica (Locasale et al., 2011; Nilsson et al., 2014; Possemato et al., 2011). En cáncer, un mayor flujo metabólico en el ciclo de la metionina resulta en mayores niveles de SAM, lo que se relaciona con una hipermetilación de ADN e histonas, que consecuentemente causan silenciamiento génico (Maddocks et al., 2013).

El oncogén c-Myc promueve la expresión coordinada de varias proteínas que favorecen el fenotipo de la glucólisis aerobia, como son la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), lactato deshidrogenasa A (LDH-A) y el transportador de monocarboxilatos MCT1. PDK1 fosforila a una subunidad catalítica del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) inhibiendo su actividad, y por tanto minimizando la tasa de conversión de piruvato glucolítico a acetil-CoA en la mitocondria, y con ello, su entrada al ciclo TCA. LDH-A reduce el piruvato a lactato, y MCT1 es un transportador implicado en la secreción de lactato fuera de la célula (Wahlstrom y Henriksson, 2015). Igualmente, la señalización de la ruta TGF/ β -catenina promueve la expresión de PDK1 y MCT1 (Pate et al., 2014), mientras que la estabilización de HIF-1 α debido a un entorno hipóxico o alteraciones pro-oncogénicas promueve la expresión del transportador GLUT1, así como de PDK1 y LDH-A (Kierans y Taylor, 2021; Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006).

Por tanto, el metabolismo de la glucosa dista mucho de estar constreñido a la generación de ATP, siendo capaz de alimentar un conjunto de rutas metabólicas centrales y estando relacionado con distintos procesos celulares. En el contexto de las necesidades de la célula tumoral, el Efecto Warburg puede conseguir mantener unos niveles elevados de un conjunto de metabolitos derivados de la glucosa que sirven como punto de partida de multitud de rutas metabólicas y con ello favorecer la biosíntesis de componentes celulares y maximizar la capacidad proliferativa de la célula. Por tanto, el Efecto Warburg puede constituir más bien un modo metabólico de funcionamiento óptimo en situaciones de elevada actividad proliferativa, en lugar de ser consecuencia de defectos mitocondriales. Es más, actualmente existen argumentos que consideran que los niveles de ATP no suelen ser en realidad limitantes para la proliferación de muchas células tumorales, lo que apoya la consideración del Efecto Warburg, menos eficiente en cuanto

a generación de ATP, aunque también capaz de generarlo a una tasa más alta en comparación a la OXPHOS, como una adaptación del metabolismo ventajosa en un contexto proliferativo en el cual, además, se da una sobre activación de los mecanismos de importación de glucosa a la célula tumoral haciendo difícil que la disponibilidad de este metabolito sea limitante (Pavlova y Thompson, 2016; Vander Heiden et al., 2009; Vander Heiden y DeBerardinis, 2017). La reducción del piruvato glucolítico a lactato puede tener efectos beneficiosos para la célula tumoral, ya que consigue que la vía glucolítica posea un balance redox neutro, sin generación neta de NADH, y regenerando NAD⁺ que permite mantener una alta tasa glucolítica para generación de ATP y metabolitos intermediarios con distintos destinos metabólicos, y no implicando la generación de NADH mitocondrial por oxidación completa del carbono procedente de la glucosa, lo que se piensa puede ser positivo en ciertos contextos en los que la ETC de la célula tumoral está sobrecargada y el oxígeno puede ser limitante para aceptar los electrones, lo que provocaría generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño oxidativo (Luengo et al., 2021; Vander Heiden et al., 2009). Igualmente, la acumulación de lactato en el medio extracelular lleva a una acidificación de este que parece promover el establecimiento de un microambiente favorable para la tumorigénesis (Boedtkjer y Pedersen, 2020).

La enzima piruvato quinasa cataliza el último paso de la glucólisis, convirtiendo el fosfoenol piruvato en piruvato, acoplado a la generación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Existen dos genes que codifican piruvato quinasa en humanos, *PKLR*, que codifica dos isoformas, PKR (específica de eritrocitos) y PKL (específica de hígado), y *PKM2*, que puede dar lugar a dos isoenzimas por ajuste alternativo, PKM1, expresada de forma ubicua en adultos, y la isoforma embrionaria PKM2. Se ha comprobado que las células cancerosas tienen una preferencia por la expresión PKM2 en detrimento de la expresión PKM1, que es la preponderante en tejido sano adulto, estando este cambio favorecido por la actividad del oncogén c-Myc (Dang et al., 2013). PKM2, a diferencia de PKM1, es altamente regulable y presenta una conformación dimérica, de baja actividad, y otra tetramérica, de alta actividad. PKM2 puede ser regulada por señalización tirosina-quinasa dependiente de factores de crecimiento que promueven su estado dimérico, mientras que metabolitos como la serina favorecen su estado tetramérico. Por el contrario, PKM1 está menos regulada y tiene mayor actividad, por lo que podría decirse que está constitutivamente activada. El cambio de expresión en la célula tumoral de PKM1 por PKM2, junto con una concomitante señalización oncogénica que mimetiza la señalización dependiente de factores de crecimiento, resulta en una menor actividad piruvato quinasa global y con ello, causa la acumulación de los metabolitos intermediarios de la glucólisis, localizados corriente arriba en el metabolismo de la acción catalítica de la piruvato quinasa, por tanto incrementando la disponibilidad de sustratos para rutas biosintéticas de nucleótidos, aminoácidos y lípidos. De hecho, se ha comprobado que el silenciamiento en células tumorales de la isoenzima PKM2 y la expresión simultánea de la isoenzima PKM1 favorece un cambio metabólico desde

Efecto Warburg hacia OXPHOS (Chaneton et al., 2012; Christofk et al., 2008a; Christofk et al., 2008b; Israelsen y Vander Heiden, 2013; Pavlova y Thompson, 2016; Vander Heiden et al., 2009; Ye et al., 2012). La figura 4 ilustra esquemáticamente el efecto de algunas rutas de señalización y/o factores de transcripción cuya función suele estar alterada en cáncer sobre varias rutas metabólicas centrales, incluyendo el metabolismo de la glucosa y de la Gln, así como un conjunto de rutas biosintéticas.

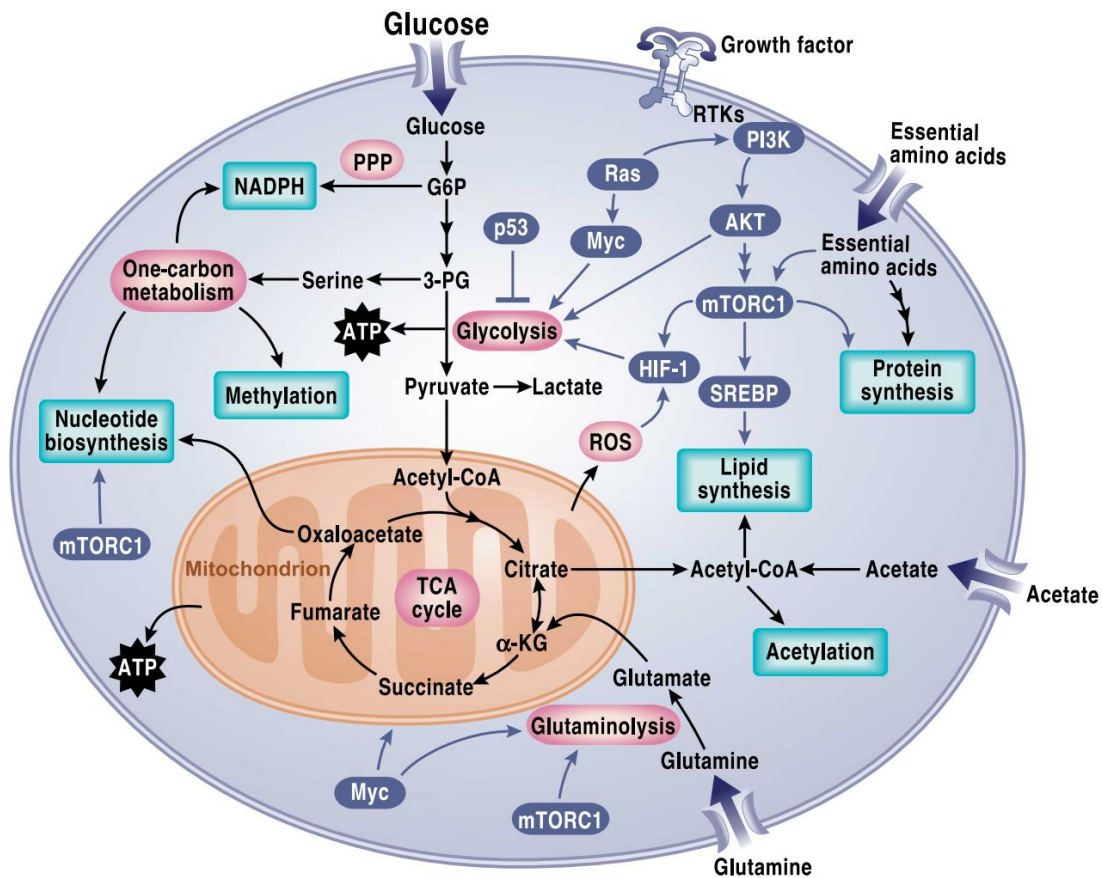


Figura 4. Algunas de las rutas de señalización más comúnmente alteradas en la regulación del metabolismo en cáncer. La señalización oncogénica PI3K/AKT, c-Myc o HIF-1, esta última pudiendo estar mediada por mTORC1, activan la glucólisis, mientras que p53 la regula negativamente. Por otra parte, c-Myc induce igualmente glutaminólisis, así como mTORC1, que también promueve la biosíntesis de lípidos, nucleótidos o proteínas. Figura tomada de DeBerardinis y Chandel, 2016.

Al igual que multitud de metabolitos intermediarios de la glucólisis pueden ser derivados hacia diversas rutas biosintéticas, lo mismo ocurre con los metabolitos intermediarios del ciclo TCA, que constituye una vía metabólica principal a este respecto. En el contexto proliferativo de la célula tumoral con elevadas tasas biosintéticas, dichos metabolitos están siendo redirigidos constantemente hacia diferentes rutas de biosíntesis y, por tanto, deben existir también vías metabólicas para reponerlos, que son llamadas vías anapleróticas. El acetyl-CoA generado en la mitocondria a partir del piruvato glucolítico

por medio de la reacción de la PDH entra al ciclo TCA, pero no es capaz de mantener los niveles de los metabolitos del ciclo, ya que los dos carbonos del resto acetilo que aporta serán completamente oxidados hasta CO_2 en las reacciones subsecuentes. Existen dos nutrientes principales en este contexto celular que son capaces de “alimentar” al ciclo TCA en las células tumorales: glucosa y Gln, y lo hacen en distintos puntos del ciclo. En el caso de la glucosa, lo hará por medio de la carboxilación del piruvato generado por glucólisis, que puede ser sustrato de la enzima piruvato carboxilasa, generándose en esa reacción oxalacetato que ingresa al ciclo TCA. Por otra parte, en la mitocondria la Gln puede ser sustrato de glutaminólisis y servir para generar glutamato (Glu), y este a su vez el metabolito intermediario del ciclo TCA, alfa-cetoglutarato (α -KG), también llamado 2-oxoglutarato. Esta última representa una vía anaplerótica cuasi-universal para las células cultivadas *in vitro* (Pavlova et al., 2022). Adicionalmente, la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada isoleucina y valina puede también constituir una vía anaplerótica al generar metabolitos intermediarios del ciclo, aunque esto ocurre en casos más específicos (DeBerardinis y Chandel, 2016). El ciclo TCA y los posibles destinos metabólicos de sus metabolitos intermediarios serán tratados en mayor detalle en el apartado 4 de esta introducción.

4. Reprogramación del Metabolismo de la Glutamina en Cáncer

El metabolismo de los tumores es, por lo general, extremadamente diverso, flexible y adaptable, pero actualmente existe suficiente evidencia acerca de la importancia que tiene para las células tumorales el suministro y utilización de la Gln. La Gln es la fuente preferida de incorporación de nitrógeno en células animales (Bott et al., 2019), siendo el aminoácido más abundante en la sangre y el músculo, encontrándose en concentraciones de alrededor de 0,6 y 0,9 mmol/L en el plasma, mucho más alta que las concentraciones de otros aminoácidos. Se ha comprobado que, en contextos proliferativos, como los que puede haber en heridas y, desde luego, en muchos tumores, las concentraciones de Gln en el espacio extracelular son localmente más bajas, habiéndose estudiado el caso de modelos experimentales *in vivo* con aloinjertos de tumores mamarios en los que la concentración de Gln extracelular decreció localmente hasta el entorno de 100 μM (Edwards et al., 2021; Hensley et al., 2013; Marchesini et al., 1983; Pavlova et al., 2022). Tras la glucosa, la Gln es considerado el nutriente más empleado por las células tumorales, y aunque esta dependencia de Gln es variable entre tumores y células tumorales, y aún es necesario un mayor entendimiento de la gestión del metabolismo de la Gln en tumores *in vivo*, la Gln es necesaria y ávidamente consumida por la mayoría de las células en proliferación activa *in vitro*, incluyendo las tumorales, observación realizada por Harry Eagle ya en la década de 1950 (Eagle, 1955). De hecho, ya en la década de 1970 se documentaron casos en los que la Gln es empleada con preferencia sobre la glucosa para la generación de ATP en células en cultivo (Reitzer et al., 1979).

La Gln presenta en su estructura dos átomos de nitrógeno, uno en el grupo amino y otro en un grupo amido en la cadena lateral. Por ello, representa la principal forma de transferencia de nitrógeno entre células en animales, así como la principal fuente de nitrógeno para la célula tumoral, que también puede emplear su esqueleto carbonado en propósitos bioenergéticos y biosintéticos. Estas características convierten a la Gln en un nutriente fundamental para muchas células cancerosas y su metabolismo tiene un rol central, estando relacionado con una multitud de rutas metabólicas clave al constituir una fuente tanto de carbono como de nitrógeno reducido, sirviendo en el metabolismo bioenergético, biosintético y en la regulación redox. Además de su importancia como nutriente, la Gln puede tener también un importante papel en señalización, habiéndose comprobado que sus niveles influyen una serie de vías de señalización que igualmente son de relevancia en la célula tumoral (Márquez et al., 2015).

La Gln es un aminoácido no esencial, y la mayoría de los tejidos sanos y de células tumorales mantienen la capacidad de sintetizarla *de novo*. Sin embargo, en el contexto altamente proliferativo de la célula tumoral, la Gln puede ser considerada un aminoácido esencial condicional, ya que la célula necesita de su importación para sostener su actividad, dada la elevada demanda de Gln para propósitos bioenergéticos y biosintéticos. A este respecto, se ha acuñado el término “adicto a la Gln” (“glutamine-addicted”), para hacer referencia a multitud tumores cuyo metabolismo es dependiente del suministro de Gln (Hensley et al., 2013; Márquez y Matés, 2021; Yuneva et al., 2008).

La Gln puede servir para la obtención de energía al ser un sustrato anaplerótico, esto es, que sus productos metabólicos, vía glutaminólisis, podrán proveer de metabolitos intermediarios del ciclo TCA que pueden ser oxidados y generar NADH y FADH₂, y con ello, energía en forma de ATP mediante OXPHOS. Igualmente, la Gln podrá servir para la biosíntesis de un conjunto amplio de moléculas incluyendo nucleótidos de purina y pirimidina, hexosaminas, lípidos y aminoácidos no esenciales, así como podrá participar en la importación de otros aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales. El metabolismo de la Gln está igualmente relacionado con el control de la homeostasis redox y, por otra parte, la Gln como tal tiene también funciones en procesos de señalización celular (Altman et al., 2016; Vander Heiden y DeBerardinis 2017).

La Gln podrá ser importada a la célula por medio de transporte facilitado, a través de proteínas transportadoras como ASCT2/SLC1A5 o SN2/SLC38A5, y una vez en la célula, el primer paso de su metabolismo consistirá en la escisión del grupo amido de su cadena lateral, ya sea transfiriéndose este a otro metabolito aceptor, o liberándose en forma de amonio. En el citosol, la Gln podrá servir de forma directa para la biosíntesis proteica, o podrá participar como donador de su grupo amido en la ruta de biosíntesis de hexosaminas, concretamente de glucosamina-6-fosfato, o en las rutas de biosíntesis *de novo* de purinas o de pirimidinas, en las que es esencial al proveer los átomos de nitrógeno conformantes de los anillos de purina y pirimidina. Por otra parte, la Gln citosólica puede participar en la importación de un conjunto de aminoácidos a la célula,

a través del heterodímero transportador SLC7A5/SLC3A2 o LAT1, que funciona como un antiportador que acopla la exportación de Gln al espacio extracelular a la importación de un conjunto de aminoácidos entre los que se incluyen leucina, isoleucina, valina, metionina, tirosina, triptófano o fenilalanina (Altman et al., 2016; Bhutia y Ganapathy, 2016; Nicklin et al., 2009; Yanagida et al., 2001).

La Gln podrá igualmente ingresar a la mitocondria donde podrá sufrir desamidación para dar Glu. Actualmente se desconoce el mecanismo molecular por el que es importada a la mitocondria, habiéndose propuesto varias hipótesis al respecto. En la célula tumoral, cobra especial relevancia a este respecto la reacción catalizada por la enzima glutaminasa, sobreexpresada en multitud de tumores, que cataliza la desamidación oxidativa de la Gln para dar Glu y amonio libre, constituyendo esta reacción el primer paso de la glutaminólisis (Matés et al., 2020; Scalise et al., 2017). El Glu derivado de Gln podrá igualmente seguir diferentes destinos metabólicos, siendo clave en la biosíntesis de aminoácidos no esenciales al participar en un conjunto de reacciones de transaminación en las que el Glu dona el grupo amino a un alfa cetoácido, generando α -KG y un aminoácido no esencial, como pueden ser el aspartato o la alanina, a partir de oxalacetato o piruvato, respectivamente. Estas reacciones de transaminación podrán ocurrir tanto en la mitocondria como en el citosol, existiendo enzimas aminotransferasas localizadas en ambos compartimentos celulares. El α -KG también puede originarse a partir de Glu por la reacción de desaminación oxidativa catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH o GLUD) en la mitocondria, en la cual se libera el grupo amino como amonio libre y se reduce NAD^+ a NADH. El Glu es la principal fuente de α -KG, siendo este último un metabolito intermediario del ciclo TCA, de forma que la glutaminólisis puede “alimentar” al ciclo, contribuyendo a mantener los niveles de los intermediarios metabólicos del mismo. En situaciones de abundancia de glucosa la vía predominante de generación de α -KG a partir de Glu es la de transaminación, ya que el metabolismo de la glucosa puede proveer de los α -cetoácidos que participan en las mismas (por ejemplo, piruvato glucolítico para la generación de alanina, u oxalacetato generado por carboxilación del piruvato para la generación de aspartato). Sin embargo, cuando el suministro de glucosa está comprometido y, por tanto, su metabolismo está menos activo, la vía predominante de generación de α -KG suele ser la reacción catalizada por la GDH, que permite además generar NADH para obtención de ATP por OXPHOS (Hensley et al., 2013; Yang et al., 2009).

Por otra parte, el Glu derivado de Gln se hace indispensable para la importación de cisteína a la célula a través del sistema antiportador xCT, que exporta Glu de la célula acoplado al importe de cistina (dímero oxidado de cisteína) desde el compartimento extracelular (Conrad y Sato, 2012). Es común que en células tumorales xCT aparezca sobreexpresado para maximizar la importación de cisteína, que en este contexto puede ser considerado un aminoácido esencial condicional, dada la dependencia de muchas células tumorales de su suministro externo para la supervivencia y proliferación celular.

Las células tumorales suelen también incrementar la importación de Gln a este respecto, habiéndose comprobado que una importante proporción de la Gln que ingresa a la célula retorna al exterior celular en forma de Glu para servir en la entrada de cisteína (Collins et al., 1998; Lo et al., 2008), y que la importación de cisteína por este mecanismo puede ser esencial para la proliferación celular, ya que se ha observado que la depleción de Gln o la inhibición del transportador xCT suprimía el crecimiento en células derivadas de tumores de mama triple negativos (TNBC), siendo por tanto procesos limitantes para la proliferación celular (Timmerman et al., 2013). Este proceso tiene enorme relevancia tanto en la biosíntesis proteica como en la regulación redox, ya que tanto el Glu como la cisteína son componentes del tripéptido antioxidante glutatión (GSH), junto con la glicina. En la figura 5 se detallan esquemáticamente las principales rutas del metabolismo de la Gln. El GSH es el antioxidante más abundante en la célula y posee una función esencial en la protección y detoxificación frente a ROS, siendo normalmente la cisteína el sustrato limitante en su síntesis. Se ha comprobado en modelos experimentales con pérdida de función en el supresor tumoral KEAP1 son especialmente dependientes de la glutaminólisis para la importación de cisteína y la protección antioxidante (Romero et al., 2017).

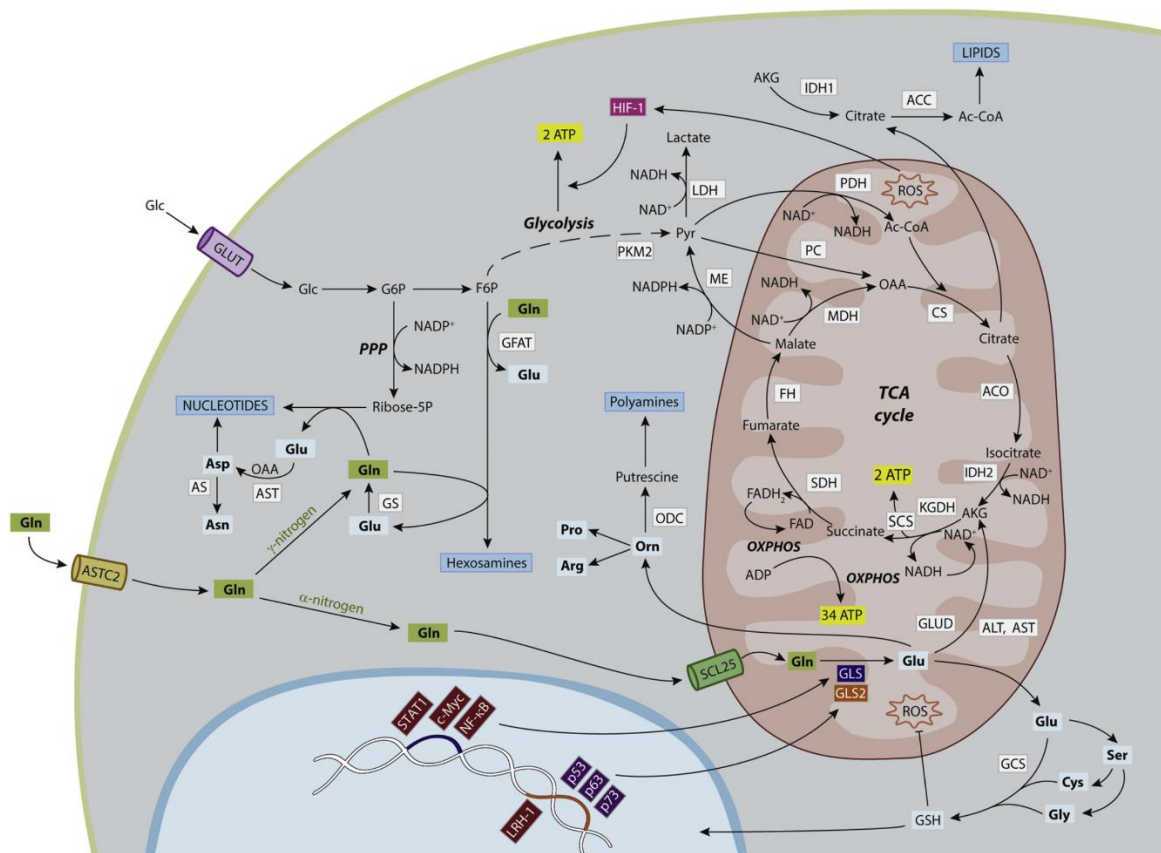


Figura 5. Visión sintética del metabolismo de la Gln. La Gln puede proveer de su nitrógeno amido en la biosíntesis de nucleótidos y hexosaminas en el citosol, o ingresar a la mitocondria y ser sustrato de las glutaminasas (GLS/GLS2) para dar Glu, que sirve en biosíntesis de glutatión o

produce α -KG (AKG) por transaminación o por la reacción GDH (GLUD). El α -KG puede ingresar al ciclo TCA sirviendo en la obtención de energía o en rutas biosintéticas. Figura tomada de Matés et al., 2020b.

El metabolismo de la Gln está comúnmente reprogramado en células cancerosas. El oncogén c-Myc tiene una gran importancia en la regulación del metabolismo de la Gln, y favorece la expresión de los transportadores ASCT2 y SN2, así como de enzimas implicadas en la utilización de la Gln como la glutaminasa (isoenzima GLS) o la carbamoil fosfato sintetasa 2 (CAD), un complejo enzimático citosólico implicado en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina y con actividad amidotransferasa, que transfiere el grupo amido de la Gln generando igualmente Glu. Estas actividades enzimáticas representan la puerta de entrada del metabolismo de la Gln en la célula y favorecen la importación de Gln al transformarla en Glu en el interior celular, consiguiendo mantener un gradiente favorable para la entrada de más Gln en la célula (Gao et al, 2009; Mannava et al, 2008; Márquez et al., 2015; Pavlova y Thompson, 2016; Wise et al., 2008).

La señalización EGFR favorece la translocación de ASCT2 a la membrana plasmática para incrementar la importación de Gln, proceso que estará inducido, por tanto, por mutaciones activadoras de esta vía de señalización (Avisar et al., 2008). Igualmente, los supresores tumorales de la familia de Rb regulan negativamente la importación de Gln a la célula, y las mutaciones que implican la pérdida de su actividad resultan en un incremento de la expresión, vía señalización mediada por E2F-3, de GLS y ASCT2, promoviendo la importación de Gln (Reynolds et al., 2014).

Por tanto, las mutaciones activadoras en oncogenes o de pérdida de función en supresores tumorales suelen suponer una sobre activación del metabolismo de la Gln, de forma similar a como ocurre con el metabolismo de la glucosa, y de hecho estos reguladores coordinan el metabolismo de ambos nutrientes. Por ejemplo, el oncogén c-Myc coordina el metabolismo de glucosa y Gln (ver figura 6). La fructosa-6-fosfato, un intermediario glucolítico y de la PPP, derivado de glucosa, es sustrato junto con la Gln de la reacción inicial en la ruta de biosíntesis de las hexosaminas, para dar glucosamina-6-fosfato en la reacción catalizada por la enzima fructosa-6-fosfato aminotransferasa 1 (GFPT1), en el citosol. Posteriormente, podrá generarse N-acetil glucosamina, que en su forma activada, UDP-N-acetil glucosamina, es sustrato de las reacciones de O y N-glucosilación de proteínas, y por tanto esencial en un contexto proliferativo, estando relacionada también con los niveles de ciertos receptores de factores de crecimiento. Los niveles de UDP-N-acetil glucosamina son directamente dependientes de los niveles de Gln y fructosa-6-fosfato (Pavlova et al., 2022; Wellen et al., 2010).

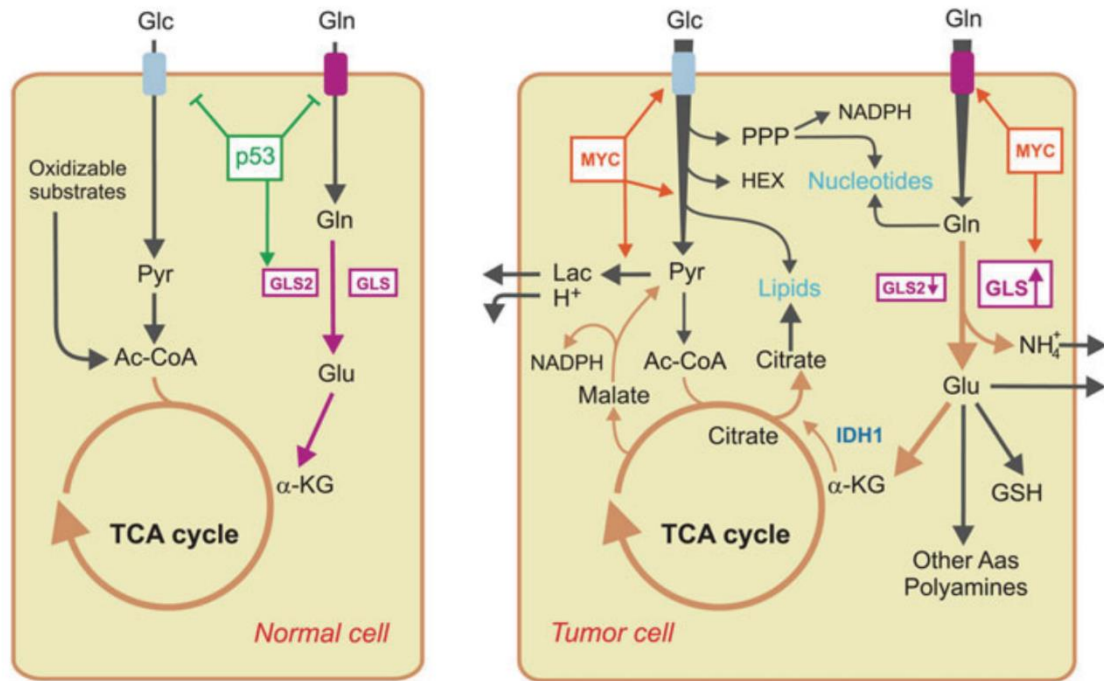


Figura 6. Principales cambios metabólicos acaecidos en el metabolismo de glucosa y Gln en la célula tumoral respecto a células normales. Oncogenes como MYC o supresores tumorales como p53 están implicados en la regulación coordinada del metabolismo de ambos nutrientes, y cambios en sus funciones favorecen la reprogramación del metabolismo en cáncer. Figura tomada de Márquez et al., 2015.

Por otra parte, uno de los metabolitos intermediarios del ciclo TCA, el oxalacetato, está implicado en la síntesis de aminoácidos no esenciales como aspartato, e indirectamente, asparagina. El Glu derivado de Gln participa en la reacción de transaminación catalizada por la enzima aspartato aminotransferasa (AST), que transfiere el grupo amino del Glu al oxalacetato, para dar α-KG y aspartato. El aspartato generado podrá servir también en la síntesis de asparagina por la acción de la enzima asparagina sintetasa (ASNS), que transfiere al aspartato el grupo amido de la Gln, y que a menudo se encuentra sobreexpresada en tumores. Además, el aspartato tiene un rol esencial en la biosíntesis *de novo* de nucleótidos, estando directamente implicado en la biosíntesis del anillo de purinas y pirimidinas (Altman et al., 2016; Sircar et al., 2012; Zhang et al., 2014).

Por tanto, el oxalacetato generado en el ciclo TCA se hace esencial en la biosíntesis de aspartato, constituyendo ésta una vía de salida de los metabolitos del ciclo TCA, de forma que estos deben ser repuestos para mantener la actividad del ciclo e igualmente proveer de sustratos para esta y otras rutas biosintéticas. Aquí la Gln tiene también un papel esencial. La enzima glutaminasa genera Glu y amonio libre en la mitocondria a partir de Gln. Este Glu mitocondrial, por medio de reacciones de transaminación, o por la acción de GDH, dará lugar a α-KG que ingresa al ciclo TCA. De hecho, se ha comprobado que la mayoría de las células en proliferación activa requieren de un suministro continuo de Gln para alimentar al ciclo TCA, siendo esta vía, la glutaminolítica, una ruta anaplerótica

principal (DeBerardinis et al., 2007). De hecho, en células tumorales con mutaciones en c-Myc, la falta de Gln resulta en una depleción de los metabolitos del ciclo TCA y consiguiente inducción de muerte celular, lo que pudo ser rescatado mediante suministro de α -KG (Wise et al., 2008; Yuneva et al., 2007).

La Gln, por tanto, está implicada en la biosíntesis de aspartato y asparagina de varios modos: actúa directamente como donador del grupo amido en la síntesis de asparagina, el Glu derivado de Gln actúa como donador del grupo amino en la generación de aspartato, e igualmente, el α -KG generado a partir de dicho Glu, puede seguir el ciclo TCA para generar oxalacetato, el otro sustrato implicado en la reacción de transaminación para generar aspartato.

La prolina es un aminoácido no esencial que puede ser sintetizado a partir de Glu, que a su vez puede derivar de Gln. El Glu sirve para la formación del intermediario pirrolina-5-carboxilato, y este es sustrato de la enzima pirrolina-5-carboxilato reductasa (PYCR1) para producir prolina. La expresión de PYCR1 está regulada por c-Myc, en coordinación con la regulación que c-Myc ejerce sobre el metabolismo de la Gln. PYCR1 está comúnmente sobreexpresada en tumores, mientras que la enzima prolina oxidasa (POX) que media en la degradación de prolina, ve su expresión reprimida por c-Myc vía miR-23b, e inducida por p53 (Donald et al., 2001; Liu et al., 2009; Liu et al., 2012).

El papel como sustrato anaplerótico de la Gln tiene como consecuencia una serie de actividades metabólicas que en ocasiones son capaces de sustituir o complementar al metabolismo de la glucosa. Por ejemplo, el aspartato generado por transaminación a partir de oxalacetato y Glu derivado de Gln puede ser exportado al citosol, donde será sustrato de una nueva reacción de transaminación, catalizada por la aspartato transaminasa citosólica (GOT1), para dar lugar a oxalacetato citosólico, que podrá ser reducido a malato para este ser sustrato de la enzima málica (ME1) citosólica que catalizará su descarboxilación oxidativa a piruvato, con la generación concomitante de NADPH que puede ser utilizado en reacciones de biosíntesis. Dicho piruvato podrá ser reducido posteriormente a lactato por la LDH y excretado de la célula (Son et al., 2013; Vander Heiden et al., 2009). Por otra parte, el α -KG generado a partir de Gln puede servir para generar citrato mediante una reacción de carboxilación reductiva. Esta es una reacción no canónica catalizada por las isoenzimas isocitrato deshidrogenasas (IDH) en las cuales se fija una molécula de CO_2 para dar isocitrato a partir de α -KG, ya ocurra esto en el citosol (IDH1) o en la mitocondria (IDH2). En cualquier caso, el isocitrato podrá generar a su vez citrato, que podrá servir para la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol en el citosol, mediante generación de acetil-CoA citosólico por la acción de ACLY. Esta ruta puede ser especialmente relevante en determinados contextos moleculares en los que la generación de acetil-CoA mitocondrial procedente de piruvato glucolítico esté comprometida, como pueden ser ciertas situaciones hipóxicas en las que el funcionamiento de la ETC queda comprometido por la deficiencia de O_2 , que inducen el metabolismo reductivo. Esto también puede ocurrir en situaciones pseudohipóxicas,

originadas por la actividad de determinados oncogenes o carencia de actividad de supresores tumorales, como pueden ser mutaciones en VHL, o casos en los que mutaciones activadoras de la ruta de señalización EGFR inducen carboxilación reductiva al fosforilar a IDH1 en los residuos de tirosina Y42 y Y391, activándola (Chen et al., 2019a; Chen et al., 2019b; Metallo et al., 2011; Wise et al., 2011). Igualmente, se ha documentado que modelos de esferoides (cultivo *in vitro* 3D) de células de cáncer de pulmón en condiciones normóxicas requieren de la generación de citrato reductivo por IDH1 en el citosol a partir de α -KG generado desde Gln para el mantenimiento de la homeostasis redox. El citrato generado en el citosol se importaba posteriormente a la mitocondria pudiendo allí seguir un metabolismo oxidativo, vía IDH2, con la generación de NADPH en la mitocondria, que servía para la detoxificación de las ROS mitocondriales. Este modo de funcionamiento metabólico no se observaba en estas mismas células cultivadas en monocapa anclada al sustrato, siendo inducido por el crecimiento independiente de sustrato (Jiang et al., 2016).

La generación de acetil-CoA citosólico procedente de Gln por esta vía también podrá tener implicaciones en regulación epigenética, ya que el acetil-CoA extra mitocondrial puede participar en las reacciones de acetilación de proteínas como donador del grupo acetilo, incluyendo las modificaciones de histonas catalizadas por las enzimas histona acetil transferasas (HAT). Por otra parte, el metabolismo anaplerótico de la Gln también será relevante a este respecto por otro mecanismo, dado el papel del α -KG como sustrato de las enzimas de la familia de dioxigenasas dependientes de α -KG. Estas enzimas están implicadas en reacciones de desmetilación de diversos sustratos, entre los que se encuentran ADN, ARN y proteínas, incluyendo histonas, lo que hace del α -KG un componente esencial de los mecanismos de señalización celulares y la regulación epigenética (Hensley et al., 2013). Dentro de las dioxigenasas dependientes de α -KG se incluyen la familia TET de hidroxilasas/demetilasas de ADN, las histona demetilinas con dominios Jumonji C (JmjC), las demetilinas de ARNm FTO y ALKBH5, y una familia de prolil-hidroxilasas que, entre otros, regulan los niveles de HIF-1 α . Las reacciones catalizadas por estas enzimas implican la oxidación de α -KG a succinato y, por tanto, los niveles de α -KG serán sustancialmente relevantes de cara a la tasa de desmetilación de sustratos, y con ello, tendrán un impacto sobre la expresión génica y la función proteica. Estas enzimas son susceptibles de inhibición por similitud estructural con el α -KG por parte de su producto de reacción, succinato, y también por el fumarato y por el oncometabolito 2-hidroxi-glutarato (2-HG), por lo que los niveles de estos serán igualmente moduladores de su actividad. Se han encontrado casos en los que mutaciones en las enzimas que metabolizan succinato y fumarato, succinato deshidrogenasa (SDH) o fumarato hidratasa (FH), respectivamente, causan una acumulación de estos metabolitos ocasionando un fenotipo de hipermetilación, así como altos niveles de HIF-1 α (Linehan et al., 2019; Pavlova y Thompson, 2016; Selak et al., 2005). En la figura 7 se resumen los principales mecanismos epigenéticos influenciados por la reprogramación del metabolismo.

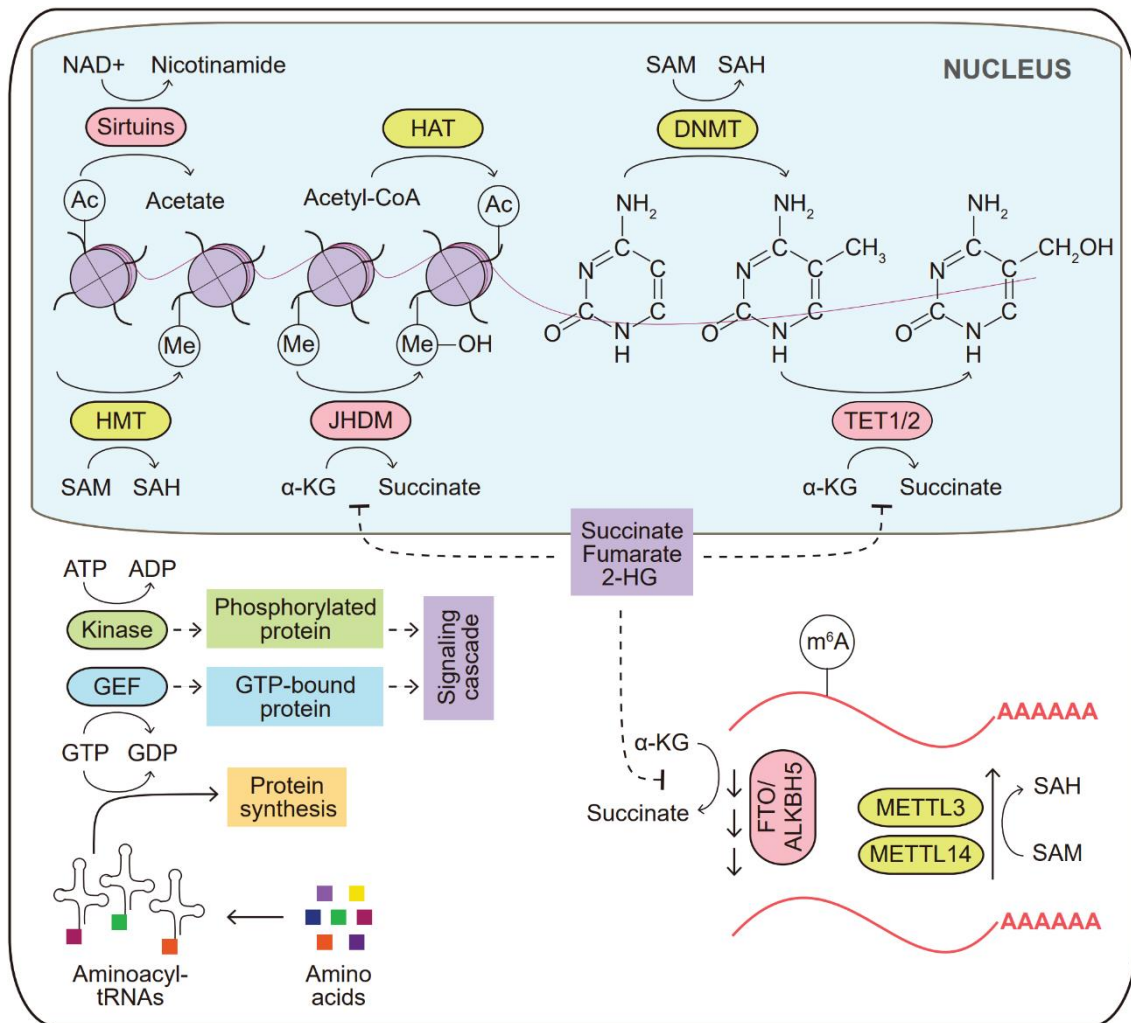


Figura 7. Influencia de cambios metabólicos sobre la regulación epigenética, incluyendo (i) la generación de acetil-CoA disponible para reacciones de acetilación por enzimas histona acetil transferasas (HAT); (ii) la disponibilidad de α -KG como sustrato, o (iii) inhibición por succinato, fumarato o 2-hidroxiglutarato (2-HG), de reacciones de desmetilación de nucleótidos de 5-metil citosina en el ADN por enzimas como TET1/2, de desmetilación de residuos de histonas por enzimas como JHDM (Jumonji-domain histone demethylase), o de desmetilación en nucleótidos de 6-metiladenina en el ARN. Figura tomada de Pavlova et al., 2022.

La Gln es indispensable al proveer nitrógeno reducido para la biosíntesis *de novo* de nucleótidos, una ruta biosintética esencial en células en proliferación activa, ya que estas deben replicar su ADN para poder dividirse. La Gln dona su grupo amido en la construcción del anillo tanto de purinas, como de pirimidinas, en diferentes pasos de ambas rutas metabólicas. En el caso de las purinas, tres moléculas de Gln son necesarias para la síntesis de nucleótidos de guanina, y dos para nucleótidos de adenina. En cuanto a las pirimidinas, dos moléculas de Gln donarán su grupo amido en la síntesis de nucleótidos de citosina, y una será necesaria para sintetizar nucleótidos de timina o uracilo. En muchos casos, la Gln también será indispensable para la célula tumoral en la biosíntesis de nucleótidos por otro motivo: la generación de aspartato derivado de Glu

u oxalacetato glutaminolíticos. El oncogén c-Myc favorece la importación de Gln a la célula, y también promueve la biosíntesis *de novo* de nucleótidos, al inducir la expresión de una serie de enzimas implicadas en la ruta. La expresión de la enzima fosforribosil pirofosfato sintetasa 2 (PRPS2) es también inducida por c-Myc. La PRPS2 utiliza como sustratos ribosa-5-fosfato procedente de la PPP y pirofosfato para generar fosforribosil pirofosfato (PRPP), esencial en las rutas de biosíntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, así como en las rutas de reciclaje de nucleótidos (Cunningham et al., 2014). Igualmente, c-Myc induce la expresión de CAD, implicado en la iniciación de la ruta de biosíntesis de pirimidinas que presenta varias actividades enzimáticas, entre ellas, la actividad amidotransferasa por la cual transfiere el grupo amido de la Gln en una primera reacción para generar carbamoil fosfato. CAD, entre otros, utiliza también aspartato como sustrato para empezar a sintetizar el anillo de pirimidina (Eberhardy y Farnham, 2001). La actividad CAD es también inducida por señalización MAPK y por señalización mTOR. Altos niveles de Gln pueden inducir la actividad de mTOR por medio de proteínas sensoras de los niveles de aminoácidos que a su vez activan a mTOR. La Gln puede mediar esta activación tanto por sí misma como a través de la importación de otros aminoácidos o su biosíntesis. Esto se ha comprobado también en algunas células tumorales que emplean el transportador LAT1 para importar a la célula un conjunto de aminoácidos en antiporte con Gln, entre ellos leucina, un potente activador de mTOR; de esta forma, la Gln puede inducir señalización mTOR, impulsando la actividad de un conjunto de dianas de esta vía de señalización, entre las que se encuentra CAD (Duran et al., 2012; Jewell et al., 2015; Nicklin et al., 2008).

Otras enzimas como la timidilato sintasa (TS) o las inosina monofosfato deshidrogenasa 1 y 2 (IMPDH1/2) son igualmente inducidas por c-Myc. Mutaciones inactivadoras de p53 también activan la expresión de enzimas implicadas, entre ellas IMPDH1 y 2, la guanosina monofosfato sintetasa (GMPS), o las enzimas de la ruta de reciclaje de pirimidinas desoxicitidina quinasa (DCK) o timina quinasa (TK1) (Kollareddy et al., 2015).

La Gln no sólo sirve en la biosíntesis de proteínas como aminoácido conformante de las mismas, sino que los niveles de Gln tienen una función reguladora de la expresión al funcionar como indicadores de la disponibilidad de aminoácidos. En condiciones de bajos niveles de aminoácidos/Gln, los ARN transferentes aceptores de Gln (tRNA^{Gln}) quedan selectivamente descargados de Gln, lo que lleva a la depleción preferente de proteínas ricas en regiones de poliglutamina, al minimizarse la traducción de estas. Entre estas proteínas se encuentran proteínas reguladoras de la transcripción como la proteína de unión a la caja TATA (TBP, "TATA-binding protein"), la subunidad 12 del complejo mediator, o el co-activador transcripcional CBP. Adicionalmente, los tRNAs descargados pueden activar a la quinasa GCN2, lo que resulta en una reducción de la traducción (Pavlova et al., 2020). Por todo ello, la Gln *per se* posee un papel en regulación a diferentes niveles y su abundancia puede inducir una señalización protumorigénica.

El metabolismo de la Gln por parte de la célula tumoral tiene igualmente una importante repercusión en la modulación de la actividad del sistema inmune frente al tumor. Las células T efectoras son protagonistas en la respuesta inmune antitumoral, y los bajos niveles de nutrientes que suelen encontrarse en el espacio extracelular del microambiente tumoral pueden limitar su función. En respuesta a una inducción antigénica, los linfocitos T son activados y requieren de la puesta en marcha de un programa anabólico que permita la proliferación y diferenciación a células T efectoras, encargadas de llevar a cabo el ataque inmune al tumor. Las células T requieren de la disponibilidad de aminoácidos no esenciales como serina y alanina, y su activación es particularmente dependiente de los niveles de glucosa y Gln, siendo extremadamente sensibles a la depleción de glucosa y Gln en el microambiente tumoral, así como a las condiciones de estrés oxidativo que suelen darse en este entorno. Particularmente, la metabolización de Gln en la mitocondria por parte de las glutaminasas, comúnmente sobreexpresadas en tumores, ha demostrado tener un papel inmunosupresor al favorecer el flujo de entrada de Gln a la célula tumoral y, por tanto, bajos niveles de Gln en el medio extracelular. De hecho, se comprobó que la pérdida de la función glutaminasa en células tumorales de mama triple negativas, por delección del gen *GLS*, incrementó en un orden de magnitud los niveles de Gln extracelulares, lo que favoreció la actividad antitumoral de los linfocitos T y su capacidad infiltrativa en el tumor (Edwards et al., 2021; Pavlova et al., 2022).

5. Metabolismo Redox y Cáncer

Junto con la reprogramación del metabolismo energético y biosintético, los cambios en la regulación del balance redox celular constituyen una alteración clave en la reprogramación metabólica de la célula tumoral (DeBerardinis y Chandel, 2016).

El metabolismo oxidativo conlleva la aparición concomitante de moléculas con capacidad oxidante. En el caso de la célula tumoral, el acelerado metabolismo bioenergético y biosintético suelen ocasionar una acumulación de moléculas oxidantes y, por tanto, la aparición de estrés oxidativo, habiéndose observado esto en multitud de tumores y células tumorales en cultivo (Szatrowski y Nathan, 1991). Las ROS, son un conjunto diverso de moléculas que contienen átomos de oxígeno reactivos en su estructura, presentando electrones desapareados y, por tanto, con una elevada capacidad oxidante. Las ROS son tanto subproductos del metabolismo celular oxidativo como moléculas activamente producidas en la célula, teniendo importantes funciones homeostáticas, como es su implicación en señalización celular y procesos de diferenciación; y siendo también relevantes ya que pueden causar daño oxidativo a los componentes celulares. Las principales ROS son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y los hidroperóxidos de lípidos (LOOH). La mayoría de las ROS intracelulares derivan de la transferencia de un electrón

al oxígeno molecular para formar el radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$, que a su vez puede ser sustrato en la reacción catalizada por las enzimas superóxido dismutasas (SOD), que transforman dos iones superóxido en una molécula de peróxido de hidrógeno y una molécula de agua. El H_2O_2 , a su vez, puede aceptar un electrón procedente del Fe^{2+} libre, generando Fe^{3+} , y dar lugar al radical hidroxilo $\cdot OH$ por la reacción de Fenton. Dicho radical puede dar lugar a LOOH en presencia de ácidos grasos poliinsaturados. Por otra parte, el nitrógeno también puede combinarse con el oxígeno para dar lugar a las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), entre las que se cuenta el óxido nítrico ($\cdot NO$), o el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Harris y DeNicola, 2020; Sies, 2017; Winterbourn, 1995).

Las ROS, destacando $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ y LOOH, podrán causar daño oxidativo a componentes celulares como lípidos, proteínas o ADN, lo que potencialmente resultará en una pérdida de integridad en las membranas celulares, cambios en la función o actividad de las proteínas, y daño y generación de mutaciones en el ADN, respectivamente, esto último pudiendo causar inestabilidad genómica. Por tanto, las ROS pueden tener un efecto protumorigénico al oxidar bases nitrogenadas del ADN, principalmente de guanina, para dar lugar a 8-oxoguanina. En consecuencia, los mecanismos de reparación del ADN podrán corregir este daño oxidativo, proceso que puede dar lugar a la aparición de errores que lleven a la generación de mutaciones. Las ROS, por otra parte, poseen también una serie de funciones fisiológicas normales en el mantenimiento de la homeostasis *in vivo*, que pueden igualmente verse desreguladas y reprogramadas en el caso de la célula cancerosa, como pueden ser sus funciones a nivel de señalización celular, adscritas principalmente al H_2O_2 (Harris y DeNicola, 2020; Martínez-Reyes y Chandel, 2021).

En células con elevada actividad proliferativa, como las tumorales, puede ocurrir que la cadena transportadora de electrones se encuentre sobrecargada y su actividad sobrepase a la tasa de generación de ATP por parte del complejo enzimático ATP sintasa, lo que lleva a una elevada tasa de generación de ROS en la mitocondria. La función de las ROS en la célula es compleja y altamente dependiente del tipo de ROS generada, ya que estas difieren en sus características, así como de sus niveles: si bien unos muy altos niveles de ROS podrán ser perjudiciales para la célula tumoral, dado el daño oxidativo que generarán a los componentes celulares y por tanto pudiendo comprometer la viabilidad celular, existirá también un intervalo de concentraciones de ROS que podrán beneficiar a la célula, creando un entorno redox favorable para la tumorigénesis, pudiendo llevar a cabo una importante función en señalización celular, en muchos casos, induciendo una señalización protumorigénica. Por tanto, los niveles de ROS en la célula habrán de estar altamente regulados, y esto se hará por medio de la regulación de su tasa de generación, así como de su tasa de degradación, interviniendo aquí diversos sistemas antioxidantes capaces de detoxificar ROS. La figura 8 muestra los efectos que

diferentes niveles de ROS pueden tener en la célula, así como diferentes mecanismos de generación y detoxificación de ROS (Pavlova et al., 2022; Sullivan y Chandel, 2014).

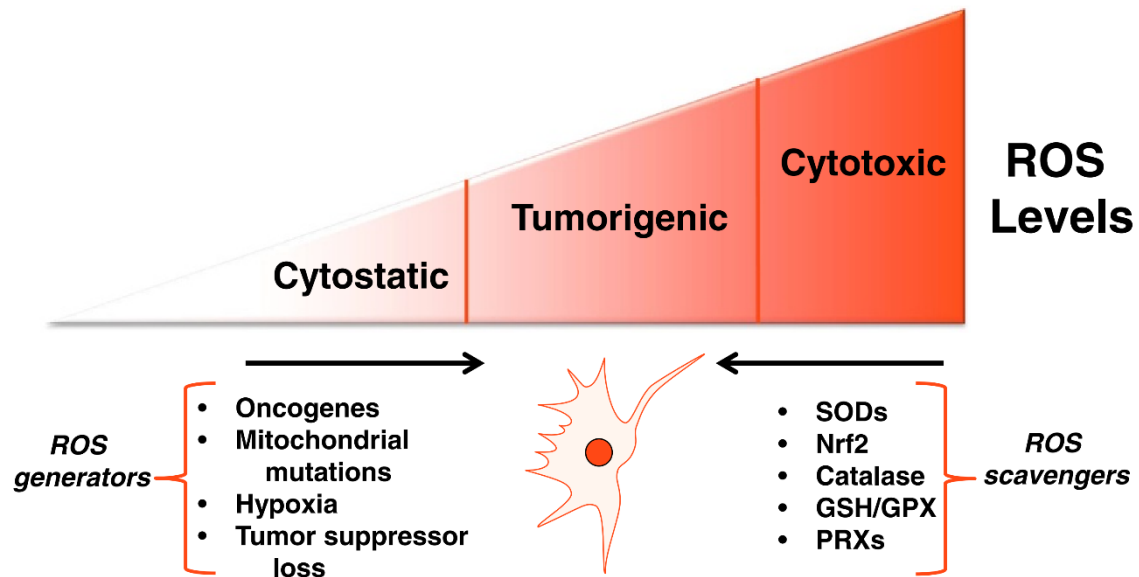


Figura 8. Niveles variables de ROS en la célula podrán tener efectos protumorigénicos o antitumorales, dependiendo del caso, y son modulados por distintos mecanismos generadores de ROS en la célula y por la actuación de mecanismos antioxidantes que detoxifican ROS. La célula tumoral utiliza estos mecanismos para regular los niveles de ROS en un rango óptimo para el desarrollo oncogénico. Figura tomada de Sullivan y Chandel, 2014.

Existen mecanismos enzimáticos cuya función es la generación de ROS en la célula, como son las enzimas NADPH oxidasas, que utilizan O_2 y NADPH para producir $O_2^{\cdot-}$. Estas enzimas fueron por primera vez descubiertas en fagocitos, donde se observó que tenían una función en la eliminación de patógenos fagocitados al generar un enorme estrés oxidativo local en el fagosoma (estallido respiratorio). Sin embargo, posteriormente se encontró que estas enzimas se expresaban también en múltiples tejidos donde estaban igualmente implicadas en funciones no inmunes. El anión superóxido es poco estable y puede convertirse rápidamente en H_2O_2 por la acción de las enzimas SOD, principalmente las SOD1 (citoplasmática) y SOD2 (mitocondrial), o bien hacerlo espontáneamente. La carga negativa del $O_2^{\cdot-}$ previene que pueda atravesar las membranas celulares. En la célula, el $O_2^{\cdot-}$ reacciona con complejos Fe-S resultando en la liberación de hierro, así como puede reaccionar con $\cdot NO$ para dar lugar a peroxinitrito. El $ONOO^-$ puede reaccionar con proteínas causando oxidación o nitración de aminoácidos, con el ADN pudiendo inducir rupturas de doble hebra, o con lípidos ocasionando peroxidación de lípidos. Por tanto, las ROS no son únicamente subproductos tóxicos del metabolismo, sino que existen actividades enzimáticas dedicadas a su generación, dada su importancia en una serie de procesos biológicos. En el caso del cáncer, es conocida la actividad de oncogenes que inducen la función NADPH oxidasa para favorecer un incremento protumorigénico de ROS en la célula tumoral

(Brown y Griendling, 2009; Harris y DeNicola, 2020; Jiang et al., 2011; Keyer e Imlay, 1996).

No obstante, la principal fuente de ROS a nivel celular es la mitocondria, habiéndose observado que la mitocondria puede llegar a convertir hasta el 1% del oxígeno que consume en radicales superóxido, aunque en condiciones normales esa tasa es más baja, habiéndose estimado alrededor del 0,1% (Handy y Loscalzo, 2012; Quinlan et al., 2012). La ETC no es un sistema perfecto y su actividad conlleva una cierta tasa de generación de superóxido, que será mayor si el funcionamiento de la ETC está comprometido, como puede ocurrir en la célula tumoral. Esta situación puede darse cuando la mitocondria no está sintetizando ATP, de forma que la disponibilidad de ADP en la matriz mitocondrial resulta limitante para el flujo completo de electrones a través de la ETC, situación que igualmente correlaciona con una elevada relación NADH/NAD⁺ en la mitocondria. Los complejos I, II y III de la ETC podrán generar iones superóxido con capacidad de participar en señalización celular, por medio de la transferencia de un único electrón al oxígeno molecular en una reacción no enzimática. Los complejos I y II generan iones superóxido en la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III puede hacerlo a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, lo que puede favorecer que las ROS generadas tengan un más fácil acceso al citoplasma, y con ello, una mayor implicación en procesos de señalización celular entre otros. Se ha visto que las ROS generadas por el complejo III son necesarias en una serie de procesos incluyendo la inmunidad adaptativa, la diferenciación celular o la detección de los niveles de oxígeno (Chandel 2021; Harris y DeNicola, 2020; Muller et al., 2004; Murphy, 2009; Sullivan y Chandel, 2014). En la figura 9 se resumen los principales tipos de ROS en la célula, así como los principales actores moleculares implicados en sus mecanismos de generación y mecanismos antioxidantes.

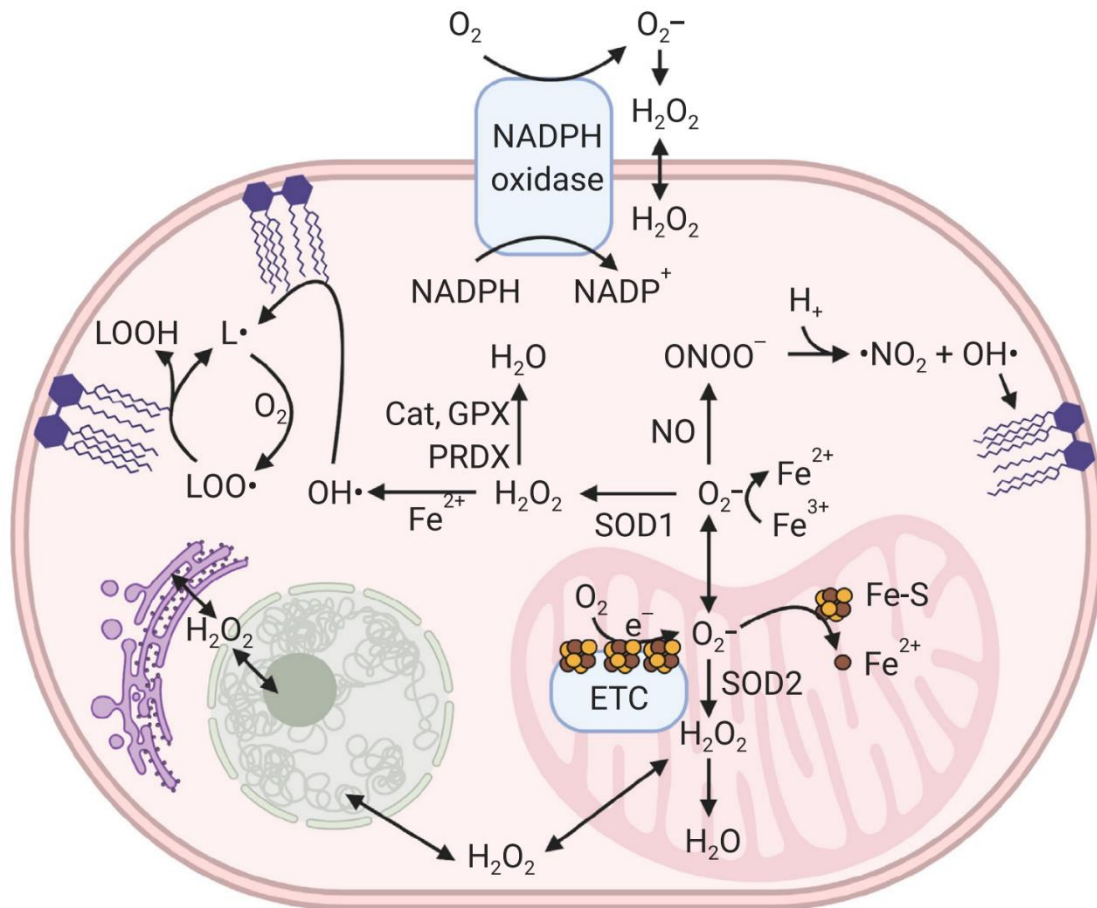


Figura 9. Principales ROS en la célula y sus mecanismos de generación. La ETC en la mitocondria y las enzimas NADPH oxidasas son las principales fuentes de generación de ROS, particularmente de iones superóxido, que podrán dar lugar por diferentes mecanismos al resto de ROS, incluyendo peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo, lípidos peroxidados o peroxinitrito. Figura tomada de Harris y DeNicola, 2020.

El peróxido de hidrógeno es descrito como la principal ROS causante de oxidación de proteínas, ejerciendo a bajas concentraciones una función reguladora y a altos niveles induciendo estrés oxidativo. El efecto sobre la función de la proteína dependerá del grado de oxidación llevado a cabo por las ROS. Un alto grado de oxidación podrá llevar a la generación de cambios irreversibles, como la generación de ácidos sulfónicos en residuos de cisteína, que implican una pérdida de la función de la proteína. Sin embargo, una oxidación moderada podrá alterar la función de la proteína produciendo cambios a nivel molecular, como la formación de puentes disulfuro, ácidos sulfénicos o ácidos sulfínicos, que son típicamente reversibles, y que son los preponderantes en señalización celular y regulación de la función proteica (Harris y DeNicola, 2020).

Ya en la década de 1990 se comprobó que el H_2O_2 podía actuar inhibiendo la función de enzimas fosfatasa para con ello promover la señalización dependiente de factores de crecimiento (Bae et al., 1997; Sundaresan et al., 1995). El H_2O_2 posee la capacidad de

difundir a través de las membranas celulares y es más estable que los radicales hidroxilo y superóxido, lo que hace que tenga un rol más selectivo en señalización que estos últimos, y que pueda ejercer sus efectos en lugares más distantes del sitio de generación. Un mecanismo principal de señalización del H_2O_2 es a través de su capacidad de oxidar los grupos tiol (Cys-SH) o tiolato (Cys-S⁻) de la cadena lateral de residuos de cisteína en proteínas para generar el grupo ácido sulfénico (Cys-SOH) (Finkel, 2003; Finkel, 2012); muchos residuos de cisteína tienen una función reguladora, y esta modificación puede modular la actividad de la proteína y/o sus interacciones, o si se trata de residuos de cisteína localizados en el sitio activo de una enzima, la oxidación ocasionará una inhibición de su actividad, teniendo esto especial relevancia en proteínas implicadas en cascadas de señalización. El H_2O_2 es capaz de oxidar selectivamente determinados residuos para lograr un efecto señalizador concreto, consiguiendo en células tumorales llevar a cabo un efecto señalizador redox que induzca proliferación, supervivencia e invasión, como es la oxidación de residuos de cisteína reactivos presentes en PTEN que llevan a su inactivación y, con ello, a pérdida de la represión, o activación constitutiva, de la vía de señalización de PI3K-AKT. Igualmente, otras fosfatasa son también objeto de oxidación e inactivación por parte del H_2O_2 , como la proteína fosfatasa 2A (PP2A) o la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), que funcionan desfosforilando a AKT en diferentes residuos para inactivarla. De este modo, el H_2O_2 elimina la represión de AKT e igualmente impulsa la señalización de la vía de PI3K/AKT por este mecanismo (Sullivan y Chandel, 2014); por otra parte, SHP2, y otras proteínas fosfatasas de las MAPK son también dianas de oxidación del H_2O_2 , lo que promoverá la señalización pro oncogénica de estas rutas (Kamata et al., 2005; Tonks, 2006; Tsutsumi et al., 2017). De hecho, se ha comprobado que minimizar los niveles de H_2O_2 en células tumorales mediante inhibición de la ETC o de las NADPH oxidasas, puede resultar en un efecto antitumoral (Konaté et al., 2020; Martínez-Reyes y Chandel, 2021). Igualmente, las ROS son capaces de estabilizar a las distintas subunidades de HIF α , incluyendo HIF-1 α , mediante la inactivación de la enzima prolil hidroxilasa PHD2, implicada en su degradación. Por este mecanismo, las ROS pueden inducir una reprogramación del metabolismo, como consecuencia de la activación de la transcripción de un conjunto de genes diana de HIF-1 α . Estos residuos de cisteína reactivos, y por tanto las proteínas que los contienen, estarán sujetos a una regulación redox, pudiendo ser oxidadas por ROS, o reducidas por moléculas antioxidantes (Manford et al., 2020; Sullivan y Chandel, 2014; Xiao et al., 2020).

Los antioxidantes celulares son todas aquellas moléculas, ya sean enzimas o cofactores, capaces de participar en la eliminación de ROS. El H_2O_2 puede ser detoxificado a agua y oxígeno molecular por la reacción de la enzima catalasa (CAT), una oxidoreductasa que utiliza como cofactores el grupo hemo y el manganeso. El H_2O_2 puede también dar lugar a agua por la reacción de reducción catalizada por las enzimas peroxirredoxinas (PRDXs), acoplada a la oxidación de un residuo de Cys del centro catalítico de la enzima. Las enzimas tiorredoxinas (TXNs) y sulfarredoxinas (SRXs), catalizarán la reducción de dicho

residuo de Cys de las PRDXs para regenerar la PRDX activa, oxidando sus propios residuos de Cys del centro catalítico en el proceso. Las TXNs estarán implicadas en la reducción de puentes disulfuro (S-S) formados en las PRDXs, mientras que las SRXs reducirán grupos ácido sulfinico, con mayor grado de oxidación. Existen diferentes isoenzimas de PRDXs y TXNs localizadas en distintos compartimentos celulares (Cox et al., 2009; Lu y Holmgren, 2014; Trujillo et al., 2007). A su vez, existen enzimas implicadas en la reducción de las TXNs para regenerar la enzima activa, estas son las tiorredoxina reductasas 1 y 2 (TXNRD1/2), que acoplan la reducción de los residuos de Cys de las TXNs a la oxidación de NADPH (Arner, 2009).

Por otra parte, el antioxidante celular más abundante es el tripéptido GSH, formado por los aminoácidos Glu, cisteína y glicina. Es sintetizado en dos reacciones consecutivas, la primera es la reacción de condensación de Glu y cisteína para dar el dipéptido γ -glutamilcisteína, catalizada por la subunidad catalítica glutamato-cisteína ligasa (GCLC) o también llamada gamma glutamilcisteína sintetasa, constituyendo esta la reacción limitante de la biosíntesis de GSH. La segunda reacción es la adición de glicina para formar el tripéptido, catalizada por la enzima glutatión sintetasa (GSS). En la mayoría de los contextos, la Cys constituye el sustrato limitante de la tasa de biosíntesis de glutatión (Lu, 2009), aunque esto puede variar especialmente en el caso de algunas células tumorales, en los que la glicina (DeNicola et al., 2015) o el Glu pueden resultar limitantes. Este último caso se ha encontrado en células de glioma que albergan mutaciones en IDH1 y por ello acumulan el oncometabolito D-2-HG, que se observó era capaz de inhibir a las aminotransferasas BCAT1 y BCAT2, que utilizan α -KG y aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) como sustrato, pudiendo generar Glu y el correspondiente α -cetoácido de cadena ramificada, en una reacción reversible de transferencia del grupo amino. Por tanto, en este contexto molecular la generación de Glu por transaminación quedaba comprometida y el Glu se hacía limitante para la biosíntesis de GSH, entre otros procesos (McBrayer et al., 2018). El GSH es utilizado como cofactor en la detoxificación de ROS en reacciones catalizadas por las enzimas de las familias de las GSH-S-transferasas (GSTs) y las GSH-peroxidasas (GPXs). Las GPXs catalizan la reducción de hidroperóxidos acoplada a la oxidación de los grupos tiol de dos moléculas de GSH (reducido), que pasan a formar un dímero (GSSG) unidos por un puente disulfuro (S-S), previa oxidación de un grupo selenol de un residuo de selenocisteína de la enzima que es reducido por las dos moléculas de GSH que se oxidan. El dímero GSSG podrá ser reciclado de nuevo por la acción de la enzima glutatión reductasa (GR o GSR), que regenera las dos moléculas de GSH por medio de la oxidación de NADPH (Ingold et al., 2018; Lu, 2013). Existen diferentes isoenzimas GPX que varían en su localización y preferencia por el sustrato, particularmente, la GPX1 se localiza en el citoplasma de prácticamente todas las células de mamífero y detoxifica preferencialmente el H_2O_2 generando H_2O . Por otra parte, GPX4 tiene preferencia por la detoxificación de LOOHs, dando lugar a grupos alcohol en los correspondientes lípidos (LOHs), y por ello teniendo

un importante rol en la protección frente a la ferroptosis (Margis et al., 2008; Yang et al., 2014).

La generación de peróxidos de lípidos puede inducir ferroptosis, un tipo de muerte celular dependiente de hierro causada por la peroxidación de fosfolípidos, dada la función esencial del hierro en la generación de radicales hidroxilo por la reacción de Fenton. El estrés oxidativo puede ocasionar la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados conformantes de fosfolípidos, ocasionando la acumulación de fosfolípidos peroxidados que podrá resultar en una pérdida irreversible de la organización estructural de membrana, e igualmente podrá dar lugar a la formación de un conjunto de subproductos tóxicos altamente reactivos, como el malondialdehído (MDA) o el 4-hidroxinonenal (4-HNE), que ejercen efectos citotóxicos dirigidos contra diversos componentes celulares incluyendo otros lípidos, proteínas y el ADN, todo ello resultando en muerte celular (Anandhan et al., 2020; Tang et al., 2020). Al respecto de la ferroptosis, existen una serie de puntos clave a nivel molecular implicados en la prevención o inducción de esta: la importación de cisteína (en forma del dímero oxidado, cistina) a la célula por medio del sistema xCT, la biosíntesis de GSH, y la función antioxidante de GPX4, fundamental en la detoxificación de LOOHs y, por tanto, previniendo su acumulación y que se desencadene la ferroptosis. Este mecanismo antioxidante constituye la vía más conocida de protección celular frente a la ferroptosis, pero se han ido documentado otros mecanismos paralelos. La figura 10 sintetiza este y otros mecanismos implicados en el control de la inducción de ferroptosis (Jiang et al., 2021). La ferroptosis puede tener una enorme importancia en el contexto de la célula tumoral, en la cual existe una elevada generación de ROS y por tanto, una situación de estrés oxidativo. La célula tumoral deberá poner en marcha mecanismos moleculares que prevengan el daño oxidativo excesivo y permitan la supervivencia celular. A este respecto, suelen sobre activar al factor de transcripción NRF2 o “factor nuclear eritroide similar al factor 2” (“nuclear factor erythroid 2-related factor 2), considerado un regulador clave de la respuesta antioxidante celular al inducir la expresión de un conjunto de genes implicados que contienen una secuencia “ARE” (Antioxidant Response Element) en su promotor, reconocida por NRF2. Entre estos se incluyen, entre muchos otros genes, aquellos involucrados en la generación de NADPH, el antiportador de cistina-glutamato xCT, genes de biosíntesis de glutatión, metabolismo del hierro, reducción de TXNs y PRDXs dependiente de GSH y sistemas antioxidantes *per se*, como GPX4 (Anandham et al., 2021; Dodson et al., 2019; Habib et al., 2015; Ye et al., 2014).

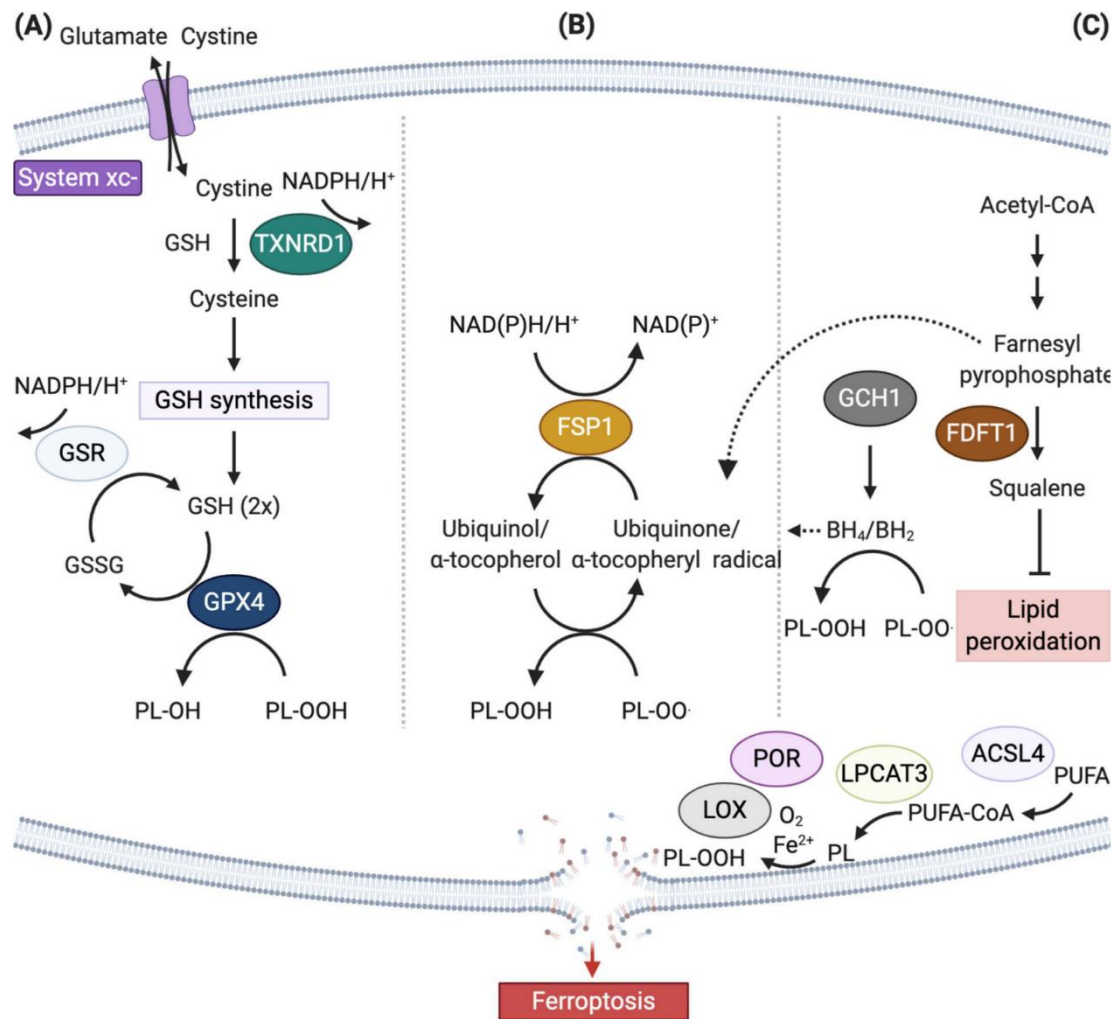


Figura 10. Síntesis de mecanismos moleculares protectores frente a la ferroptosis. (A) Vía canónica de control frente a la ferroptosis, que implica la importación de cistina en antiporte con Glu, biosíntesis de GSH, acción de la GPX4 y reciclaje de GSSG a GSH por medio de GSR. (B) El ciclo ubiquinol/ubiquinona o (C) la biosíntesis de escualeno y la biosíntesis de tetrahidrobiopterina (BH₄) y dihidrobiopterina (BH₂) por acción de GCH1, se han encontrado como mecanismos independientes de protección frente al daño oxidativo y ferroptosis. Figura tomada de Jiang et al., 2021.

Por tanto, es un rasgo común en las células cancerosas incrementar la producción metabólica de NADPH y GSH, así como sobreactivar NRF2 para incrementar la expresión de proteínas antioxidantes (Harris et al., 2015). En condiciones normales, NRF2 está continuamente siendo marcado para su degradación proteolítica por la proteína KEAP1, un supresor tumoral que funciona como un regulador negativo de NRF2 y previene de esta forma la inducción de los genes cuya expresión es dependiente de NRF2. En células tumorales son habituales mutaciones inactivadoras en KEAP1, o mutaciones de ganancia de función en NRF2, como lo son las deleciones observadas en cáncer de pulmón de la región de unión de KEAP1 a NRF2, que generan un NRF2 resistente a la regulación por KEAP1 (Goldstein et al., 2016). Por otra parte, la señalización prooncogénica de versiones

mutantes de ganancia de función de los oncogenes KRAS, B-RAF y c-Myc inducen la sobreexpresión NRF2 (DeNicola et al., 2011).

Otro importante mecanismo de respuesta antioxidante es la inducción de la expresión del “regulador de la glucólisis y la apoptosis inducido por TP53” (TIGAR, por sus siglas en inglés), una enzima fosfatasa cuya expresión activa la vía oxidativa de la PPP, incrementando la producción de NADPH para promover la función de los sistemas antioxidantes (Martínez-Reyes y Chandel, 2021).

El balance redox, controlado por la tasa de generación de ROS y la función de antioxidantes puede tener efectos tanto pro tumorigénicos como antitumorales, dependiendo del contexto, niveles y actores moleculares implicados. Por ejemplo, la activación NRF2 minimiza la degradación del factor pro metastásico BACH1, promoviendo la metástasis. Igualmente, la expresión TIGAR aumenta durante la iniciación de tumores pancreáticos para prevenir el daño oxidativo causado por ROS en este estadio, pero posteriormente disminuye para favorecer la migración, invasión y capacidad metastásica mediada por señalización MAPK. Por tanto, la regulación de los niveles y tipos de ROS podrá variar en el tiempo para optimizar las capacidades de la célula tumoral en diferentes estadios del desarrollo oncogénico (Cheung et al., 2020; Lee et al., 2014; Lignitto et al., 2019; Martínez-Reyes y Chandel, 2021; Wiel et al., 2019). La figura 11 resume un conjunto de rutas metabólicas que se encuentran reprogramadas para favorecer la sobreactivación de mecanismos antioxidantes.

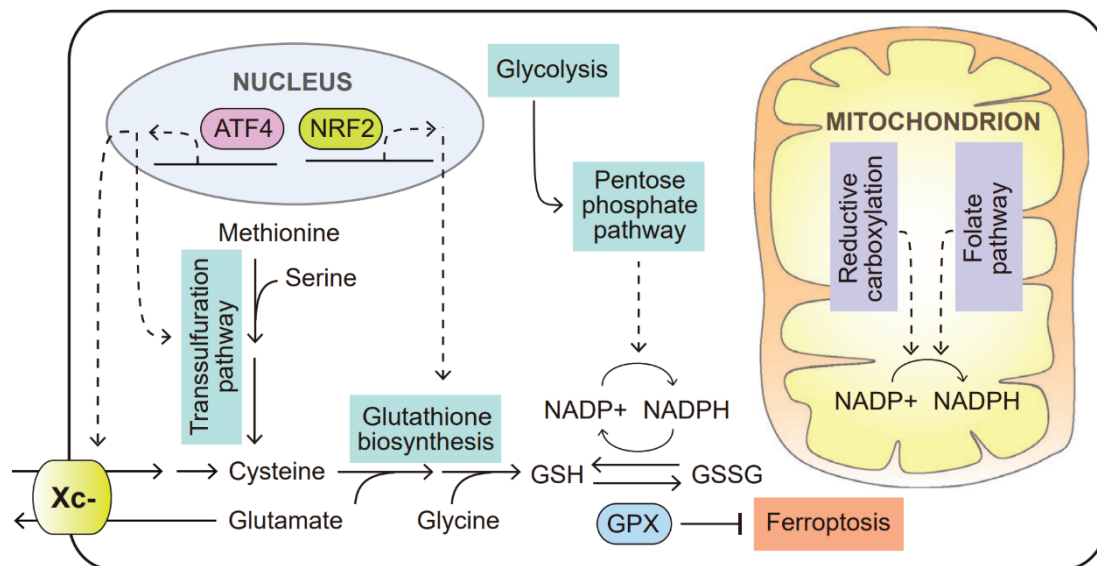


Figura 11. El metabolismo de la célula tumoral se reprograma en su conjunto para maximizar la función antioxidante, incrementando la producción de GSH y NADPH, elementos indispensables para la actuación de sistemas antioxidantes que suelen estar también sobreexpresados, como GPX4. Figura tomada de Pavlova et al., 2022.

6. Gliomas y Glioblastoma

Los gliomas son el tipo más común de tumor maligno en el sistema nervioso central (SNC), representando más del 80% de estos. Los gliomas pueden originarse en el SNC a partir de células troncales o progenitoras, o a partir de células diferenciadas como precursores de oligodendrocitos, neuronas o, más comúnmente, astrocitos. De entre ellos, el glioblastoma multiforme (GBM), tradicionalmente clasificado por la OMS como astrocitoma de grado IV, es el más común y letal, y se encuentra entre los tipos de cáncer con peor pronóstico, con un muy bajo porcentaje de supervivencia a 5 años, de tan sólo el 5,5% (Campos-Sandoval 2021; Essemen et al., 2022; Stupp et al., 2005). La clasificación actual de la OMS referente a los tumores del sistema nervioso central divide a los glioblastomas en cuanto a su estatus IDH, distinguiendo así glioblastomas IDH-wild type y glioblastomas IDH-mutante (Louis et al., 2016). Están caracterizados por una elevada capacidad proliferativa, potente inducción angiogénica, infiltración difusa, alta resistencia a la apoptosis y gran inestabilidad genómica. El tratamiento actual, que consiste fundamentalmente en cirugía seguida de radioterapia y quimioterapia, presenta una baja efectividad, con un tiempo de supervivencia medio que oscila entre los 12-15 meses (An et al., 2018; Furnari et al., 2007).

Se han ido documentando multitud de alteraciones genéticas y epigenéticas en los glioblastomas, como son aquellas que ocasionan una ganancia de función en el receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico, EGFR, bien por amplificaciones de este, mutaciones puntuales o deleciones, siendo entre estas últimas la más común la expresión de una versión mutante truncada con activación constitutiva, llamada EGFRvIII. En cualquier caso, la sobreactivación de EGFR lleva a la activación de rutas de señalización relacionadas con la proliferación celular y un reordenamiento metabólico que favorece el fenotipo maligno, como son la ruta de RAS/RAF/MAPK, JAK/STAT, PLC/PKC y PI3K/AKT (PKB), estando esta última alterada en el 80% de los gliomas. Adicionalmente, se han descrito nuevas funciones de señalización exclusivas de EGFRvIII distintas de las propias de EGFR. Igualmente, son comunes mutaciones de pérdida de función en supresores tumorales como PTEN, implicando esto la pérdida de la regulación negativa de la vía de PI3K/AKT, o en *CDKN2A*, que codifica una proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4 y CDK6), y por tanto actúa regulando negativamente la activación del ciclo celular (An et al., 2018; Essemen et al., 2022; Furnari et al., 2015; Sunayama et al., 2010).

Por otra parte, también suelen aparecer mutaciones de pérdida de función en el supresor tumoral *TP53*, así como mutaciones en las isoenzimas IDH1 y 2. Estas enzimas catalizan la descarboxilación del isocitrato a α -KG en condiciones normales. La isoenzima IDH2, mitocondrial, está directamente implicada en el ciclo TCA. Las versiones mutantes de estas enzimas encontradas en un porcentaje significativo de los gliomas, y también en leucemia mieloide aguda (AML), colangiocarcinoma y condrosarcoma, son de ganancia de función y se caracterizan por convertir el α -KG en el metabolito D-2-

hidroxiglutarato (D-2-HG), de otro modo muy escaso (Dang et al., 2009). Se ha documentado que el D-2-HG también puede ser generado a partir de α -KG por la enzima PHGDH, implicada en la biosíntesis de serina, en líneas celulares de cáncer de mama, así como en tumores mamarios de forma independiente a la generación por parte de IDH mutantes (Fan et al., 2015). El D-2-HG es actualmente considerado un oncometabolito, siendo generado de forma dependiente a determinadas mutaciones protumorigénicas, y que interfiere en la actividad de enzimas implicadas en la regulación epigenética, particularmente las dioxigenasas dependientes de α -KG. Estas enzimas han sido previamente descritas con en el apartado 4 de esta introducción, y se incluyen en este grupo enzimas con actividad demetilasa de histonas y de nucleótidos presentes en el ADN y ARN. El D-2-HG actúa como inhibidor competitivo del α -KG en su sitio de unión a la enzima (Faubert et al., 2020; Figueroa et al., 2010). Esta actividad causa que el D-2-HG ocasione un fenotipo de hipermetilación genómica prooncogénico, impidiendo de este modo la expresión de programas génicos relacionados con la diferenciación celular (DeBerardinis y Keshari, 2022), habiéndose comprobado cómo la inhibición de la IDH1 mutante en células de glioma (Rohle et al., 2013) o la IDH2 mutante en células de leucemia (Wang et al., 2013) inducen la diferenciación celular y minimizan la proliferación. De hecho, se han publicado muy recientemente los resultados de un ensayo clínico en fase III utilizando un inhibidor de las IDH mutantes llamado Vorasidenib en pacientes con gliomas de grado 2, caracterizados por mutaciones en las IDH, donde el fármaco consiguió incrementar el tiempo de supervivencia a más del doble respecto al grupo control (Mellinghoff et al., 2023).

Este fenotipo hipermetilado asociado a la inhibición de las dioxigenasas dependientes de α -KG también se ha relacionado con el enantiómero L del 2-hidroxiglutarato (L-2-HG), cuya acumulación es independiente de la actividad de las IDH mutantes, siendo consecuencia de alteraciones en la especificidad por el sustrato causados por bajo pH en ciertas deshidrogenasas, como la lactato y malato deshidrogenasas, que de forma promiscua utilizan α -KG como sustrato; o pudiendo dicha acumulación estar producida también por mutaciones inactivadoras de la enzima L-2-HG deshidrogenasa (L2HGDH), implicada en la detoxificación del L-2-HG convirtiéndolo en α -KG, habiéndose encontrado este último caso en carcinoma de células renales (Engqvist et al., 2014; Pavlova et al., 2022). Igualmente, el D-2-HG inhibe también a las demetilasas de 6-metil adenina (m^6A) de ARN, FTO y ALKBH5, que son también dioxigenasas dependiente de α -KG. Esto ocasiona hipermetilación de ARNm que resulta en una activación de la traducción, y por tanto, incremento de la síntesis proteica, relacionada con el desarrollo oncogénico. Esta situación mimetiza, en tanto al fenotipo hipermetilado de ARNm, a la causada por una sobreactivación oncogénica o por factores de crecimiento del nodo de señalización mTORC1, que induce metilación de ARNm al activar a la metilasa de m^6A WTAP, y/o incrementar los niveles del donador de grupos metilo SAM vía c-Myc, de forma que SAM incrementa la actividad de la metilasa METTL16 (Kim y Lee, 2021; Villa et al., 2021).

En cualquier caso, las opciones terapéuticas en glioblastoma son actualmente muy limitadas debido a la escasa efectividad que han mostrado la mayoría de las estrategias, y el tratamiento de elección es el mismo en todos los casos: máxima resección quirúrgica posible seguido de radioterapia, y quimioterapia de mantenimiento con el agente alquilante temozolomida (TMZ). La TMZ es el único fármaco que ha mostrado una cierta eficacia en GBM, aunque muy modesta, incrementando levemente el tiempo medio de supervivencia (Fisher y Adamson, 2021; Tan et al., 2020). La TMZ induce metilaciones en el ADN, pero se ha demostrado que adicionalmente causa un incremento en los niveles de ROS celulares, ocasionando la oxidación de las bases nitrogenadas componentes del ADN. En respuesta a esos daños en el ADN, se activa el supresor tumoral LKB1, que a su vez activa la señalización mediada por AMPK, fosforilando a p53 e induciendo esta a las proteínas pro apoptóticas Noxa y Bax; paralelamente, el tratamiento con TMZ inhibe también a mTORC1, causando una bajada en los niveles de la proteína anti apoptótica Bcl-2, todo ello llevando a una inducción apoptótica. Sin embargo, en la mayoría de los casos suele acabar apareciendo resistencia al tratamiento con TMZ, por lo que es necesario y urgente explorar nuevas opciones terapéuticas. Algunos de los mecanismos de resistencia propuestos consisten en la sobreexpresión por parte de la célula tumoral de sistemas antioxidantes que prevengan la acumulación de ROS y el daño oxidativo a los diferentes componentes moleculares de la célula. Es por ello, que existe interés en explorar la efectividad de tratamientos combinados incluyendo TMZ y fármacos prooxidantes (Cockfield y Schafer, 2019; Kim et al., 2014; Reczek y Chandel, 2017; Zhang et al., 2010).

En condiciones fisiológicas normales, los astrocitos expresan de forma casi exclusiva en cerebro la enzima glutamina sintetasa (GS), que sintetiza Gln a partir de Glu y amonio hidrolizando ATP. La Gln sintetizada será exportada al espacio extracelular para que pueda ser captada por las neuronas, que la utilizarán para la generación de Glu, necesario para las sinapsis glutamatérgicas. En la generación de Glu en neuronas las enzimas glutaminasas tienen una importancia principal. Por tanto, existe un acoplamiento metabólico entre estos tipos celulares al respecto del metabolismo de la Gln (Márquez et al., 2017b).

En glioma, no obstante, el metabolismo de la Gln y el Glu se encuentra normalmente reprogramado, comportándose un porcentaje importante de los gliomas como sumideros de Gln, siendo muchas células tumorales de glioma adictas a la Gln. Esto puede ocurrir entre otras cosas porque en la célula tumoral se silencia a la enzima GS, que en muchos casos se expresaba en el tejido sano de origen, y el tumor pasa a ser un consumidor neto de Gln, que importa desde el espacio extracelular. La expresión GS varía enormemente entre gliomas, existiendo el caso de tumores que mantienen una considerable expresión GS y dependen de la actividad piruvato carboxilasa para sostener el ciclo TCA a partir del metabolismo de la glucosa, y de otra importante proporción que silencia GS y utilizan la Gln como sustrato anaplerótico. En estos últimos casos, el elevado

consumo de Gln ha podido ser aprovechado clínicamente para el marcaje con el análogo de Gln 4-(18F)-(2S, 4R)-fluoroglutamina (18F-FGln), que ha mostrado mejores resultados para la obtención de imágenes mediante PET en glioma que el típicamente utilizado marcaje con (18F) Fluorodesoxiglucosa (18F-FDG), ya que este último presenta en estos tumores el problema de un elevado ruido de fondo dado el ya de por si alto consumo de glucosa que tiene lugar en condiciones fisiológicas normales en cerebro (Marín-Valencia et al., 2012; Márquez et al., 2017a; Venneti et al., 2015).

Otro cambio común al respecto de la reprogramación del metabolismo de la Gln en gliomas, implicado en el cambio hacia ser consumidores netos de Gln, es la pérdida de la capacidad de importar Glu extracelular al dejar de expresar sus transportadores, que se expresan de forma normal en células gliales. Este cambio metabólico implicará que el Glu será generado intracelularmente a partir de Gln previamente importada, principalmente por medio de las enzimas glutaminasas, habiéndose comprobado que las isoenzimas GLS se encuentran comúnmente sobreexpresadas en glioma, mientras que las isoenzimas GLS2 suelen estar silenciadas. El antiportador xCT se encuentra también sobreexpresado en una importante proporción de los gliomas; la mayor actividad glutaminasa y mayores niveles de xCT proveen a la célula tumoral de glioma de unas ventajas esenciales: el Glu generado desde Gln será exportado a través de xCT con el concomitante importe de cistina, que protegerá del estrés oxidativo al participar en la síntesis de GSH, y favorecerá la biosíntesis proteica (mecanismo explicado con mayor detalle en el apartado 5 de esta introducción). Al mismo tiempo, el Glu exportado se acumulará en el espacio extracelular y en muchos casos podrá ejercer un papel excitotóxico sobre las células sanas circundantes, a través de la sobre activación del receptor de NMDA, lo que podrá resultar en la muerte de este tejido sano favoreciendo el crecimiento del tumor. Los principales cambios metabólicos en el metabolismo de la Gln/Glu que tienen lugar en glioma se sintetizan en la figura 12. Esta reprogramación del metabolismo de la Gln se ha considerado relevante a nivel terapéutico por varios motivos, destacando entre ellos su papel en la protección frente al estrés oxidativo ya que está implicado en la biosíntesis de GSH. Considerando que se hipotetizan mecanismos de resistencia a la TMZ que están mediados por la sobreexpresión de sistemas antioxidantes, se ha considerado de interés terapéutico la combinación de tratamientos dirigidos contra el metabolismo tumoral de la Gln y TMZ, como es por ejemplo el uso combinado en ensayos clínicos del inhibidor de GLS, CB-839, y TMZ (Campos-Sandoval et al., 2021; Groot et al., 2005; Groot y Sontheimer, 2011; Márquez et al., 2017a).

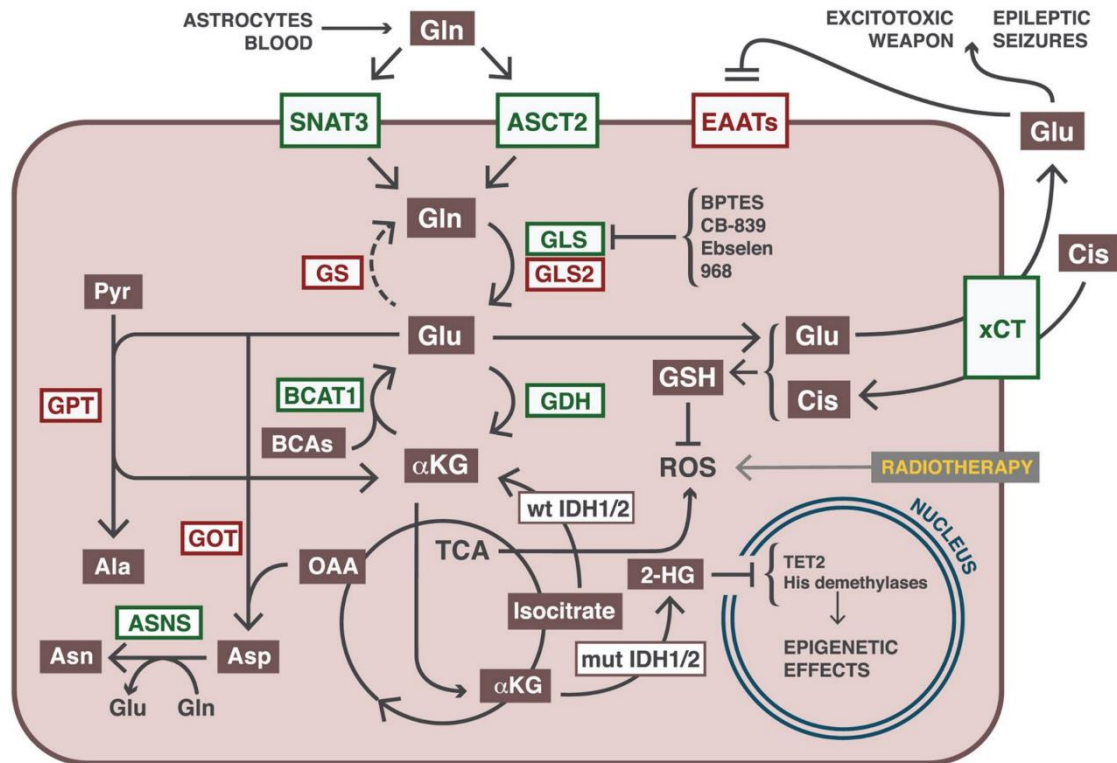


Figura 12. Cambios comunes en la reprogramación del metabolismo de la Gln/Glu en la célula tumoral de glioma. La glutaminólisis suele estar sobreactivada para favorecer procesos biosintéticos, bioenergéticos y de control redox. La célula suele exportar Glu al sobreexpresar xCT, lo que favorece el crecimiento del tumor al dañar al tejido sano circundante. Figura tomada de Márquez et al., 2017a.

7. Isoenzimas Glutaminasa

Las enzimas glutaminasas (GAs, EC 3.5.1.2, L-glutamina amidohidrolasa) tienen un importante papel en el metabolismo de los aminoácidos, llevando a cabo la reacción de desamidación oxidativa de la Gln para dar Glu e ion amonio (NH_4^+) libre. La reacción catalizada por la enzima presenta características comunes a la catalizada por las enzimas amidotransferasas, que transfieren el grupo amido de la cadena lateral de la Gln a un sustrato aceptor, que en el caso de las GAs es la molécula de agua, para así formar el ion amonio. Las GAs se expresan en la gran mayoría de tejidos de mamíferos, llevando a cabo una función esencial para el funcionamiento de estos (Márquez et al., 2016).

Particularmente en el cerebro, la actividad GA es también imprescindible para la generación de Glu, que será empleado como neurotransmisor en las sinapsis glutamatérgicas. Las GAs son las principales enzimas productoras de Glu en el cerebro, así como las principales enzimas consumidoras de Gln en neuronas, por ello consideradas esenciales en la generación del Glu presináptico. La función GA tiene una importancia esencial en cerebro al formar parte indispensable del ciclo Glu/Gln entre

neuronas y astrocitos: en neuronas, la actividad GA genera Glu que sirve como neurotransmisor y es segregado al espacio extracelular, desde donde será captado por los astrocitos, en los cuales se expresa la enzima GS que sintetizará Gln a partir de Glu y amonio acoplado a la hidrólisis de ATP. Esa Gln sintetizada será de nuevo exportada al espacio extracelular para que pueda ser reimportada por las neuronas, cerrando el ciclo (Márquez et al., 2017b).

En humanos, existen cuatro isoenzimas GA codificadas por dos genes parálogos: *GLS* y *GLS2*, que presumiblemente aparecieron a raíz de una duplicación génica a partir de un ancestro común (Pérez-Gómez et al., 2003). Cada uno de los dos genes codifica a su vez dos isoenzimas, el gen *GLS* codifica la isoenzima tipo riñón (KGA, “Kidney-type glutaminase”) y la isoenzima glutaminasa C (GAC), y ambas son referidas genéricamente como GLS o como glutaminasa tipo riñón, para hacer referencia a cualquier enzima GA codificada por el gen *GLS*. Por otra parte, *GLS2* codifica la isoenzima glutaminasa B (GAB) y la isoenzima tipo hígado (LGA, “Liver-type glutaminase”), y ambas enzimas son referidas genéricamente como *GLS2* o glutaminasa tipo hígado. Las diferentes isoenzimas GA varían en sus características cinéticas, regulación y sus patrones de expresión en diferentes tejidos, e igualmente existe un debate abierto acerca de las diferencias entre ellas en cuanto a su localización subcelular e importancia en cáncer. Las isoenzimas GLS son las primeras que se descubrieron, particularmente KGA, y es considerada la GA “clásica” y más profundamente estudiada, habiéndose cristalizado y determinado su estructura tridimensional. Por otra parte, las isoenzimas *GLS2* fueron descubiertas más recientemente y existe menos información acerca de las mismas, habiéndose conseguido solo un conocimiento parcial de su estructura tridimensional, centrado en dominios concretos de la proteína producida en algunos organismos modelo (Campos-Sandoval et al., 2015; Márquez et al., 2016).

En humanos, el gen *GLS* está localizado en el cromosoma 2 (2q32-q34), consta de 19 exones y una expansión aproximada de 82kb. Los dos transcritos codificados por *GLS* surgen por ajuste alternativo: el transcrito KGA, más largo, está conformado por la unión de los exones 1-14 y 16-19, y genera un polipéptido de 669 aminoácidos, mientras que el transcrito GAC, más corto, está formado por los exones 1-15, y genera un polipéptido de 598 aminoácidos. Por tanto, el exón 15 es exclusivo del transcrito GAC, difiriendo principalmente ambas isoformas en el extremo C-terminal, siendo idénticos en ambas isoformas la región N-terminal y los dominios con actividad GA. La figura 13 muestra las diferencias en cuanto a composición de exones de las cuatro isoenzimas codificadas por los genes *GLS* y *GLS2*. La proteína KGA fue aislada por primera vez en riñón de rata, mientras que GAC fue identificada por primera vez en una línea celular humana de cáncer de colon. Las isoformas GLS presentan en su extremo N-terminal una secuencia de 16 residuos que predicen su localización en la mitocondria. Las GAs son enzimas oligoméricas. En su estado inactivo, las isoformas GLS (KGA y GAC) se encuentran formando un homodímero. Su activación puede conseguirse *in vitro* mediante la adición

de fosfato inorgánico (Pi), un activador de la enzima, que favorece el establecimiento de una conformación tetramérica con actividad enzimática. La isoforma GAC muestra una mayor actividad catalítica que KGA, especialmente en presencia de Pi. Por otra parte, la actividad de la isoforma KGA es fuertemente inhibida por el producto de la reacción que cataliza, Glu (Elgadi et al., 1999; Katt et al., 2017; Matés et al., 2018).

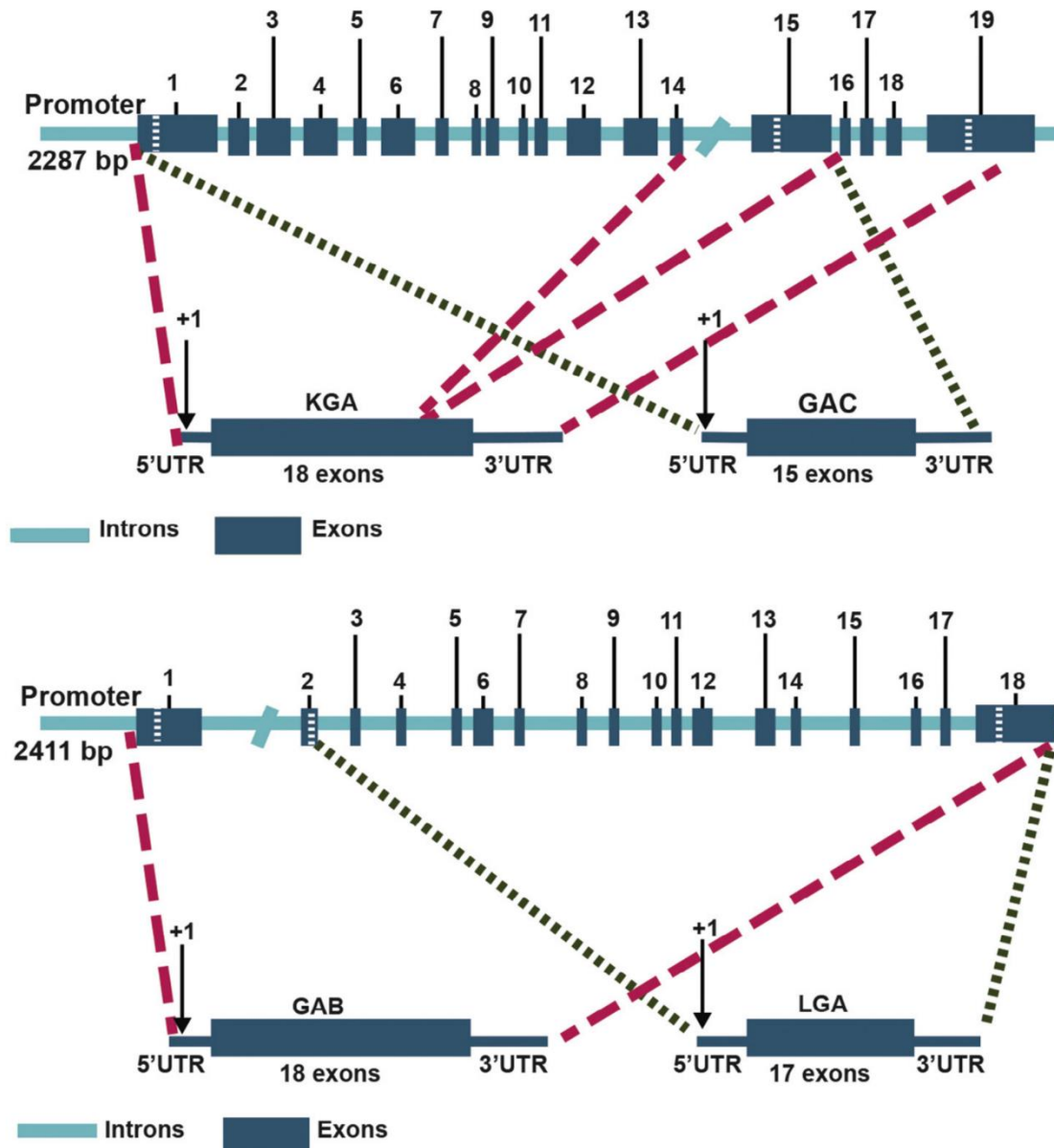


Figura 13. Genes humanos *GLS* y *GLS2* y las isoformas GA que codifican, detallando la composición de exones de cada isoenzima y su extensión. Figura tomada de Campos-Sandoval et al., 2015.

Por otra parte, el gen *GLS2* humano se localiza en el cromosoma 12 (12q13.3) y consta de un total de 18 exones, expandiéndose aproximadamente 18 kb (Campos-Sandoval et

al., 2015). Los dos transcritos originados a partir de *GLS2* se producen por un inicio alternativo de la transcripción y el uso de un promotor alternativo (Martín-Rufián et al., 2012). La isoforma canónica GAB se aisló por primera vez a partir de la línea celular humana de cáncer de mama ZR-75, y está conformada por la unión de los 18 exones del gen, para dar una proteína de 602 aminoácidos (Gómez-Fabre et al., 2000), mientras que la isoforma LGA es más corta, al tener un sitio de inicio de la transcripción localizado en el intrón 1 del gen, siendo resultado de la unión de los exones 2-18, dando lugar a un polipéptido de 565 aminoácidos, y habiéndose aislado por primera vez a partir de hígado de rata (Smith y Watford, 1990). A diferencia de las isoformas GLS, las isoenzimas GLS2 son activadas por bajos niveles de fosfato y la inhibición por su producto, Glu, es mucho menor. Además, las isoformas GLS2 son activadas por su otro producto de reacción, amonio (NH_4^+), de forma muy variable entre ellas: LGA es fuertemente activada, mientras que en GAB la activación por amonio es mucho menor (Matés et al., 2020a). Por último, las isoenzimas GLS tienen mayor afinidad por su sustrato, Gln, que las isoenzimas GLS2 (Campos-Sandoval et al., 2015). La tabla 1 contiene las principales diferencias entre las cuatro isoenzimas GA en cuanto a composición y tamaño de los transcritos y proteínas, y en cuanto a diferencias en su actividad catalítica.

La localización subcelular de las GAs sigue siendo actualmente objeto de debate. En la mayoría de los casos, la evidencia apunta hacia una localización fundamentalmente mitocondrial, especialmente en el caso de las isoformas GLS, aunque existen algunos reportes de localización citoplasmática de alguna de las isoformas (Aoki et al., 1991). Por otra parte, el caso de GLS2 es más complejo, y adicionalmente a su localización mitocondrial, existen reportes acerca de resultados que sugieren que también puede localizarse en el núcleo, lo que podría suponer una implicación de la proteína en regulación génica (López de la Oliva et al., 2021). Igualmente, las isoenzimas GA muestran diferentes patrones de expresión en condiciones fisiológicas normales. Las isoenzimas GLS suelen expresarse de forma ubicua, en la mayoría de los tejidos. En el caso de las isoenzimas GLS2, su expresión es más específica, estando restringida principalmente al hígado, pero encontrándose también en cerebro, páncreas y células del sistema inmune (Aledo et al., 2000; Campos-Sandoval et al., 2015; Pérez-Gómez et al., 2005). De hecho, se ha comprobado que existen tejidos donde ambas isoenzimas, GLS y GLS2, están co-expresadas en relación variable, habiéndose encontrado esto en hígado y cerebro de ratón, rata y humano (Martín-Rufián et al., 2012). En el caso del cerebro humano, se encontraron evidencias de la expresión de tres de las cuatro isoenzimas GA: KGA, GAB y LGA. Las isoenzimas GLS2 aparecen expresadas tanto en neuronas como en glía (Cardona et al., 2015; Márquez et al., 2017b; Olalla et al., 2008).

Tabla 1. Resumen de las principales características diferenciales en cuanto a estructura y actividad catalítica entre las isoenzimas GA humanas. Tomada de Matés et al., 2020a.

Gene	<i>GLS</i>	<i>GLS</i>	<i>GLS2</i>	<i>GLS2</i>
Isoform name	KGA	GAC	GAB	LGA
Transcript length (nts)	4348	3183	2408	2026
No. Exons	18	15	18	17
Protein name	GLS	GLS	GLS2	GLS2
Protein length (aas)	669	598	602	565
Approximate subunit molecular mass (kDa)	68 and 66	58	63	56
Pi dependence	High	High	Low	Low
Ammonia activation	No	No	Very low	Strong
Glutamate inhibition	Strong	Strong	Moderate	No

7.1. Isoenzimas Glutaminasa y Reprogramación Metabólica en Cáncer

En cáncer, el metabolismo de la Gln se encuentra comúnmente reprogramado para satisfacer las necesidades de la célula tumoral. Las GAs son actores clave a este respecto, y suelen ver alterados sus patrones de expresión en células cancerosas. Las GAs catalizan en la mitocondria el primer paso de la glutaminólisis, por tanto, la reacción en que están implicadas supone la puerta de entrada metabólica a un conjunto de rutas relacionadas con la obtención de energía, biosíntesis, regulación redox e incluso regulación epigenética. Igualmente, la reacción GA consigue promover en la célula tumoral un incremento en la tasa de importación de Gln, al crear un “sumidero” de Gln que es transformada por las GAs en Glu, consiguiendo así mantener un gradiente que impulse la entrada de más Gln a la célula, y al mismo tiempo creando un gradiente de Glu que puede ser exportado tanto de la mitocondria, como de la propia célula, para permitir la entrada de otros metabolitos. Esto es especialmente relevante en el caso de la importación de cistina a la célula tumoral por medio del sistema antiportador xCT. Además de las GAs, las enzimas amidotransferasas también utilizan Gln para generar Glu, transfiriendo el grupo amido de la Gln a un sustrato aceptor, como en el caso de la biosíntesis de nucleótidos, hexosaminas o asparagina. Por tanto, la generación de Glu a partir de Gln no es exclusiva de las GAs, sin embargo, en el contexto proliferativo de las células tumorales y debido a sus características y localización subcelular, las GAs han demostrado ser en muchos casos las principales responsables de la generación de Glu a partir de Gln, dado que la generación y excreción de amonio por la célula tumoral suele ser mucho mayor que la tasa de incorporación del grupo amido en biomasa (Muir et al., 2017; Wise et al., 2008).

Por todo ello, las células tumorales suelen sobreexpresar las GAs para maximizar la tasa de conversión de Gln en Glu, y generalmente, maximizar la glutaminólisis. De hecho, ya en la década de 1960 se observó una correlación entre una mayor actividad GA y una

más elevada tasa proliferativa y mayor grado de dediferenciación en hepatomas y otros tumores (Linder-Horowitz et al., 1969; Matés et al., 2020b).

No obstante, los cambios en la expresión de las GAs en cáncer también suelen diferir entre isoenzimas, y el caso más frecuentemente encontrado es el de la sobreexpresión de GLS en las células tumorales, lo que suele asociarse con mayor capacidad proliferativa, llevando esto a considerar la sobreexpresión de GLS como un rasgo protumorigénico. Particularmente, la isoforma GAC es la principal GA sobreexpresada en tumores, mostrando expresión preferencial sobre KGA, y habiéndose correlacionado una mayor expresión GAC con un peor pronóstico (Matés et al., 2018; Matés et al., 2020b; Van den Heuvel et al., 2012). De hecho, se documentó que silenciar GLS en células de carcinoma de ascitis de Ehrlich (EATC) en un modelo *in vivo* de ratón, conseguía minimizar la capacidad proliferativa y tumorigénica de estas (Lobo et al., 2000). Como se ha comentado anteriormente, GAC fue por primera vez identificada en células de cáncer de colon, y se ha encontrado en modelos tumorales de cáncer de colon que el alelo G de CCAT2, un ARN no codificante largo (lncRNA), interacciona con CFIm, un componente de un complejo proteico implicado en la maduración del ARNm, para favorecer el ajuste transcripcional GAC, por tanto, promoviendo que la expresión GLS se redireccione hacia la generación del transcrito GAC, y por ello estando implicado en la sobreexpresión de GAC, comúnmente observada en este tipo de tumores (Redis et al., 2016).

En 2009 se estableció que GLS era una diana transcripcional indirecta del oncogén c-Myc, implicado entre otras cosas en una reprogramación del metabolismo de la Gln y la glucosa. La actividad de c-Myc promueve la glutaminólisis y el empleo de la Gln como nutriente tanto a nivel bioenergético como biosintético. En condiciones normales, la expresión GLS está regulada negativamente a nivel postranscripcional por acción de los micro ARNs (miRNAs o miR) 23a y 23b, que se unen a la región no traducida en 3' (3'-UTR, "untranslated region") del ARNm de GLS promoviendo su degradación. El oncogén c-Myc reprime a nivel transcripcional a los miRNAs 23a/b, promoviendo con ello la expresión GLS (Gao et al., 2009; Wise et al., 2008). De igual modo, se ha comprobado que la activación de mTORC1 lleva a la sobreexpresión de GLS, estando mediada por un incremento en la expresión de c-Myc (Csibi et al., 2014). De forma similar a la regulación por c-Myc, se observó que en células de leucemia humanas, NF-κB, a través de su subunidad p65, induce la represión transcripcional del miR 23a y con ello, induce la expresión GLS (Rathore et al., 2012). En el caso de los gliomas, y especialmente en glioblastoma, se ha observado que existe en muchos casos una sobreexpresión de GLS, además de un silenciamiento en GLS2, en el tumor en comparación con el tejido sano, lo que también ocurre en líneas celulares de glioma. Además, se encontró que ese patrón de expresión era inverso para el miR 153, estando reprimido en glioma, y pudo comprobarse que ejercía un papel de regulación negativa sobre GLS. De hecho, muchos gliomas lo reprimían como parte de la reprogramación metabólica del metabolismo de

la Gln y la inducción de la sobreexpresión GLS (Liu et al., 2017). Igualmente, se ha identificado a los miR 1-3p y miR 137 como reguladores negativos de GLS en distintos modelos tumorales en los que estos miR estaban silenciados en comparación al tejido sano, y se les asoció una función supresora tumoral. Particularmente en el caso del miR 137, se identificó a HSF1 como un factor prooncogénico que inducía la expresión de GLS en células de cáncer colorrectal mediante la represión del miR 137, el cual también regula negativamente al transportador de Gln ASCT2 (Li et al., 2018; Zhang et al., 2018). Adicionalmente, otros miRNAs se han identificado como reguladores negativos de GLS, que reprimen su expresión por medio de la unión al extremo 3'-UTR del transcrito, y que solían encontrarse silenciados en tumores respecto al tejido normal, relacionándose su expresión con menor tasa proliferativa, mayor inducción de apoptosis y mayor tasa glutaminolítica. Este es el caso de los miR 513c (neuroblastoma), miR 122 (carcinoma hepatocelular, HCC) y el miR 203 (melanoma) (Chang et al., 2017; Sengupta et al., 2020; Xia et al., 2017).

Por otra parte, la señalización prooncogénica de las proteínas Rho GTPasas resulta en la activación del factor de transcripción c-Jun, considerado un oncogén. Se ha comprobado que GLS es una diana transcripcional directa de c-Jun, el cual se une al promotor de *GLS* para inducir su expresión (Lukey et al., 2016). La señalización corriente abajo de las Rho GTPasas igualmente induce la actividad GLS por mediación de NF- κ B, que a su vez induce la actuación de la subunidad ϵ de la proteína quinasa C (PKC ϵ), que fosforila a GLS en la Ser314, una diana de fosforilación identificada como esencial para su actividad catalítica, y cuyos niveles de fosforilación correlacionan con un peor pronóstico en tumores de pulmón (Han et al., 2018). La señalización EGFR-MAPK también activa a GLS a nivel postraduccional por medio de fosforilación, habiéndose comprobado que la acción de fosfatasa implicadas en la vía de señalización, como PP2A, la previenen (Thangavelu et al., 2012).

Por tanto, dado el patrón de sobreexpresión GLS observado en muchos tumores y células tumorales, y estando su expresión inducida por oncogenes, se ha llegado a considerar GLS como un factor prooncogénico, habiéndose diseñado y estudiado a tal efecto un conjunto de inhibidores farmacológicos dirigidos contra las GAs, especialmente GLS, como una forma de explotar terapéuticamente la dependencia sobre la glutaminólisis de multitud de células tumorales (Matés et al., 2018).

El caso de la función de GLS2 en cáncer es más complejo y dependiente del contexto. GLS2 aparece silenciada respecto al tejido normal en tumores originados en el hígado, en el que en condiciones fisiológicas suele tener una expresión preponderante, así como en tumores de colon y glioblastoma, habiéndose encontrado en estos casos un incremento en la metilación del promotor de *GLS2*. En estos tipos tumorales GLS2 ha sido propuesto como un posible supresor tumoral. En estos tumores parece observarse un cambio en la relación GLS/GLS2, maximizándose ésta y convirtiéndose GLS en la GA predominante en el tumor. En multitud de líneas celulares de glioma, *GLS2* aparece

hipermetilado y sus niveles de expresión son casi indetectables, mientras que GLS a menudo aparece sobreexpresada (Szeliga et al., 2016; Zhang et al., 2013).

GLS2 comparte un alto nivel de homología de secuencia con GLS en los dominios catalíticos, sin embargo, los dominios de los extremos N y C terminales muestran mayores diferencias, particularmente en los exones 1 y 18, así como en el exón 19 de GLS, lo que se ha relacionado con posibles diferencias en localización subcelular e interacción proteína-proteína (Márquez et al., 2015). De hecho, GLS2 presenta en la región C-terminal, en su exón 18, secuencias de reconocimiento de dominios PDZ (PSD95/Dlg/ZO1), implicados en la interacción entre proteínas (De la Rosa et al., 2009). Todo ello puede suponer que las isoenzimas puedan ejercer funciones diferenciales, y especialmente en el caso de GLS2, esta pueda ejercer funciones más allá de su actividad catalítica (Olalla et al., 2001). A ese respecto, se encontró en modelos de HCC que GLS2 interactuaba con la proteína Dicer para estabilizarla y favorecer la maduración del miR 34a, lo que lleva a reprimir la expresión de Snail, minimizando la capacidad tumorigénica de estas células (Kuo et al., 2016).

La regulación de la expresión de GLS2 es notablemente diferente de la regulación de GLS. GLS2 ha sido identificada como una diana de regulación de supresores tumorales como p53, p63 o p73 (Giacobbe et al., 2013; Hu et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Velletri et al., 2013). En el caso de p53, se ha encontrado en líneas celulares de cáncer humanas que ésta se asocia físicamente al promotor de *GLS2* para inducir su expresión en respuesta a estrés oxidativo o daño en el ADN. En estos mismos modelos, sobreexpresar GLS2 reducía la capacidad proliferativa de la célula (Suzuki et al., 2010). Igualmente, la expresión de GLS2 incrementaba los niveles de glutatión y disminuía los niveles de ROS, protegiendo frente al daño oxidativo (Hu et al., 2010). Estos hechos sugieren la posibilidad de que la función GLS2 forme parte de la respuesta supresora tumoral coordinada por p53.

Por otra parte, la función GLS2 parece estar relacionada con la regulación de vías de señalización clave en células tumorales. En células de HCC en las que GLS2 aparecía silenciada debido a hipermetilación del promotor, se comprobó que restaurar la expresión de GLS2 reducía la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT, que comúnmente está activada de forma constitutiva en este tipo de tumores, lo que se relacionó con una menor capacidad proliferativa independiente de anclaje al sustrato, así como un menor crecimiento del tumor en modelos de ratón con aloinjertos de estas células (Liu et al., 2014). De forma similar, en células de glioblastoma humanas en las que GLS2 se encuentra silenciada, la sobreexpresión de GLS2 ocasionó una menor capacidad proliferativa, así como sensibilizó a las células frente al daño oxidativo y frente al tratamiento con TMZ, lo cual igualmente estaba relacionado con una menor actividad de la vía de PI3K/AKT. En GBM, el silenciamiento de GLS2 por hipermetilación del promotor del gen es un mecanismo común, e independiente del estatus de p53 (Majewska et al., 2019; Szeliga et al., 2009; Szeliga et al., 2012). En modelos celulares *in*

in vitro de cáncer de mama, los niveles de expresión de GLS2 seguían una correlación inversa con respecto a la inducción de la transición epitelio-mesénquima (EMT, “epithelial to mesenchymal transition”), un proceso de crucial importancia en la adquisición de capacidad metastásica de los tumores. La expresión del factor de transcripción FOXC2, implicado en la coordinación molecular de la EMT, reprimía la expresión GLS2, y la inhibición FOXC2 conseguía restaurarla. Igualmente, los pacientes de tumores mamarios con mayores niveles de expresión GLS2 se asociaban con una mayor supervivencia (Ramírez-Peña et al., 2019).

Adicionalmente, se ha encontrado que GLS2 es capaz de interactuar con la proteína Rho GTPasa Rac1, que ejerce una función de señalización moduladora del citoesqueleto relacionada con un conjunto de procesos celulares, y que suele estar sobreactivada en varios tipos de tipos de cáncer, al promover la capacidad metastásica, así como la angiogénesis (Bid et al., 2013). Rac1 se encuentra unida a nucleótidos de guanina, de forma que está inactiva cuando se une a GDP, y puede activarse al interactuar con un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), cuya acción une GTP a Rac1, para activarla. Se ha comprobado que la unión de GLS2 a Rac1 previene la asociación de Rac1 con el GEF y por ello la mantiene en su forma inactiva, unida a GDP. Esta función de GLS2 demostró ser independiente de su actividad enzimática, y se asoció con una menor capacidad metastásica (Zhang et al., 2016). De hecho, existen estudios que asocian la función GLS2 con procesos de diferenciación celular. Por ejemplo, se ha observado un incremento de la expresión GLS2 mediada por p63 en la diferenciación de queratinocitos humanos primarios cultivados *in vitro*, mientras que el silenciamiento de GLS2 minimizaba la diferenciación celular (Giacobbe et al., 2013).

No obstante, también existen casos de tumores y líneas celulares tumorales en las que GLS2 aparece sobreexpresada y su actividad se ha correlacionado con las capacidades prooncogénicas de la célula tumoral, favoreciendo la proliferación y supervivencia. Este hecho deja clara la complejidad de la regulación de la función de las GAs en cáncer, particularmente de las isoenzimas GLS2, y la importancia del contexto en cuanto al efecto, supresor tumoral o prooncogénico, que pueda tener su función.

Por ejemplo, en células de neuroblastoma se encontró que la expresión de GLS2 dependía del oncogén n-Myc, de forma que GLS2 estaba sobreexpresada en células con amplificación de n-Myc, y favorecía la proliferación celular. Silenciar GLS2 llevaba a minimizar la proliferación y supervivencia de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* (Xiao et al., 2015). Igualmente, GLS2 aparecía sobreexpresada en una importante proporción de carcinomas cervicales, en los que la sobreexpresión GLS2 correlacionaba con resistencia a radioterapia (Xiang et al., 2013). Por otra parte, en líneas celulares humanas de cáncer de mama de subtipo luminal, así como en muestras de tumores humanos, GLS2 aparecía sobreexpresada, en parte debido a su inducción transcripcional por el factor de transcripción GATA3. En este subtipo tumoral, GLS2 demostró tener un rol protumorigénico, y su inhibición minimizaba la capacidad proliferativa de la célula

tumoral. Por el contrario, en líneas celulares y muestras de tejidos del subtipo basal, GLS era la GA preponderante (Lukey et al., 2019). La figura 14 aúna algunos de los más importantes reguladores de la actividad de las isoenzimas GLS y GLS2, así como elementos regulados por GLS2, incluyendo factores de transcripción, vías de señalización y miRNAs. Igualmente, se incluyen los más relevantes compuestos inhibidores de su actividad enzimática.

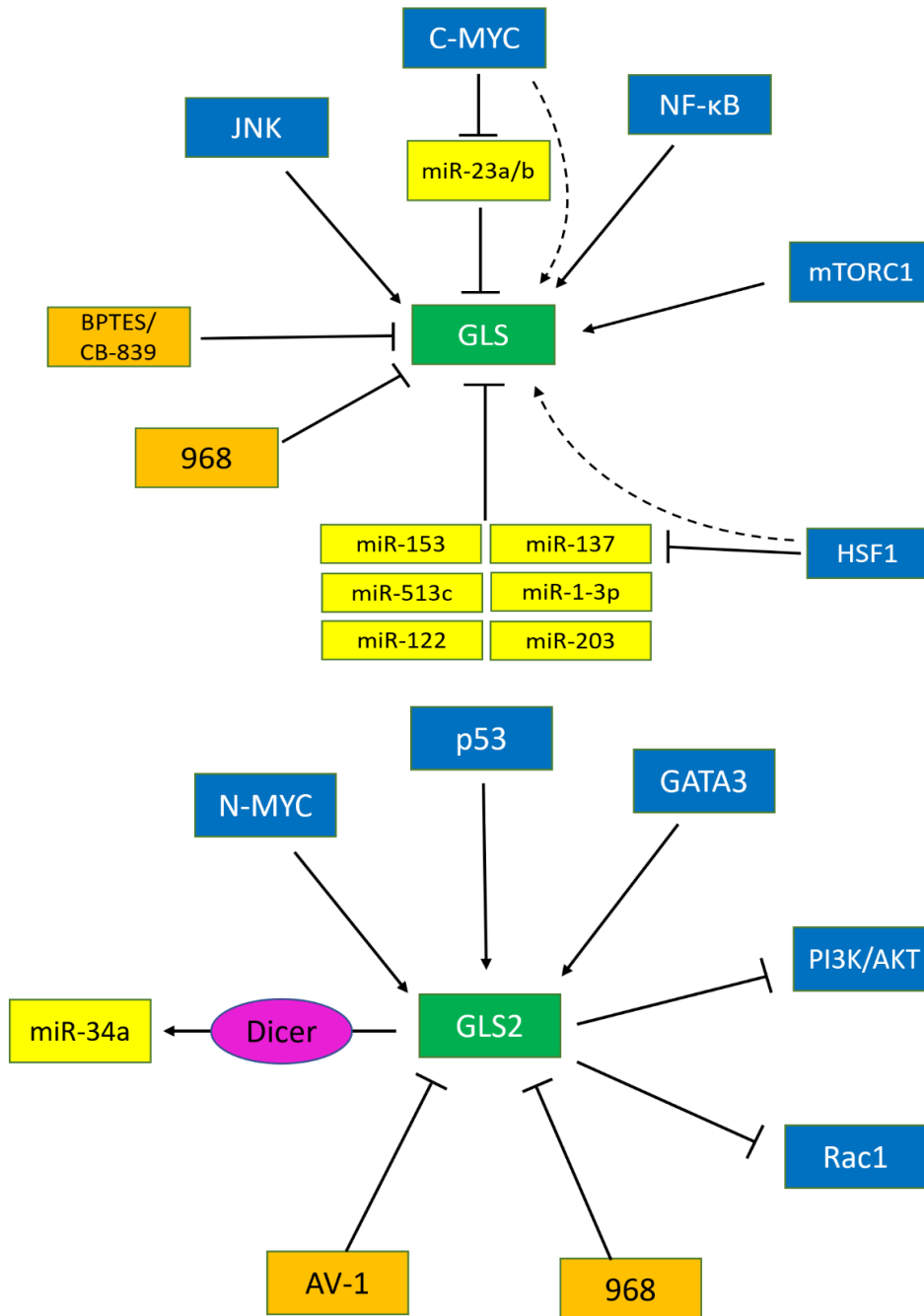


Figura 14. Síntesis de los principales elementos moleculares implicados en la regulación de las isoenzimas glutaminasa GLS y GLS2, así como de elementos moleculares que son diana de la función GLS2 e inhibidores conocidos más relevantes. En recuadros azules se muestran factores de transcripción/vías de señalización, en recuadros amarillos microRNAs reguladores, y en

recuadros naranjas compuestos químicos implicados en la inhibición de las isoenzimas. Figura de elaboración propia.

7.2. Isoenzimas Glutaminasa como Diana Terapéutica en Cáncer

Como ya se ha tratado en apartados anteriores, la reprogramación del metabolismo de la Gln es un rasgo común a multitud de tipos tumorales, que lo maximizan aprovechando la versatilidad metabólica de la Gln para satisfacer un conjunto de rutas centrales implicadas en aspectos clave para la célula tumoral. Por tanto, en las últimas décadas se han venido haciendo esfuerzos en la dirección de explotar terapéuticamente la reprogramación del metabolismo de la Gln, ante la consideración de que tratamientos dirigidos contra rasgos metabólicos del tumor podrían ser más eficaces que otros tratamientos clásicos, al ser potencialmente más selectivos y minimizar los efectos secundarios, esto es, los efectos negativos sobre el tejido sano. No obstante, la flexibilidad y adaptabilidad del metabolismo tumoral ha venido ocasionando una efectividad limitada de este tipo de tratamientos, acompañada de la posible aparición de resistencias dado que la mayoría de procesos metabólicos o no son verdaderamente imprescindibles para la célula tumoral, y por tanto pueden existir otras rutas metabólicas compensatorias, o bien el proceso, aunque esencial, no puede ser explotado terapéuticamente en su totalidad debido a la dependencia de las células sanas del mismo. En cualquier caso, la dependencia de Gln por parte del tumor en su conjunto no es ni mucho menos universal, y requiere de un estudio molecular de cada caso que provea de información acerca de posibles vulnerabilidades metabólicas así como de un pronóstico de la eficacia potencial del tratamiento (Rao y DeBerardinis, 2019). Aun así, existe un importante número de tumores “adictos a la Gln” para los que este tipo de tratamientos dirigidos podría resultar eficaz. Las GAs juegan un papel central en el metabolismo de la Gln en una gran proporción de estos tumores. Por ello, se han venido diseñando compuestos que actúen como inhibidores de las enzimas GAs, que potencialmente pueden proveer de una herramienta terapéutica eficaz en muchos casos, especialmente en combinación con otros tratamientos antitumorales, ya sean dirigidos contra otras dianas metabólicas, o tratamientos quimioterápicos “clásicos”. Este último enfoque combinatorio es el que ha cobrado más fuerza en los últimos años ya que tiene la potencialidad de que dosis reducidas de fármacos combinados consigan idealmente un efecto sinérgico, o bien aditivo, pero que en cualquier caso minimice los efectos secundarios, y maximice la eficacia antitumoral, al estar diseñada la combinación de fármacos contra un conjunto de características moleculares determinadas del tumor. Los tratamientos dirigidos contra las GAs tienen relevancia a este respecto, ya que el metabolismo corriente abajo de la glutaminólisis es importante en la célula tumoral en un conjunto de procesos que suelen estar incrementados en las células tumorales, de

forma que estas tienen mayor dependencia por los mismos que las células normales, agrandando así la ventana terapéutica (Matés et al., 2020a).

En cuanto a los inhibidores de la actividad GA, los primeros se identifican en la década de 1950, cuando aparecen moléculas que son análogos estructurales de la Gln, y que compiten con esta por la unión a las enzimas para las que es sustrato. Este es el caso de los considerados como antibióticos L-DON (6-diazo 5-oxo L-norleucina), azaserina (*O*-(2-diazoacetil)-L-serina) y acivicina (ácido (2S)-Amino[(5S)-3-cloro-4,5-dihidro-1,2-oxazol-5-il] etanoico), moléculas segregadas por bacterias del género *Streptomyces*, que actúan como inhibidores irreversibles no sólo de las GAs, sino también de las amidotransferasas (Magill et al., 1957; Yang et al., 2021).

Estos antimetabolitos de Gln mostraban una elevada efectividad antitumoral, pero al mismo tiempo ejercían efectos citotóxicos en las células sanas (neurotoxicidad, toxicidad gastrointestinal y mielosupresión), que limitaban mucho la dosis y con ello su uso terapéutico, ya que inhibían la función de un conjunto de enzimas amplio, que es igualmente necesario para el tejido sano (Earhart et al., 1990; Lynch et al., 1982). En el año 2016 se consigue sintetizar un conjunto de profármacos del DON, entre los que se encuentra el llamado JHU083, que destaca por ser el más estable. Estos constituyen análogos del DON que soslayan en gran medida los efectos citotóxicos hacia el tejido sano al ser administrados y distribuidos por la circulación en forma inactiva, y que son metabolizados en el microambiente tumoral para generar la molécula de DON activa, de forma que ejerzan su acción inhibitoria en el entorno del tumor, minimizando el daño al tejido sano. El JHU083 ha mostrado efectividad antitumoral en modelos tumorales de ratón, en los que reducía el uso de Gln y también de glucosa por parte de las células tumorales, incrementando los niveles de ambos nutrientes en el espacio extracelular del TME (Rais et al., 2016).

Por otra parte, surgieron otro conjunto de inhibidores que no eran análogos del sustrato, sino inhibidores alostéricos. Estos sí son inhibidores específicos de las enzimas GAs, y consisten en moléculas capaces de unirse a las GAs en los dominios de interacción para prevenir la formación de oligómeros activos (homotetrámero de GA). Destacan dos inhibidores alostéricos principales: el BPTES (bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro), y el compuesto 968, descubiertos y caracterizados en la primera decena del nuevo siglo (Robinson et al., 2007; Wang et al., 2010).

El BPTES es una molécula simétrica que se asocia en la interfaz de la unión entre dos homodímeros de GA, estabilizando una conformación tetramérica no activa enzimáticamente en la que dos moléculas de BPTES se intercalan en la estructura (Robinson et al., 2007). El BPTES es un inhibidor selectivo de las isoenzimas GLS, no mostrando una capacidad de inhibición relevante ante GLS2. El tratamiento con BPTES mostró actividad antitumoral en modelos tumorales de linfoma, glioma, mama, páncreas, pulmón y riñón; sin embargo, tenía poca estabilidad metabólica, baja

solubilidad y, por ello, insuficiente biodisponibilidad, así como una potencia inhibitoria moderada (Gross et al., 2014; Seltzer et al., 2010; Shukla et al., 2012).

La consecución de estructuras cristalinas del tetrámero GLS asociados a BPTES ha facilitado en los últimos años el diseño de inhibidores derivados de BPTES con mejores características (Gross et al., 2014; Huang et al., 2018). De estos, el más prometedor es el llamado compuesto CB-839 o Telaglenastat, que destaca por presentar una inhibición mucho más potente y mayor solubilidad, lo que le permite ser biodisponible por vía oral (Gross et al., 2014). El CB-839 ha mostrado efectividad antitumoral ante un panel de líneas celulares de mama triple-negativas (TNBC) cultivadas *in vitro* y en modelos *in vivo* de ratón xenoinjertados, pero no frente a líneas que expresaban el receptor de estrógenos. Este último es un subtipo tumoral conocido por sobreexpresar frecuentemente la isoenzima GLS2, insensible frente a la inhibición por CB-839, lo que podría estar relacionado con la resistencia frente al inhibidor. La sobreexpresión GAC correlacionó con una mayor sensibilidad frente al CB-839, aunque este se demuestra eficaz inhibiendo a ambas isoformas GLS (Gross et al., 2014; Katt et al., 2017). No obstante, posteriores ensayos con CB-839 han mostrado una efectividad limitada en su uso en monoterapia. Con todo, el CB-839 es el único inhibidor de GA hasta la fecha que ha sido probado en ensayos clínicos, existiendo ensayos en fase I que mostraban una potencial utilidad terapéutica como parte de tratamientos combinatorios. Sin embargo, el CB-839 fue utilizado en varios ensayos clínicos de fase II que estudiaban tratamientos combinatorios en distintos tipos de tumores (por ejemplo, con el inhibidor tirosina quinasa cabozantinib en carcinoma de células renales, o con TMZ en glioma), no mostrando un incremento significativo en la eficacia del tratamiento combinado en comparación a la monoterapia sin CB-839. Este panorama muestra la necesidad de encontrar una firma molecular del tumor que pueda funcionar como un indicador fiable de la potencial efectividad terapéutica de un tratamiento combinado que incluya al inhibidor CB-839, que sigue siendo probado hasta el momento actual en tratamientos combinados con diversos fármacos en multitud de modelos tumorales. Así, estudios en modelos de ratón xenoinjertados con células de cáncer colorrectal humanas mostraron que el tratamiento combinado de 5-fluoro uracilo (5-FU), que actúa inhibiendo la actividad timidilato sintasa (TS), y CB-839 mostraban mayor efectividad que la monoterapia con 5-FU en los casos en que la célula tumoral albergaba una versión mutante de *PIK3CA*, que codifica la subunidad catalítica p110 α de PI3K, ya que en estos casos el CB-839 conseguía incrementar la capacidad inhibitoria del 5-FU sobre la TS. De hecho, el CB-839 mostraba efectividad al inhibir el crecimiento del tumor cuando la mutación estaba presente, pero no frente a la versión no mutada (Campos-Sandoval et al., 2021; Yang et al., 2021; Zhao et al., 2020). Por otra parte, se han desarrollado derivados del CB-839 que modifican el grupo azufrado para sustituir el átomo de azufre por un átomo de selenio, y que mostraron mayor capacidad de acumulación en el tumor, inhibición sobre GLS y generación de ROS, llamados CPD20 y CPD23 (Chen et al., 2019; Matés et al., 2020).

Introducción

De forma similar, el compuesto inhibidor CPD3B o Hexylselen, que contiene dos átomos de selenio en su estructura, mostró eficacia antitumoral frente a un panel de líneas celulares tumorales *in vitro*, así como frente a modelos de tumores *in vivo*, minimizando la toxicidad hacia el tejido sano. El CPD3B inhibe principalmente a GLS, pero también tiene actividad inhibitoria sobre las enzimas GDH, TXNRD1/2 y el complejo amidotransferasa GatCAB, resultando todo ello en la inducción de apoptosis (Ruan et al., 2019).

Por otra parte, el 968 actúa asociándose en la unión de dos monómeros de GA para prevenir la formación del tetrámero activo (Katt et al., 2012). El 968 ha mostrado efectividad inhibitoria frente a todas las isoenzimas GA, tanto GLS como GLS2, teniendo de hecho tres veces mayor capacidad de inhibición frente a las isoformas GLS2 en comparación a las isoformas GLS (Lukey et al., 2019; Stalnecker et al., 2015; Wang et al., 2010). La figura 15 muestra las estructuras químicas de los principales inhibidores de GLS hasta el momento actual.

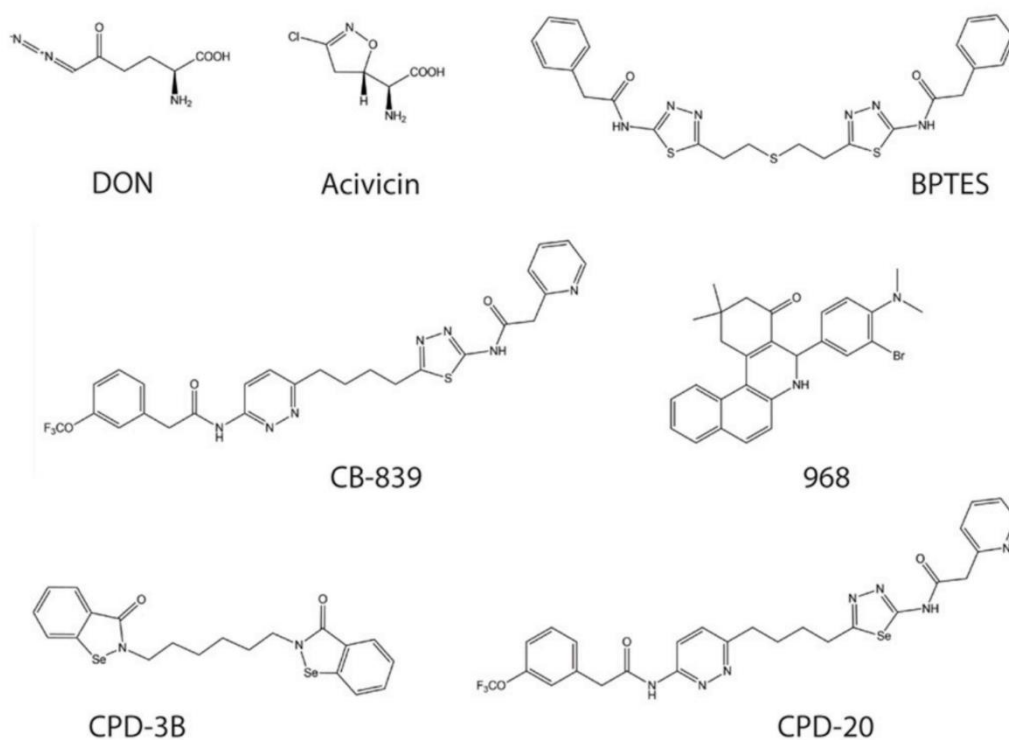


Figura 15. Estructura química de algunos de los inhibidores más relevantes de las isoformas GLS (KGA y GAC), incluyendo tanto análogos del sustrato (DON, Acivicina), como inhibidores alostéricos (BPTES, CB-839, 969, CPD-3B y CPD-20). Figura tomada y modificada de Matés et al., 2019.

En cuanto a inhibidores selectivos de las isoenzimas GLS2, sólo las alquil benzoquinonas producidas por la planta *Ardisia virens* o *Ardisia kusukuensis* se han mostrado prometedores en cuanto a selectividad y capacidad inhibitoria, entre los que destaca el compuesto AV-1 o ardisianona, la cual fue capaz de inhibir la proliferación de líneas

celulares humanas de HCC o de tumores de pulmón (Katt et al., 2017; Lee et al., 2014; Yu et al., 2013).

La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la función de las isoenzimas GA sobre diferentes aspectos del metabolismo y la regulación en la célula tumoral. Este ha sido un esfuerzo de investigación básica, con la potencialidad de que en un futuro esta información pueda ser relevante en clínica. De hecho, actualmente se explora la modulación de la función GA como opción terapéutica, especialmente empleando en ensayos clínicos inhibidores de GAs en combinación con otros tratamientos, en diversos tipos de cáncer. Como se ha venido detallando en esta introducción, las isoenzimas GA se han asociado en diferentes tipos de cáncer y sus modelos de estudio con funciones pro-oncogénicas o supresoras tumorales, especialmente esto último en el caso de GLS2, que son contexto dependiente. Igualmente, y sobre todo en el caso de GLS2, estudios recientes han documentado funciones que van más allá de la actividad catalítica, lo que sugiere un posible papel multifuncional de las isoenzimas GA, que añade si cabe mayor complejidad al estudio de su papel en el marco de la célula tumoral. En esta tesis se han empleado modelos de células de glioblastoma cultivadas *in vitro*, modificadas genéticamente para alterar la expresión de las diferentes isoenzimas GA, así como tratamientos farmacológicos con inhibidores de su actividad catalítica, para el estudio de sus funciones en glioblastoma. Particularmente, se ha analizado el impacto que tiene la función o falta de función de las GAs sobre el metabolismo de la célula tumoral desde una aproximación metabólica, el estado de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes, y su relación con elementos de regulación epigenética, como es la expresión de varios miRNAs, habida cuenta de las funciones catalíticas y no catalíticas previamente descritas en la bibliografía, incluyendo la de GLS2 como un estabilizador de la proteína Dicer.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hipótesis y Objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hipótesis

Las isoenzimas glutaminasa poseen funciones catalíticas y no catalíticas, que pueden impactar en un conjunto diverso de procesos celulares, y estas difieren entre isoenzimas.

Las glutaminasas son potenciales dianas terapéuticas que explotar en cáncer, y la modulación de sus funciones puede ser de interés clínico en determinados contextos moleculares.

En función de las hipótesis de estudio anteriores, se han propuesto los siguientes **objetivos** para la presente tesis doctoral:

1. Analizar y descubrir nuevas funciones de GLS y GLS2, así como el impacto de estas sobre diferentes elementos moleculares, incluyendo regulación epigenética y del balance redox.
2. Estudiar el impacto de la función glutaminasa sobre el metabolismo en células de glioblastoma, buscando identificar rutas metabólicas afectadas que limiten las capacidades prooncogénicas de la célula tumoral.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hypothesis and Aims



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hypothesis:

Glutaminase isoenzymes have both catalytic and non-catalytic functions, which differ among isoenzymes, and may impact several cell processes.

Glutaminases represent potential therapeutic targets to exploit in cancer, and the modulation of their functions may be of clinical interest in some molecular contexts.

Based on these hypotheses, the following **aims** have been proposed:

1. To analyze and discover new functions of GLS and GLS2, as well as the relationship of their functions with several molecular elements, including epigenetic regulation and redox balance.
2. To study the impact of glutaminase function on the metabolism of glioblastoma cells, looking for identifying metabolic pathways that limit the oncogenic capacities of the cell.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Material y Métodos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Químicos

El inhibidor CB-839 se obtuvo de SelleckChem (Houston, TX, USA). El dimetil-sulfóxido (DMSO), dimetil-alfa-cetoglutarato (DMKG), azul tripán, Hoesch, yoduro de propidio, clorhidrato de metoxiamina, piridina y tert-butildimetilsilil éter (TBDMS) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los derivados marcados isotópicamente U-¹³C-Gln y ¹⁵N-Gln se obtuvieron de Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA). Los antibióticos G418 (geneticina), puromicina, ampicilina y kanamicina se obtuvieron de Panreac Applichem (Barcelona, España/ Darmstadt, Alemania). Los vectores para transfección pcDNA3 y pcDNA3-GLS2 se compraron a Genscript Biotech (Piscataway, NJ, USA). El reactivo de transfección lipofectamina™ 3000 se compró a Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Salvo que se especifique lo contrario, los reactivos de uso común y las sales para la generación de soluciones y demás se obtuvieron de Sigma-Aldrich o Panreac Applichem.

Cultivo bacteriano, transformación y aislamiento de plásmidos de interés

La cepa de *Escherichia coli* DH5α se utilizó para amplificar los diferentes plásmidos de interés utilizados para la generación de los modelos de estudio. Como norma general, se trabajó en un entorno aséptico utilizando mechero bunsen o cabina de flujo laminar. Se partió de stocks bacterianos en glicerol almacenados a -80°C. Se generaron células competentes para transformación mediante tratamiento con CaCl₂, y posteriormente se procedió a transformar con el ADN plasmídico de interés mediante choque térmico, utilizando 50-100 ng de ADN plasmídico, y seguido de cultivo en placas de petri con medio LB Agar suplementadas con ampicilina 50 µg/mL. En cada ocasión, se sembraron tres placas con diferentes densidades celulares, buscando la aparición de colonias individuales, y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se picaron colonias individuales y se inocularon en tubos de centrifuga estériles con 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina 50 µg/mL para su cultivo líquido. Las bacterias se dejaron crecer toda la noche en agitación a 37°C. Pasado ese tiempo, las células se centrifugaron y se aisló el ADN plasmídico utilizando el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II (Omega Biotek, Norcross, GA, USA). La pureza y concentración del ADN plasmídico aislado se analizó en un sistema Nanodrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Igualmente, el ADN plasmídico aislado se analizó mediante digestión simple o doble con enzimas de restricción, seguida de electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v) utilizando como marcaje SYBR™ Safe (ThermoFisher Scientific), y posterior visualización en un sistema de imagen ChemiDoc™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y análisis del patrón de fragmentos de restricción generados.

Cultivos celulares y modelos de estudio

La línea celular de glioblastoma (GBM) humana LN229 fue cultivada en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), alto en glucosa (4,5 g/L), suplementado con suero

fetal bovino (FBS) al 10%, L-Gln 4 mM, 100 I.U. penicilina y 100 µg/mL estreptomycin. Las líneas celulares de GBM humanas T98G y U87MG fueron cultivadas en medio esencial mínimo de Eagle (MEM), suplementado con FBS al 10%, L-Gln 2 mM, 100 I.U. penicilina y 100 µg/mL estreptomycin. Todas las células se mantuvieron en condiciones de normoxia y 5% de CO₂. El modelo LN229 silenciado en GLS (LN229-GLS(-)), fue generado por transfección con un vector lentiviral expresando un shRNA dirigido contra GLS (ambas isoenzimas, KGA y GAC), conteniendo el gen de resistencia a puromicina. Se seleccionaron transfectantes estables, que fueron luego mantenidos en cultivo utilizando medio suplementado con puromicina 1 µg/mL. Como control, se utilizaron células LN229 transfectadas de forma estable con el cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP), empleando también puromicina como antibiótico de selección. El modelo T98G silenciado en GLS (T98G-GLS(-)) fue generado por transfección transitoria utilizando lipofectamina™ 3000 y una combinación 1:1 de dos siRNAs comerciales dirigidos contra GLS en dos regiones distintas (NM_014905, sitio de inicio de secuencia alrededor de 1072 y 780, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Como control se utilizó transfección con un siRNA control, no dirigido contra ninguna diana (Merck) en las mismas condiciones. Para la generación de modelos de sobreexpresión GLS2 (GAB) de LN229 y T98G, se transfectaron las células utilizando lipofectamina™ 3000 y un vector pcDNA3 conteniendo el cDNA completo de GLS2 y el gen de resistencia a neomicina. Como control se transfectaron las células con el mismo vector, pcDNA3, vacío. Las células transfectadas fueron seleccionadas con G418 a 0,75 µg/mL (LN229) o 0,5 µg/mL (T98G). Tras 48-72h de selección, las células supervivientes del cultivo policlonal fueron aisladas en pocillos de placas de 96 para aislar células individuales buscando generar poblaciones monoclonales con expresión estable de la proteína. La expresión de GAB y el silenciamiento de GLS en los respectivos modelos fue verificada periódicamente a nivel de proteína mediante inmunotransferencia *Western* y a nivel de ARN mensajero mediante extracción de ARN total seguido de RT-q-PCR.

Adicionalmente, a lo largo de esta tesis y de forma puntual, se emplearon también otras líneas celulares con propósitos concretos, como la optimización de protocolos o su uso como controles. Entre estas se incluyen la línea celular embrionaria de riñón humano HEK 293T, o la línea celular de riñón de mono Cos7.

Para analizar la tasa proliferativa de los diferentes modelos celulares y condiciones experimentales, se realizó rutinariamente curva de crecimiento o ensayo del tiempo de duplicación y conteo de células utilizando azul tripán como método de tinción vital. En el ensayo de tiempo de duplicación, las células se sembraron en pocillos a una densidad apropiada y se dejaron crecer durante 72 h, pasadas las cuales el número de células se contó, y volvió a sembrarse de nuevo el mismo número inicial de células. El proceso se repitió 3-4 veces y en función del número de duplicaciones en cada ciclo, se calculó el tiempo de duplicación.

Ensayo de viabilidad celular

Para analizar la viabilidad celular en diferentes condiciones experimentales, se empleó doble tinción celular con Hoesch 1 µg/mL (para teñir células totales) y yoduro de propidio 1 µg/mL (para teñir las células inviables), seguido de incubación durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se procedió a la obtención de imágenes y análisis de datos utilizando para ello el citómetro de placa Celigo Image Cytometer (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA).

Extracción y cuantificación de proteína

Las células fueron lavadas utilizando tampón fosfato salino (PBS) frío 3 veces y se añadió tampón de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% dioxicolato sódico, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, suplementado con inhibidores de proteasas). Las células se rasparon y fueron centrifugadas a 12000g, 15 min, 4°C. Se recogió el sobrenadante y se ensayó o guardó a -80°C.

Para cuantificar proteína total, se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific), en formato de microplaca, empleando 25 µL de muestra o patrón de albúmina sérica bovina (BSA), y 200 µL de reactivo BCA. En general, la cantidad de proteína total fue empleado como método de normalización para los diferentes ensayos, salvo que se indique lo contrario.

Inmunotransferencia Western

Los extractos de proteína se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Un volumen de muestra equivalente a 20 µg de proteína se cargó y resolvió mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida-SDS de porcentaje variable (por defecto, al 10%). Tras ello, las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF. Las membranas fueron bloqueadas utilizando leche en polvo desnatada al 5% o BSA al 5% en TBST (tampón Tris suplementado con Tween-20), durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) en agitación. Para la detección de GLS, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación, con anticuerpos específicos de isoenzima (KGA o GAC) en BSA al 5% en TBST, diseñados contra un péptido de la región C-terminal y obtenidos en conejo, donados por el laboratorio del Prof. Norman P. Curthoys. Para la detección de GLS2 (GAB), se utilizaron anticuerpos comerciales (ab 113509, Abcam, Cambridge, UK). Como control de carga se utilizó un anticuerpo comercial contra β-actina (MAB1501, Merck). Tras la incubación, las membranas se incubaron 1 h a RT en agitación con soluciones de anticuerpo secundario conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) en TBST. Se utilizaron anticuerpos generados en cabra contra la fracción cristalizante (Fc) de anticuerpos de conejo (A0545, Merck) o generados en conejo contra

Fc de ratón (A9044, Merck), dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Las bandas se visualizaron en un sistema de imagen ChemiDoc™ (Bio-Rad), empleando el reactivo quimioluminiscente (ECL) SuperSignal™ West Pico (ThermoFisher Scientific). Los datos de imagen se analizaron utilizando el software ImageLab (Biorad).

Extracción de ARN, microarray y RT-q-PCR

Para la extracción de ARN total se utilizó Trizol™ (Invitrogen), o bien el kit miRCURY RNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración y pureza de ácidos nucleicos se evaluó utilizando un sistema Nanodrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific). Para la identificación de miRNAs con expresión alterada mediante microarray, las muestras de ARN puro se empaquetaron y enviaron en hielo seco a la empresa Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania), que realizó la evaluación de la calidad del ARN, marcaje, microarray y análisis de datos. Los cambios de expresión de miRNAs fueron verificados mediante RT-q-PCR. Para ello, se aisló ARN total conteniendo los miRNAs, y 1 µg de ARN total se retrotranscribió a ADN usando el kit miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Universal cDNA Synthesis Kit II (Qiagen). Para la PCR cuantitativa se utilizó el fluoróforo ExiLENT SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) y oligonucleótidos específicos para los miRNAs diana, y se analizó en un termociclador CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 10 min 95°C, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, y 1 min a 60°C. Como normalizador endógeno se utilizó el ARN pequeño nuclear U6. Los datos se analizaron de acuerdo con el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Cuantificación de glutatión total (GSH)

Los niveles de GSH totales se analizaron utilizando el kit glutathione assay kit (#STA-312) de Cell Biolabs (San Diego, California, USA). Aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células cultivadas en placas de 100 mm de diámetro se lavaron tres veces con PBS frío y fueron mecánicamente lisadas en PBS. Tras centrifugar, el sobrenadante se dividió en dos alícuotas, una utilizada para cuantificar proteína y otra en la que se añadió un volumen de ácido metafosfórico al 10% para dejarlo al 5% y centrifugando, para obtener un lisado desproteinizado. El sobrenadante se diluyó al menos 1:10 y se utilizó en microplacas para el ensayo, añadiendo 100 µL de muestra o estándar de GSSG conocido por pocillo, junto con 25 µL de solución glutatión reductasa, 25 µL de solución NADPH y 50 µL de buffer conteniendo DTNB. Se midió la absorbancia en lectura cinética cada 60 s durante 10 min en un lector espectrofotométrico de placas (Eon, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) a 405 nm. La concentración de GSH se dedujo por comparación con la curva estándar y normalizó respecto a la cantidad de proteína total.

Ensayo de actividad glutatión reductasa (GR)

La actividad GR se analizó utilizando el kit Glutathione Reductase Assay kit (#STA-812) de Cell Biolabs. Aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células se lavaron tres veces con PBS frío, fueron mecánicamente lisadas en buffer de ensayo y centrifugadas. El ensayo se realizó en microplaca, empleando 100 μ L de sobrenadante procedente de las muestras o curva estándar de enzima GR por pocillo, 25 μ L de solución NADPH, 25 μ L de solución GSSG y 50 μ L de tampón conteniendo DTNB. Se midió la absorbancia en lectura cinética cada 60 s durante 10 min en un lector espectrofotométrico de placas Eon, (Biotek Instruments). La tasa de reciclaje de GSH corresponde a la actividad GR de cada muestra, que se calculó por comparación con el estándar y normalizó respecto al contenido de proteína total.

Ensayo de actividad catalasa (CAT)

La actividad CAT se determinó utilizando el kit Catalase Assay kit (#STA-341) de Cell Biolabs. Aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células se lavaron tres veces con PBS frío, se rasparon en PBS 1 mM EDTA frío y se lisaron mecánicamente. Tras centrifugar, se realizó ensayo de actividad en microplaca empleando 20 μ L de sobrenadante o curva estándar de enzima catalasa por pocillo, a los que se añadieron 50 μ L de H_2O_2 12 mM y se incubó por 1 min. La reacción se detiene añadiendo 50 μ L de solución conteniendo azida sódica. 5 μ L de la reacción anterior se transfieren a un nuevo pocillo y se añaden 250 μ L de reactivo colorimétrico, y tras incubar por 40-50 min se mide espectrofotométricamente a 520 nm. La actividad CAT es inversamente proporcional a la cantidad de restante tras la incubación de 1 min, y se calcula por comparación con la curva estándar y normaliza respecto a la cantidad de proteína total.

Ensayo de actividad superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD se cuantificó usando el kit SOD assay kit #STA-340 de Cell Biolabs. Aproximadamente $3,5 \times 10^6$ se lavaron con PBS frío y se rasparon en tampón de lisis (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM, NaCl, 0,1 mM EDTA). Las muestras se lisaron mecánicamente y centrifugaron. El sobrenadante se utilizó para ensayo en microplaca, añadiendo 70 μ L de muestra o estándar de concentración de enzima SOD conocida por pocillo, y añadiendo soluciones de xantina y cromógeno, junto con enzima xantina oxidasa para un volumen final de 100 μ L por pocillo. La reacción de la xantina por la xantina oxidasa genera iones superóxido, y la enzima SOD y el cromógeno compiten por el superóxido como sustrato. De ese modo, la actividad SOD es inversamente proporcional a la absorbancia a 490 nm de la reacción, medida espectrofotométricamente. La actividad SOD se calcula por comparación con la curva estándar de SOD y se normalizó respecto a la cantidad de proteína total.

Ensayo de capacidad antioxidante total (TAC)

La TAC se cuantificó utilizando el kit #STA-360 de Cell Biolabs. Este método calcula la TAC celular como la capacidad de reducir iones Cu^{2+} a Cu^+ por diversos antioxidantes celulares, el Cu^+ reacciona con un cromógeno y es medido espectrofotométricamente a 490 nm. Aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células se lavaron tres veces con PBS frío, fueron mecánicamente lisadas en PBS y se centrifugaron. El ensayo se realizó en microplaca, utilizando 20 μL de sobrenadante o estándar de ácido úrico, junto con 180 μL de tampón de reacción conteniendo el cromógeno, y 50 μL de una solución de Cu^{2+} . Tras incubar 5 min a RT, la reacción se para añadiendo 50 μL de solución con azida sódica y se mide espectrofotométricamente a 490 nm. La TAC se calcula como equivalentes de ácido úrico al comparar con la curva estándar de concentraciones conocidas de ácido úrico, y se normaliza respecto a la cantidad de proteína total.

Cuantificación de los niveles de peroxidación lipídica (TBARS)

Los niveles de peroxidación de lípidos se midieron analizando el contenido de las muestras en sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), como son los subproductos de la peroxidación de lípidos malondialdehído (MDA) o 4-hidroxi nonenal (4-HNE), utilizando el kit #STA-330 de Cell Biolabs. Al menos $3,5 \times 10^6$ células se emplearon para el ensayo. Estas se lavaron con PBS frío y se resuspendieron a una densidad aproximada de 2×10^7 células/mL en PBS suplementado con hidroxitolueno butilado, para evitar oxidación inespecífica de lípidos durante el procesamiento de las muestras. Las células se lisaron mecánicamente, y se utilizaron 100 μL de homogenizado completo por reacción, a los que se les añaden 100 μL de solución SDS al 10%. Tras mezclar, se incubaba 5 min a RT y se añaden 250 μL de solución de ácido tiobarbitúrico 5,2 mg/mL pH 3.5. La mezcla de reacción se incubaba a 95°C por 50-60 min para favorecer la reacción del ácido tiobarbitúrico con las TBARS, lo que genera un complejo coloreado que absorbe a 532 nm. Pasado el tiempo de incubación, las muestras se enfrían a RT y se centrifugan 15 min a 3000 rpm. El sobrenadante es utilizado para lectura espectrofotométrica a 532 nm o fluorimétrica, habiéndose empleado preferentemente esta última ya que posee mayor sensibilidad. Para ello, se transfieren 150 μL de sobrenadante a pocillos de una placa negra de 96 pocillos y se mide en un lector de placas fluorimétrico utilizando una longitud de onda de 540 nm para la excitación y de 590 nm para la emisión. Los niveles de TBARS se cuantifican por comparación con un estándar de MDA de concentraciones conocidas y se normalizan respecto a la cantidad de proteína total.

Cuantificación de grupos carbonilo de proteínas

El daño oxidativo a proteínas entendido como generación de grupos carbonilo se analizó utilizando el kit Protein carbonyl fluorometric assay STA-307 de Cell Biolabs. Al menos 7×10^6 células fueron empleadas para el ensayo. Las células se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en aproximadamente 500 μL de tampón de muestra, se lisaron mecánicamente y se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y se ajustó la concentración de proteína total a 10 mg/mL (previa cuantificación de proteína). Se transfieren 50 μL de muestra a nuevos tubos, donde se añaden 50 μL de solución conteniendo fluoresceína 5-tiosemicarbazida (FTC), y se incuba durante toda la noche a RT y protegido de la luz. Al día siguiente, se añaden 400 μL de una solución de ácido tricloroacético al 20% a cada tubo para precipitar la proteína, incubando en hielo por 10 min. Tras esto, se centrifuga, se descarta el sobrenadante y el pellet de proteína se resuspende en 1 mL de acetona, volviendo a centrifugar. El lavado con acetona se repite un total de tres veces. Tras el último lavado, se descarta el sobrenadante y se deja evaporar la acetona por aproximadamente 1 hora. Entonces, se añaden 50 μL de solución de solubilización de proteína y se deja disolver la proteína durante 10 min a RT, tras ello, se diluye con tampón de ensayo a un volumen final de 500 μL , se centrifuga y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo. Se toma una alícuota para cuantificar proteína total y otra de 100 μL se transfiere a pocillos de una placa negra de 96 pocillos y se mide en lector de placas fluorimétrico utilizando una longitud de onda de 480 nm para la excitación y de 530 nm para la emisión. El contenido en grupos carbonilo se calcula por comparación con un estándar de FTC y normaliza respecto al contenido de proteína total tras redisolver la proteína.

Metabolómica

Las células en cultivo se trataron con el inhibidor CB-839 o vehículo (DMSO) durante 24h. Pasado ese tiempo, se lavó con solución salina normal fría y se añadió 1 mL de metanol al 80% a -20°C . Las células se rasparon en frío y se transfirió el volumen a tubos de microcentrífuga. Las muestras se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación entre nitrógeno líquido y baño a 37°C . Los tubos se centrifugaron 15 min 17000g a 4°C y el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos. Las muestras se desecaron toda la noche en un concentrador de vacío Speed-Vac SPD1030 (ThermoFisher Scientific). Los precipitados que contienen los metabolitos se redisolieron, y se analizaron en un sistema de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF LC-MS) (Agilent Technologies, 6550 iFunnel, Santa Clara, CA, USA). Los datos se revisaron manualmente y la abundancia de metabolitos se normalizó respecto a la cuenta total de iones (TIC) de cada muestra. Cada experimento de metabolómica incluyó tres placas independientes

por condición experimental. Cada experimento se realizó dos veces de forma independiente.

Marcaje isotópico utilizando U-¹³C-Gln

Las células se trataron con CB-839 o DMSO durante 24 h. Pasado ese tiempo, se lavó dos veces con PBS y se trazó añadiendo medio de cultivo suplementado con Gln marcada en todos sus carbonos (U-¹³C-Gln), e incubando en condiciones estándar de cultivo por 6 h. Pasado ese tiempo, las muestras se procesaron tal como se describe en el subapartado “Metabolómica”, hasta la obtención del precipitado conteniendo los metabolitos. En este caso, los metabolitos se redisolviéron en clorhidrato de metoxiamina al 1% disuelto en piridina y se incubó 15 min a 70°C. Tras esto, los metabolitos se derivatizaron con TBDMS incubando 1 h a 70°C. Pasado ese tiempo, 1 µL de solución se inyectó y analizó en un sistema de cromatografía de gases (Agilent 7890A, Agilent Technologies) acoplado a espectrometría de masas (Agilent 5975C, Agilent Technologies). Los datos se revisaron manualmente, y la abundancia de cada isotopólogo se refirió a la abundancia total del metabolito, obteniendo las fracciones de isotopólogos para cada metabolito analizado. En cada experimento, se utilizaron tres placas independientes por condición. El experimento se realizó tres veces de forma independiente.

Marcaje isotópico utilizando ¹⁵N-Gln

Las células fueron tratadas y trazadas con medio suplementado con Gln marcada con ¹⁵N en el grupo amido por 6 h. Pasado ese tiempo, las placas se lavaron tres veces con solución salina fría, y se añadió 0,5 mL de acetonitrilo al 80% por placa. Las muestras se procesaron como se describe en el subapartado “Metabolómica”, y se analizaron en un sistema de LC-MS QTRAP 6500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Los datos se revisaron manualmente, y la abundancia de cada isotopólogo se refirió a la abundancia total del metabolito, obteniendo las fracciones de isotopólogos para cada metabolito analizado. En cada experimento, se utilizaron tres placas independientes por condición. El experimento se realizó tres veces de forma independiente.

Ensayo de actividad piruvato deshidrogenasa (PDH)

La actividad PDH se cuantificó utilizando el kit Pyruvate Dehydrogenase (PDH) Enzyme Activity Microplate Assay Kit ab109902 (Abcam). Las células fueron cultivadas en placas de 150 mm de diámetro, utilizando al menos 2×10^7 células por condición. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, el medio fue retirado y las placas se pusieron en hielo, donde se lavaron tres veces con PBS frío. Tras ello, se añadieron 3 mL de PBS suplementado con NaF 10 mM por placa y se rasparon las células, transfiriéndolas a

tubos de centrifuga. Las células se centrifugaron a 300xg, 5 min a 4°C, y el pellet se resuspendió en 500 µL de PBS NaF 10 mM frío. Se tomó una pequeña alícuota de la suspensión y se diluyó 1:25 en tampón de lisis RIPA. Se cuantificó la proteína total mediante el método del BCA y se diluyó la suspensión celular utilizando PBS NaF 10 mM para ajustar la concentración de proteína a 15 mg/mL. Tras ello, se añadió una décima parte del volumen de la suspensión de solución de detergente, se mezcló y se incubó en hielo por 10 min. A continuación, se volvió a centrifugar a 1000xg, 10 min a 4°C, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. El extracto se diluyó utilizando tampón de ensayo para dejarlo a una concentración de proteína final entre 2-5 mg/mL (el ensayo se optimizó encontrado este rango de concentración como óptimo para la cuantificación de la actividad PDH en los modelos celulares empleados), y la muestra se cargó en la placa de 96 pocillos suministrada con el kit, utilizando 200 µL de extracto por pocillo. Este método emplea una placa de 96 pocillos, los cuales poseen anclados un anticuerpo monoclonal contra PDH que permite la inmovilización en los pocillos del complejo PDH intacto, que retiene la actividad enzimática. Las muestras se incubaron a RT durante 3 h para permitir la unión del complejo PDH a los pocillos, y tras ello, se descartó el volumen de los pocillos y estos se lavaron dos veces usando solución estabilizadora. Tras ello, se añadieron 200 µL de la mezcla de reacción e inmediatamente se procedió a lectura cinética de la placa a 450 nm en un espectrofotómetro lector de placas, cada 30 s durante 30 min. Los datos se analizaron obteniendo la tasa de incremento de absorbancia por min, y esta se refirió a los mg de proteína total cargados en el pocillo. El ensayo se realizó cuatro veces independientes, utilizando dos réplicas técnicas por condición experimental. Como control positivo, y durante el proceso de optimización de las condiciones del ensayo, se utilizó paralelamente la línea celular HEK293T, por presentar una elevada cantidad y actividad PDH.

Análisis estadístico

En todos los casos, salvo que se indique lo contrario, se realizaron al menos tres experimentos independientes con al menos dos replicas técnicas por condición experimental. Igualmente, salvo que se indique lo contrario, los gráficos muestran la media \pm error estándar de la media (SEM), en forma de barras de error. Como norma general, se utilizó la prueba estadística t de Student para la comparación del grupo experimental respecto al grupo control. La significancia estadística es como sigue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns: no significativo. Para la realización de la mayoría de los gráficos de barras o puntos y el análisis estadístico, se utilizó el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Alternativamente, se utilizó Microsoft Excel para el análisis de datos. En el caso de la metabolómica, los *heatmaps* muestran los valores VIP (*VIP scores*) para los metabolitos que cambian significativamente, representándose los 50 metabolitos con mayor cambio significativo. Los *heatmaps* fueron generados utilizando la herramienta web Metaboanalyst mediante

análisis PLS-DA. Igualmente, y de forma independiente, para los resultados de metabolómica, los resultados del triplicado se analizaron mediante t de Student y se calculó el promedio de las veces de cambio (*Fold Change*) de cada experimental respecto a su control, que se representó en las gráficas. Salvo que se indique expresamente lo contrario, todos los resultados mostrados de metabolómica son estadísticamente significativos de acuerdo con los análisis anteriores, para ambos experimentos independientes.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resultados y Discusión



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tres artículos ya publicados avalan la presente tesis doctoral, un artículo de revisión, y dos artículos experimentales. Estos trabajos se relacionan más adelante, y comprenden el grueso de la metodología empleada, los resultados obtenidos, y la discusión de estos, estando recogidos en los apartados 1, 2 y 3 de Resultados y Discusión. Adicionalmente, se incluye un cuarto apartado (4) donde se muestran y discuten un conjunto de resultados no publicados todavía, obtenidos durante la presente tesis doctoral. Por otra parte, durante el desarrollo de la tesis se ha participado como coautor en otros tres artículos de revisión ya publicados que no avalan la tesis, y se relacionan como anexos en esta memoria.

1. Primer artículo:

Matés JM, Campos-Sandoval JA, De Los Santos-Jiménez J, Márquez J. Dysregulation of glutaminase and glutamine synthetase in cancer. *Cancer Lett.* 2019 Dec 28;467:29-39. doi: 10.1016/j.canlet.2019.09.011.

2. Segundo artículo:

de Los Santos-Jiménez J, Campos-Sandoval JA, Márquez-Torres C, Urbano-Polo N, Brøndegaard D, Martín-Rufián M, Lobo C, Peñalver A, Gómez-García MC, Martín-Campos J, Cardona C, Castilla L, da Costa Souza F, Cheng T, Segura JA, Alonso FJ, Curi R, Colquhoun A, DeBerardinis RJ, Márquez J, Matés JM. Glutaminase isoforms expression switches microRNA levels and oxidative status in glioblastoma cells. *J Biomed Sci.* 2021 Feb 20;28(1):14. doi: 10.1186/s12929-021-00712-y.

3. Tercer artículo:

De Los Santos-Jiménez J, Rosales T, Ko B, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Márquez J, DeBerardinis RJ, Matés JM. Metabolic Adjustments following Glutaminase Inhibition by CB-839 in Glioblastoma Cell Lines. *Cancers (Basel).* 2023 Jan 15;15(2):531. doi: 10.3390/cancers15020531.

4. Resultados no publicados y su discusión



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Dysregulation of Glutaminase and Glutamine Synthetase in Cancer

Matés JM, Campos-Sandoval JA, De Los Santos-Jiménez J, Márquez J. Dysregulation of glutaminase and glutamine synthetase in cancer. *Cancer Lett.* 2019 Dec 28;467:29-39. doi: 10.1016/j.canlet.2019.09.011.

Besides fast glucose catabolism, many types of cancers are characterized by elevated glutamine consumption. Medical oncology pursues to block specific pathways, mainly glycolysis and glutaminolysis, in tumor cells to arrest cancer development. This strategy frequently induces adaptive metabolic resistance that must be countered. Combination therapy is an anticancer synergistic tool to overcome both cancer growth and resistance mechanisms. Dysregulation of glutaminase and glutamine synthetase are key events that allow anabolic adaptation of tumors. Several specific drugs that inhibit metabolic enzymes dealing with glutamine metabolism have been able to eliminate some neoplasms. Targeting the tumor microenvironment can be also another essential factor to be taken into account when single or combined cancer metabolic therapy fails.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. Glutaminase Isoforms Expression Switches microRNA Levels and Oxidative Status in Glioblastoma Cells

de Los Santos-Jiménez J, Campos-Sandoval JA, Márquez-Torres C, Urbano-Polo N, Brøndegaard D, Martín-Rufián M, Lobo C, Peñalver A, Gómez-García MC, Martín-Campos J, Cardona C, Castilla L, da Costa Souza F, Cheng T, Segura JA, Alonso FJ, Curi R, Colquhoun A, DeBerardinis RJ, Márquez J, Matés JM. Glutaminase isoforms expression switches microRNA levels and oxidative status in glioblastoma cells. *J Biomed Sci.* 2021 Feb 20;28(1):14. doi: 10.1186/s12929-021-00712-y.

Abstract

Background: Glutaminase isoenzymes GLS and GLS2 play apparently opposing roles in cancer: GLS acts as an oncoprotein, while GLS2 (GAB isoform) has context specific tumour suppressive activity. Some microRNAs (miRNAs) have been implicated in progression of tumours, including gliomas. The aim was to investigate the effect of GLS and GAB expression on both miRNAs and oxidative status in glioblastoma cells.

Methods: Microarray profiling of miRNA was performed in GLS-silenced LN229 and GAB-transfected T98G human glioblastoma cells and their wild-type counterparts. Results were validated by real-time quantitative RT-PCR. Oxidative status and antioxidant enzymes were determined by spectrophotometric or fluorescence assays in GLS-silenced LN229 and T98G, and GAB-transfected LN229 and T98G.

Results: MiRNA-146a-5p, miRNA-140-3p, miRNA-21-5p, miRNA-1260a, and miRNA-92a-3p were downregulated, and miRNA-1246 was upregulated when GLS was knocked down. MiRNA-140-3p, miRNA-1246, miRNA-1260a, miRNA-21-5p, and miRNA-146a-5p were upregulated when GAB was overexpressed. Oxidative status (lipid peroxidation, protein carbonylation, total antioxidant capacity, and glutathione levels), as well as antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase) of silenced GLS glioblastoma cells and overexpressed GAB glioblastoma cells significantly changed versus their respective control glioblastoma cells. MiRNA-1246, miRNA-1260a, miRNA-146a-5p, and miRNA-21-5p have been characterized as strong biomarkers of glioblastoma proliferation linked to both GLS silencing and GAB overexpression. Total glutathione is a reliable biomarker of glioblastoma oxidative status steadily associated to both GLS silencing and GAB overexpression.

Conclusions: Glutaminase isoenzymes are related to the expression of some miRNAs and may contribute to either tumour progression or suppression through certain miRNA

mediated pathways, proving to be a key tool to switch cancer proliferation and redox status leading to a less malignant phenotype. Accordingly, GLS and GAB expression are especially involved in glutathione-dependent antioxidant defence.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. Metabolic Adjustments following Glutaminase Inhibition by CB-839 in Glioblastoma Cell Lines

De Los Santos-Jiménez J, Rosales T, Ko B, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Márquez J, DeBerardinis RJ, Matés JM. Metabolic Adjustments following Glutaminase Inhibition by CB-839 in Glioblastoma Cell Lines. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 15;15(2):531. doi: 10.3390/cancers15020531.

Simple Summary: Glioblastoma multiforme is the most common primary brain tumor. Unfortunately, it is also one of the cancer types that has the worst morbidity and mortality ratios, so new targets and treatments need to be found. The metabolism of glutamine is fundamental for the proliferation of many tumor cells, including glioblastomas. Glutaminase isoenzyme GLS is one of the responsible enzymes for the pro-oncogenic pathways that induce metabolic reprogramming and leads to altered levels of some amino acids and other key intermediary metabolites in glioblastoma. Using the clinically approved GLS inhibitor CB-839 (Telaglenastat), we found significant changes in glutamine metabolism, including both the oxidative and reductive fates of Gln-derived alpha-ketoglutarate in the tricarboxylic acid cycle, in three glioblastoma cell lines. One of them, the T98G glioblastoma cell line, showed the greatest modification of metabolite levels involved in the de novo biosynthetic pathways for nucleotides, as well as a higher content of methylated and acetylated metabolites.

Abstract: Most tumor cells can use glutamine (Gln) for energy generation and biosynthetic purposes. Glutaminases (GAs) convert Gln into glutamate and ammonium. In humans, GAs are encoded by two genes: GLS and GLS2. In glioblastoma, GLS is commonly overexpressed and considered prooncogenic. We studied the metabolic effects of inhibiting GLS activity in T98G, LN229, and U87MG human glioblastoma cell lines by using the inhibitor CB-839. We performed metabolomics and isotope tracing experiments using U-13C-labeled Gln, as well as 15N-labeled Gln in the amide group, to determine the metabolic fates of Gln carbon and nitrogen atoms. In the presence of the inhibitor, the results showed an accumulation of Gln and lower levels of tricarboxylic acid cycle intermediates, and aspartate, along with a decreased oxidative labeling and diminished reductive carboxylation-related labeling of these metabolites. Additionally, CB-839 treatment caused decreased levels of metabolites from pyrimidine biosynthesis and an accumulation of intermediate metabolites in the de novo purine nucleotide biosynthesis pathway. The levels of some acetylated and methylated metabolites were significantly increased, including acetyl-carnitine, trimethyl-lysine, and 5-methylcytosine. In conclusion, we analyzed the metabolic landscape caused by the GLS inhibition of CB-839 in human glioma cells, which might lead to the future development of new combination therapies with CB-839.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. Resultados no Publicados y Discusión



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

De forma adicional a los tres artículos ya publicados que avalan esta tesis, y que se relacionan más arriba, se ha querido incluir en esta memoria el presente apartado, que contiene la descripción de un conjunto de resultados obtenidos durante el periodo de realización de la tesis, pero no publicados aún, así como una breve discusión de estos, por considerarlos de relevancia para los objetivos planteados en esta tesis.

4.1. Modelos de Sobreexpresión GLS2 en LN229

Tras realizar transfección utilizando el vector pcDNA3-GLS2 o pcDNA3 vacío, selección, aislamiento de células individuales, crecimiento clonal, escalado y selección, la expresión de GLS2 se analizó mediante extracción de proteína e inmunotransferencia *Western* periódicamente, para comprobar la sobreexpresión de GLS2 y la estabilidad de esta en el tiempo. Se obtuvieron varias poblaciones monoclonales que efectivamente sobreexpresaban GLS2 a niveles detectables mediante *Western-Blot* y de forma estable en el tiempo. Particularmente, se seleccionaron dos de ellos porque poseían distintos niveles de sobreexpresión GLS2, de forma que pudiera buscarse un efecto de “dosis-respuesta” en los parámetros estudiados en relación con los niveles de expresión GLS2 (ver figura 16). Nomenclatura: LN229, línea LN229 *wild-type*; LN-EV, LN229 transfectada con el vector pcDNA3 vacío, y sometida al mismo procedimiento que los clones de sobreexpresión GLS2, funcionando como control de estos, al considerarse el control más apropiado ya que es cultivada en las mismas condiciones que los modelos de sobreexpresión (incluyendo G418 como antibiótico de selección), posee el vector con el que se transfectó, y ha sufrido un número de divisiones similar, al haber estado sometido igualmente al proceso de aislamiento, selección y amplificación clonal; LN-GLS2(+) HI, población monoclonal con sobreexpresión GLS2 estable a alto nivel; LN-GLS2(+) LO, población monoclonal con sobreexpresión GLS2 estable a niveles más bajos.

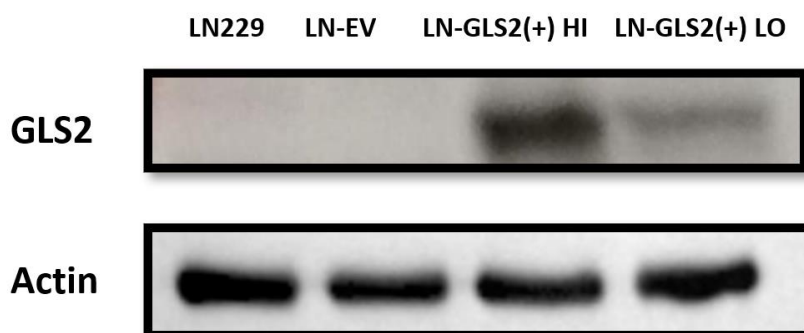


Figura 16. Imagen representativa de inmunotransferencia *Western-Blot*. Se utilizaron anticuerpos específicos para GLS2 (ver sección Material y Métodos), cuya banda se muestra con un tamaño aparente de 62 kDA. La detección de GLS2 es muy notable para los modelos de sobreexpresión,

mientras que los niveles de GLS2 son indetectables mediante esta técnica en los controles LN229 y LN-EV. Se utilizaron anticuerpos anti- β -actina como control de carga. La comprobación de la sobreexpresión GLS2 se realizó múltiples veces, de forma periódica cada 2-3 semanas que las células se encontraban en cultivo. La sobreexpresión GLS2 siguió en todas las ocasiones el mismo patrón mostrado arriba, demostrándose estable en el tiempo.

4.2. Efecto de GLS2 sobre la Proliferación Celular y Tratamiento con Inhibidores de Glutaminasa

Se comparó la tasa proliferativa de los modelos de sobreexpresión GLS2 con su control, mediante ensayo de tiempo de duplicación, consistente en la siembra y conteo celular utilizando azul tripán como método de tinción vital. Esta comparación se realizó tratando o sin tratar con el inhibidor de glutaminasa (GLS) CB-839. Los resultados se muestran en la figura 17, y se encontró que la expresión de GLS2 se relaciona con una menor capacidad proliferativa siguiendo un patrón dosis-respuesta, de forma que el modelo con menor expresión GLS2, LN-GLS2(+) LO, incrementa su tiempo de duplicación medio en un 20% respecto al control, mientras que el modelo con mayor expresión GLS2, LN-GLS2(+) HI, lo aumenta un 40%, teniendo un tiempo de duplicación medio de 41 horas frente a las 30 horas del control (figura 17, A). Igualmente, las células se trataron con CB-839 1 μ M o vehículo (DMSO) durante el tiempo de cultivo. El control LN-EV mostró un incremento del tiempo de duplicación medio del 93,3% (58 horas frente a 30 para las células tratadas con DMSO) (figura 17, B). Sin embargo, LN-GLS2(+) LO apenas muestra un incremento del tiempo de duplicación del 9% cuando se incluye CB-839 (figura 17, C), mientras que LN-GLS2(+) HI no muestra diferencia alguna en la capacidad proliferativa al tratarse con CB-839 (figura 17, D).

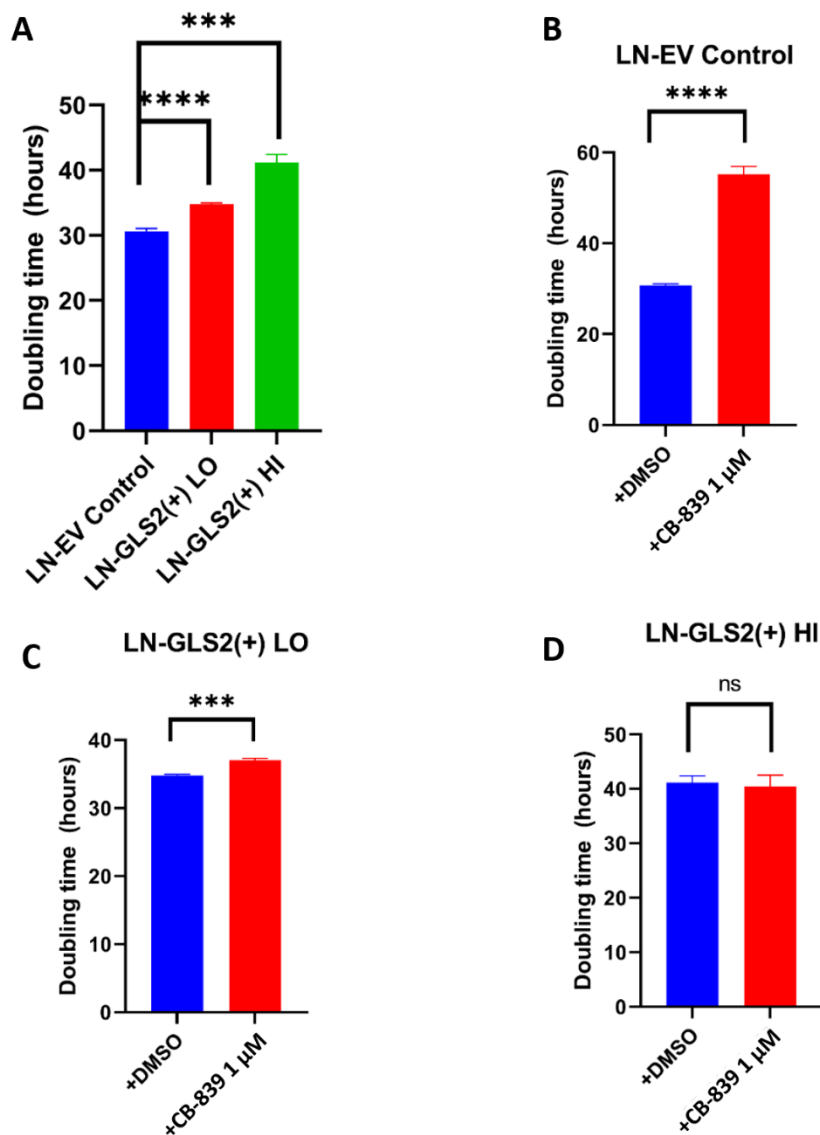


Figura 17. Tiempo de duplicación medio, en horas, de los modelos celulares LN-EV (control), LN-GLS2(+ LO) y LN-GLS2(+ HI). El panel A muestra las diferencias en tiempo de duplicación de estos modelos. (B) Diferencias en tiempo de duplicación del control LN-EV cuando el inhibidor CB-839 está presente en el medio de cultivo o no. (C) Tiempo de duplicación de LN-GLS2(+ LO) con o sin CB-839. (D) Tiempo de duplicación de LN-GLS2(+ HI) con o sin CB-839. Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: ***: p-value < 0,001; ****: p-value < 0,0001; ns: no significativo.

Igualmente, se utilizó ensayo de viabilidad celular empleando doble tinción con Hoesch y yoduro de propidio y obtención de imágenes mediante citómetro de placa. En este caso, se analizó la viabilidad de las células tratadas con CB-839 en un rango de concentraciones entre 1 nM y 10 μM, en comparación con células tratadas con vehículo (DMSO). El primer día, se sembraron 5 placas incluyendo cada una todas las condiciones experimentales, y cada día se tiñeron y analizaron las células de una placa. Cada condición experimental se incluyó por cuadruplicado. El número de células promedio de cada condición experimental se refirió al

número de células promedio de esa condición experimental el día 1, expresándose como las veces de cambio (Fold-Change, FC) del número de células. Los resultados, ilustrados en la figura 18, muestran que el CB-839 minimiza la proliferación/viabilidad celular con un patrón dosis-respuesta en el control LN-EV (A), mientras que las diferencias se atenúan en gran medida para LN-GLS2(+) LO (B) y son prácticamente inexistentes para LN-GLS2(+) HI (C).

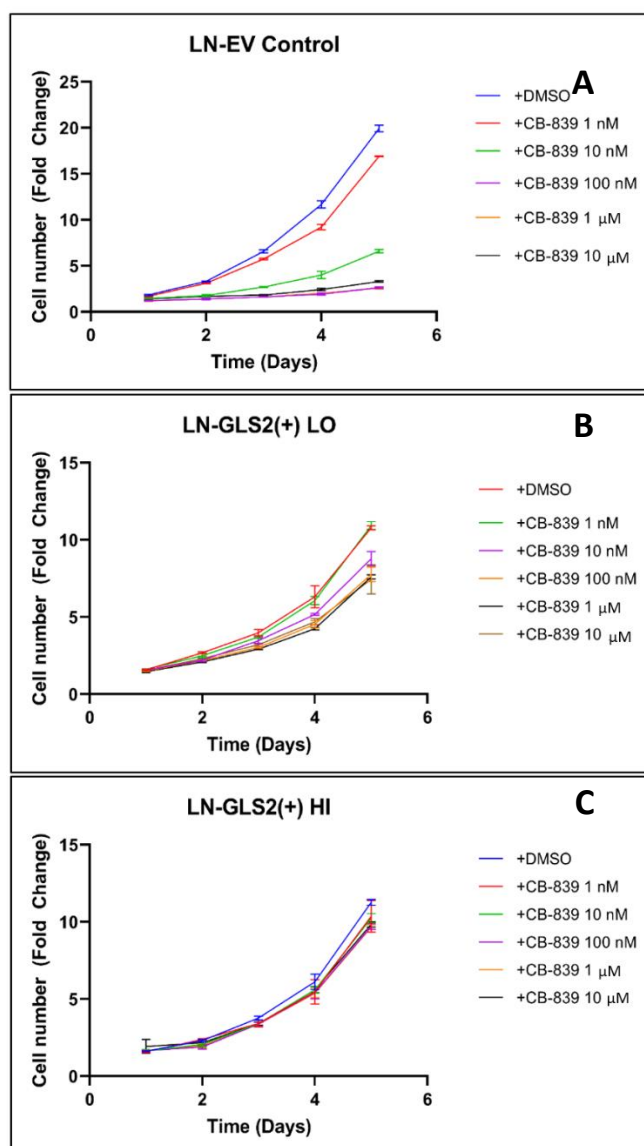


Figura 18. Se muestran las veces de cambio del número de células viables tratadas o no con CB-839 a lo largo de 5 días, para los tres modelos de estudio. El número de células viables se atenúa conforme aumenta la concentración de CB-839 utilizado en el control LN-EV (A), mientras que el efecto se mitiga cuando se expresa GLS2, siendo mucho menor en LN-GLS2(+) LO (B), o inexistente para LN-GLS2(+) HI (C).

Adicionalmente, este mismo ensayo de viabilidad celular se realizó tratando los tres modelos, junto con la línea *wild-type*, con un rango más amplio de concentraciones de CB-839 durante 72 h, buscando establecer la concentración inhibitoria 50 (IC50) del inhibidor en esas condiciones, definida como la concentración de CB-839 necesaria para originar una bajada de

la viabilidad celular al 50% respecto al control tratado con vehículo. La figura 19 muestra estos resultados, y puede observarse que la viabilidad cae para LN229 y LN-EV, calculándose una IC50 para CB-839 de 47,39 nM y 33,28 nM, respectivamente, mientras que la viabilidad se mantiene alrededor del 100% para los modelos con expresión GLS2, no pudiendo calcularse la IC50.

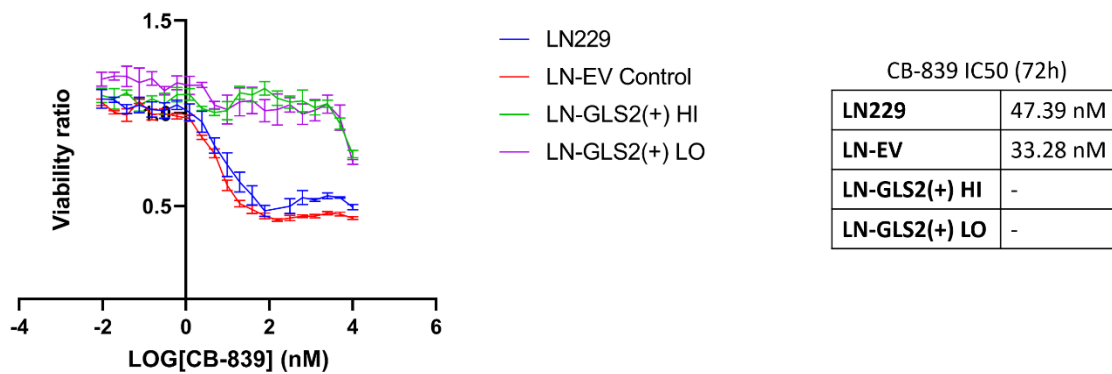


Figura 19. (A) Se representa la ratio de viabilidad obtenida al referir el número promedio de células viables de cada condición experimental respecto al número promedio de células viables del control, referida al logaritmo decimal de la concentración de CB-839. (B) Tabla donde se resume la IC50 de CB-839 calculada para cada modelo en las condiciones experimentales. La IC50 no pudo calcularse para los modelos con expresión GLS2 ya que siempre se mantuvo por encima del 50%.

Los niveles de expresión de GLS2 correlacionan con un incremento en el tiempo medio de duplicación de la célula y, por tanto, con una menor capacidad proliferativa *in vitro*. Además, este fenotipo ocasionado por GLS2 es dominante sobre GLS, ya que la función GLS en los modelos de sobreexpresión está intacta, coexistiendo la expresión de ambas isoenzimas GA (Fig. 17, A). Cabría pensar que alterar la actividad GA global de la célula (esto es, la actividad enzimática GA de todas las isoenzimas, GLS y GLS2) al sobreexpresar GLS2 podría afectar negativamente a otras rutas causando un desequilibrio homeostático de la regulación metabólica que desemboque en una menor capacidad proliferativa. Sin embargo, las condiciones experimentales de sobreexpresión GLS2 junto con inhibición específica de GLS mediante CB-839 pueden aportar información acerca de esto: los modelos de sobreexpresión GLS2 poseen una mayor actividad GA global, y cuando son tratados con CB-839, esta se reduce de nuevo al inhibir a las isoenzimas GLS. El tratamiento de estos modelos con el inhibidor CB-839 o aumenta levemente el tiempo de duplicación (LN-GLS2(+)-LO, Fig. 17, C), probablemente porque en este caso los niveles de expresión GLS2 no son suficientes como para compensar la inhibición de la actividad GLS presente en la célula; o no lo modifica (LN-GLS2(+)-HI, Fig. 17, D), por lo que los cambios en el tiempo de duplicación no correlacionan con la actividad glutaminasa global de la célula, ya que en ese caso cabría esperar que al inhibir GLS mediante CB-839 en los modelos de sobreexpresión, el tiempo de duplicación bajase y volviera a

aproximarse al del control. Por tanto, aunque se desconoce el mecanismo o mecanismos implicados, cabría pensar que este efecto antiproliferativo de GLS2 sea dependiente de funciones específicas de isoenzima, y posiblemente causado por funciones no catalíticas de GLS2. Este efecto antiproliferativo de GLS2 ya se ha venido documentando en diferentes casos y modelos de estudio, habiéndose adjudicado a GLS2 una posible función supresora tumoral, dependiente del contexto (Matés et al., 2020b). En gliomas, GLS suele aparecer sobreexpresada y GLS2 silenciada, siendo común que su promotor aparezca hipermetilado (Szeliga et al., 2016; Zhang et al., 2013). Este hecho hablaría en favor de que en el contexto molecular de muchas células de glioma, la función de GLS2 resulte en una actividad antitumoral. De hecho, GLS2 es diana transcripcional de supresores tumorales, entre ellos p53, y por ello podría participar en el programa molecular inducido por p53 y dirigido a contrarrestar la capacidad proliferativa (Hu et al., 2010; Suzuki et al., 2010). Este efecto de GLS2 puede estar relacionado con múltiples mecanismos independientes de la función enzimática descritos previamente para GLS2, como su efecto inhibitorio de la ruta de señalización de PI3K/AKT (Liu et al., 2014; Majewska et al., 2019). Por otra parte, la expresión de GLS2 hace resistentes a los modelos de sobreexpresión frente al tratamiento con CB-839, que se ha demostrado muy específico de isoenzima. En estos modelos, la actividad GA de GLS2 consigue insensibilizar a las células frente al efecto antiproliferativo/antitumoral de CB-839, lo que puede observarse en las figuras 18 (A, B y C), en las que se observa el efecto de dosis-respuesta de CB-839 sobre la viabilidad/proliferación celular en el control, y cómo este se atenúa en los modelos de sobreexpresión, reduciéndose considerablemente el efecto en LN-GLS2(+) LO y prácticamente mitigándose en LN-GLS2(+) HI. También, la figura 19 muestra tras 72 h de incubación cómo los modelos de sobreexpresión GLS2 ofrecen resistencia a CB-839, manteniendo el 100% de viabilidad, mientras que los modelos control LN229 y LN-EV demuestran ser sensibles al tratamiento. Los modelos de sobreexpresión tienen también un patrón de dosis-respuesta respecto de los niveles de expresión GLS2, ya que el modelo LN-GLS2(+) HI expresa GLS2 a niveles suficientes como para compensar por completo el efecto antiproliferativo de la inhibición farmacológica de GLS, mientras que en el modelo LN-GLS2(+) LO ese rescate no llega a ser completo. Estos resultados hablan de la selectividad del inhibidor CB-839 y de los niveles de expresión GLS2 como un posible predictor de la eficacia del tratamiento con inhibidores selectivos de GLS.

4.3. Trazado Isotópico con $U\text{-}^{13}\text{C}\text{-Gln}$ en Modelos con Sobreexpresión GLS2

Los modelos LN-EV, LN-GLS2(+) LO y LN-GLS2(+) HI se trazaron con Gln marcada en el carbono para analizar la contribución del carbono procedente de Gln en los metabolitos del ciclo TCA y metabolitos relacionados, buscando conocer el efecto de expresar GLS2 sobre el destino metabólico del carbono de la Gln. Los modelos de sobreexpresión GLS2 igualmente mantienen la expresión de GLS, por lo que adicionalmente se incluyó la condición experimental de tratar

a estos modelos con el inhibidor CB-839, que inhibirá selectivamente a GLS y no a GLS2, buscando recrear una situación en la que la actividad glutaminasa GLS se “sustituye” por la actividad GLS2. Los resultados, recogidos en la figura 20, muestran que la sobreexpresión GLS2 incrementa el marcaje m+4 procedente de Gln en los metabolitos del ciclo TCA. En el caso de LN-GLS2(+) HI, la marca m+4 en citrato se comportó de forma opuesta al resto de metabolitos, reduciéndose en este modelo respecto al control, y al modelo LN-GLS2(+) LO. En el caso de los modelos de sobreexpresión GLS2 tratados con CB-839, el modelo LN-GLS2(+) LO +CB-839, no muestra diferencias respecto al control LN-EV no tratado en la marca m+4 de fumarato, malato, aspartato y citrato. En el caso de LN-GLS2(+) HI +CB-839, el marcaje se reduce cuantitativamente, pero sigue siendo significativamente mayor respecto al control en succinato, fumarato, malato y aspartato, mientras que la reducción en el marcaje en citrato m+4 no se modifica con CB-839.

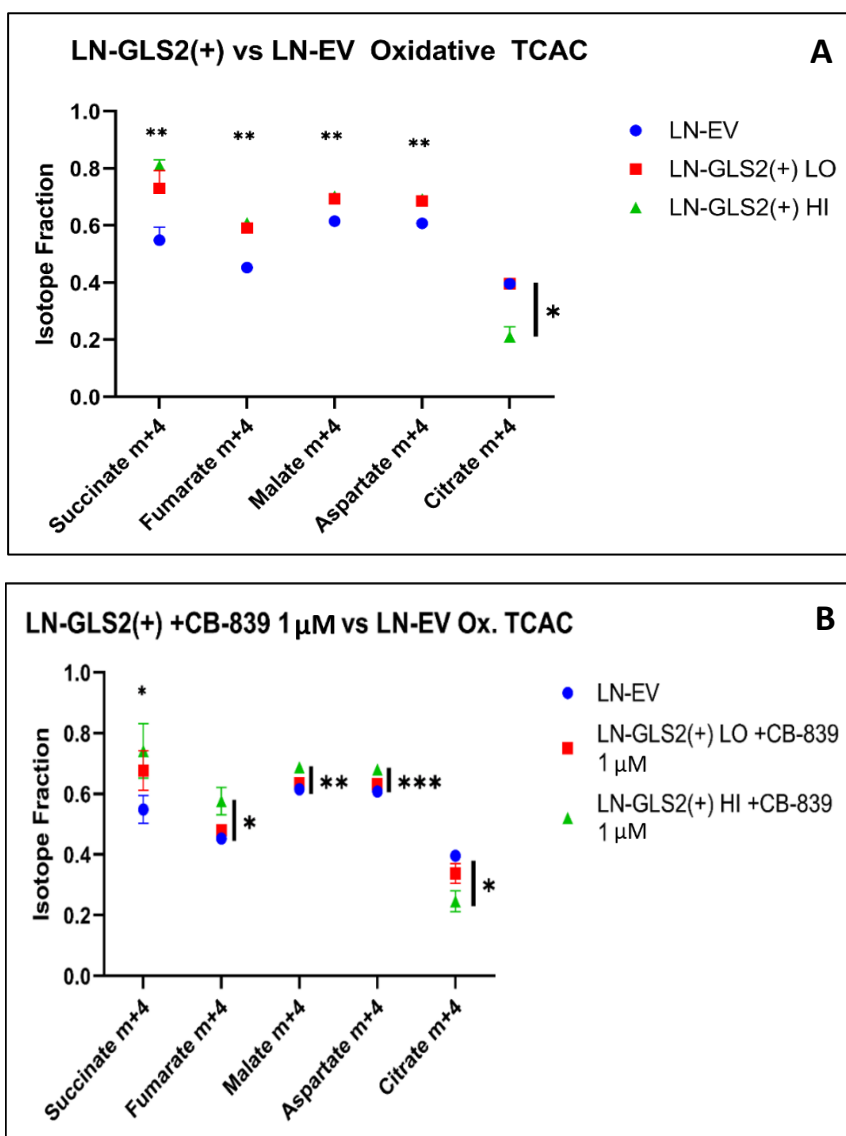


Figura 20. (A) Fracción de isotopólogos m+4 promedio respecto al total del metabolito para succinato, fumarato, malato, aspartato y citrato en los modelos LN-EV, LN-GLS2(+) LO y LN-GLS2(+) HI no tratados.

En (B) se muestran las fracciones de isotopólogos de estos metabolitos cuando LN-GLS2(+) LO y LN-GLS2(+) HI fueron tratados con CB-839. Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: *: p-value < 0,05; **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001.

El incremento en el marcaje de ^{13}C procedente de Gln marcada en succinato m+4, fumarato m+4, malato m+4 y aspartato m+4 (figura 20, A) es esperable dado el incremento en la actividad GA total de la célula debido a la expresión de GLS2, que “aporta” actividad GA adicional a la de GLS. En este escenario, se tendrá una mayor tasa de conversión de Gln en Glu, que hereda todos los carbonos marcados de la U^{13}C -Gln, y que a su vez puede convertirse en α -KG por aminotransferasas o GDH. El α -KG ingresa al ciclo TCA conservando los 5 carbonos marcados de la Gln, y podrá ser sustrato del complejo α -KG deshidrogenasa (α -KGDH), que descarboxila el α -KG liberando uno de los carbonos marcados en forma de CO_2 , para dar succinil-CoA y este a su vez succinato, que hereda por tanto 4 de los 5 carbonos marcados. En sucesivas reacciones oxidativas, el succinato generado dará lugar por la acción de SDH a fumarato, este a su vez podrá ser sustrato de FH para dar malato, y este podrá dar oxalacetato por la reacción catalizada por la malato deshidrogenasa. El oxalacetato sirve como aceptor de un grupo amino procedente de Glu en reacciones de transaminación, para producir aspartato. Los metabolitos antes mencionados, que son generados por vía oxidativa en el ciclo TCA desde α -KG derivado de Gln, conservarán cuatro carbonos marcados. Este patrón de herencia de átomos de carbono marcados desde Gln se sintetiza en la figura 21.

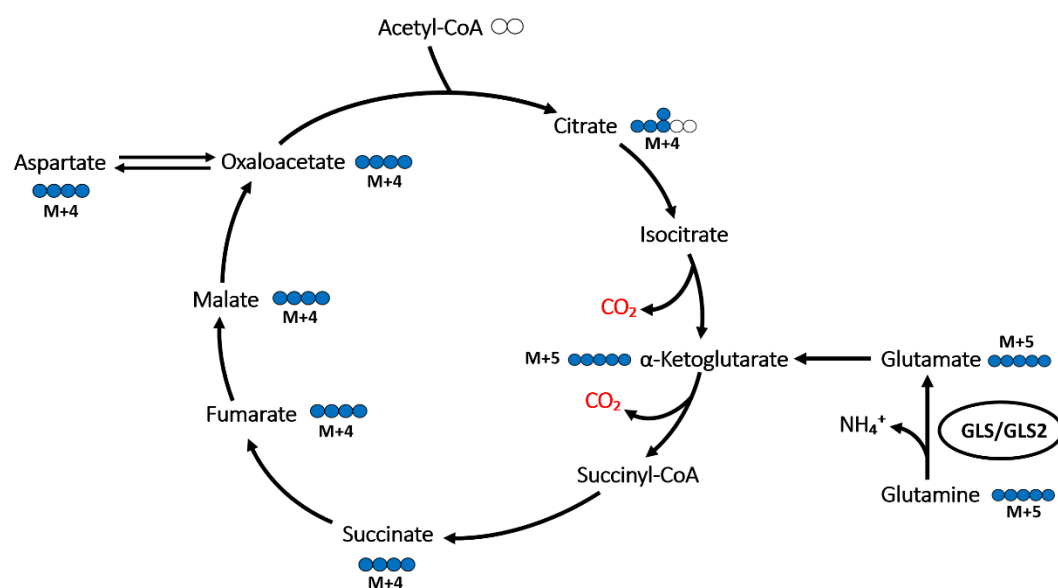


Figura 21. Esquema simplificado de herencia de carbonos marcados (azul) de la Gln por vía oxidativa en el TCA desde α -KG derivado de Gln. Figura tomada de De los Santos Jiménez et al., 2023.

Por tanto, el incremento en la proporción de estos metabolitos con la marca m+4 para un mismo tiempo de incubación con Gln marcada, indica que una mayor cantidad de carbono procedente de Gln está siendo dirigido hacia la síntesis de estos metabolitos por este camino metabólico, lo cual es lógico si existe una mayor actividad GA. Igualmente, el oxalacetato generado puede aceptar el resto acetilo aportado por acetil-CoA mitocondrial,

preponderantemente generado a partir de piruvato en la reacción catalizada por PDH, para dar citrato, en la reacción catalizada por la citrato sintasa. El citrato posee 6 carbonos, y por tanto, si es generado por esta vía heredará cuatro carbonos marcados, procedentes del oxalacetato, y dos no marcados, procedentes del acetil-CoA. Los resultados de trazado isotópico no mostraron diferencias en el citrato m+4 para LN-GLS2(+) LO, y más sorprendentemente, mostraron una bajada del 50% respecto al control (0,4 a 0,2) en la marca m+4 en citrato para LN-GLS2(+) HI. Este resultado fue inesperado ya que cabía pensar que el mayor flujo de carbono desde Gln marcada hacia el ciclo TCA, originado por una mayor actividad GA en los modelos de sobreexpresión, ocasionaría un aumento generalizado en el marcaje de todos los metabolitos del ciclo TCA. Sin embargo, los resultados mostraron inequívocamente que el marcaje m+4 sólo aumentaba en los modelos de sobreexpresión GLS2 en los intermediarios de cuatro carbonos del ciclo TCA, mientras que se reducía para el citrato en LN-GLS2(+) HI. El tratamiento de estos modelos con CB-839 buscaba conseguir una situación experimental en la que la única isoenzima GA con actividad relevante fuera GLS2. Dada la alta capacidad de inhibición de CB-839, que suele presentar una IC50 en el rango de nanomolar (Gross et al., 2014), la concentración de 1 μ M empleada conseguiría inhibir eficazmente casi por completo la actividad enzimática de GLS, quedando GLS2 como la principal GA activa. Estos resultados (Fig. 20, B), mostraban una bajada en el marcaje m+4 para succinato, fumarato, malato y aspartato en LN-GLS2(+) LO, tendiendo a volver a los niveles de marcaje del control, mientras que estos se modificaban poco o nada en el modelo LN-GLS2(+) HI, de forma que la expresión GLS2 de este modelo era capaz de mantener la contribución del carbono de Gln hacia el ciclo TCA. En el caso del citrato m+4, el marcaje en LN-GLS2(+) HI no se modifica, ni siquiera a nivel cuantitativo, cuando se aplica CB-839, manteniéndose el marcaje en el 20% (0,2). Este hecho apunta a que la bajada en el marcaje m+4 del citrato inducida por la expresión GLS2 es causada específicamente por esta isoenzima, y no por un cambio en la actividad GA total.

Por otra parte, en la figura 22 se muestran los resultados en estas mismas condiciones para el marcaje m+3 o m+5, que permite distinguir la generación de estos metabolitos a partir de Gln por medio de la vía de carboxilación reductiva. En este caso, el comportamiento es similar al de la marca asociada a la generación por vía oxidativa del ciclo TCA en fumarato, malato y aspartato, incrementándose el marcaje m+3 con la sobreexpresión GLS2, siendo mayores las diferencias en LN-GLS2(+) HI. En el caso del citrato, la marca m+5 se incrementa en gran medida en el modelo LN-GLS2(+) HI, que es el único que muestra diferencias significativas respecto al control, de forma que en este modelo la fracción de citrato marcado m+5 (0,35) pasa a ser mayor que la fracción con marca asociada a la vía oxidativa, citrato m+4 (0,20). La adición de CB-839 reduce cuantitativamente las diferencias respecto al control en LN-GLS2(+) LO, aunque el marcaje sigue siendo significativamente más alto en el caso del fumarato, malato y aspartato. El CB-839 no causa diferencias significativas en el caso de LN-GLS2(+) HI.

La figura 22 muestra el enriquecimiento de varios metabolitos del ciclo TCA en la marca asociada a la vía de carboxilación reductiva: el α -KG derivado de Gln marcada puede seguir

otro camino metabólico independiente de la reacción de α -KGDH, el de la de carboxilación reductiva.

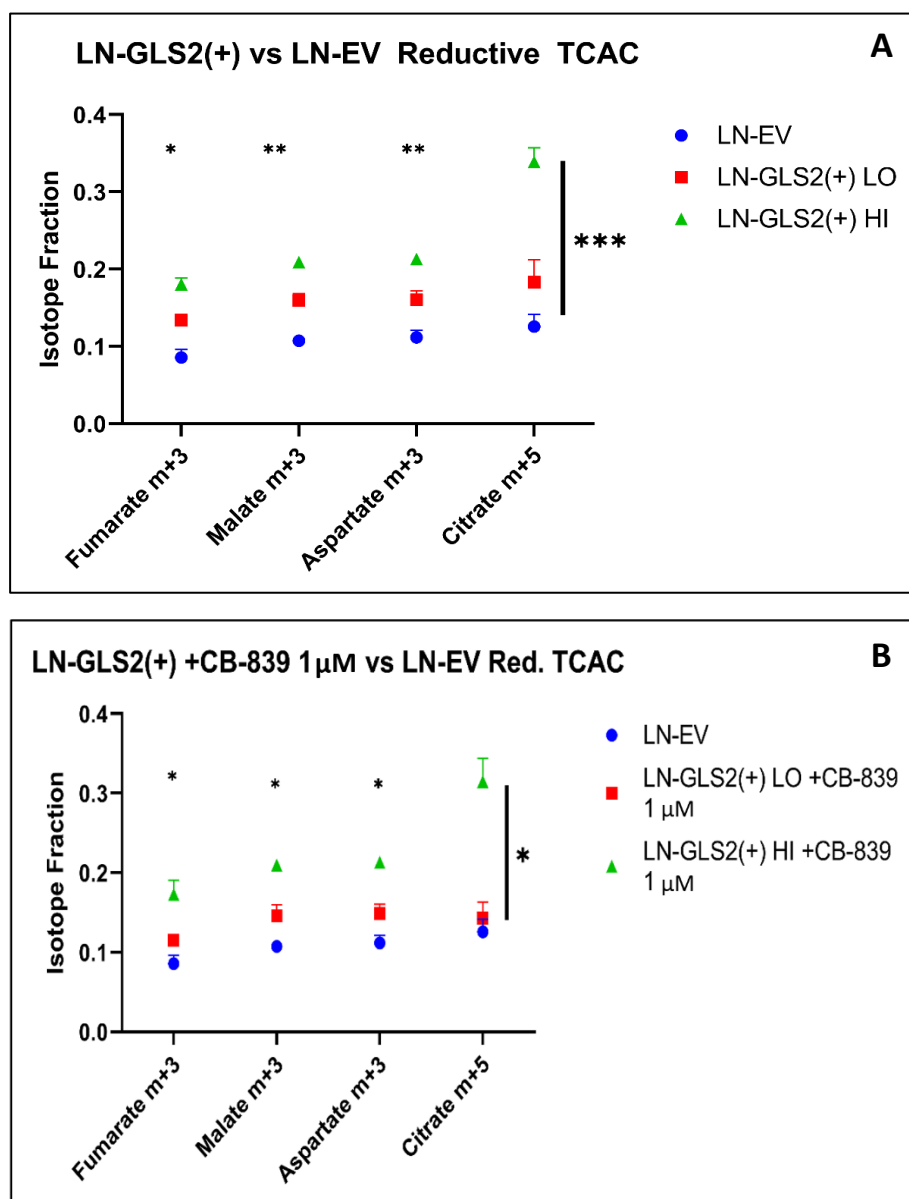


Figura 22. (A) Fracción de isotopólogos m+3 y m+5 promedio respecto al total del metabolito para fumarato, malato, aspartato y citrato en los modelos LN-EV, LN-GLS2(+)-LO y LN-GLS2(+)-HI no tratados. En (B) se muestran estas fracciones para estos metabolitos cuando LN-GLS2(+)-LO y LN-GLS2(+)-HI fueron tratados con CB-839. Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: *: p-value < 0,05; **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001.

El α -KG puede ser sustrato de las IDH en una reacción no canónica de carboxilación en la que acepta una molécula de CO_2 , para dar isocitrato. El isocitrato a su vez puede generar, previa formación de aconitato, citrato. Estos intermediarios de 6 átomos de carbono generado por esta vía reductiva heredan 5 carbonos marcados desde la Gln, y por ello puede distinguirse el citrato generado por vía oxidativa (m+4) del generado por vía reductiva (m+5). Igualmente, el

citrato puede salir de la mitocondria y generar de oxalacetato y acetil-CoA en la reacción catalizada por ACLY. En este caso, el oxalacetato generado hereda 3 carbonos marcados, ya que el acetil-CoA hereda dos de los carbonos marcados. Ese oxalacetato puede servir para generar aspartato por transaminación, o malato y sucesivamente fumarato, por la vía reductiva. Estos metabolitos heredarán igualmente 3 carbonos marcados y podrán distinguirse de los generados por la vía oxidativa, que poseen la marca m+4. Esta disposición se sintetiza en la figura 23, que representa el número de átomos de ^{13}C heredados por estos metabolitos por vía reductiva desde Gln.

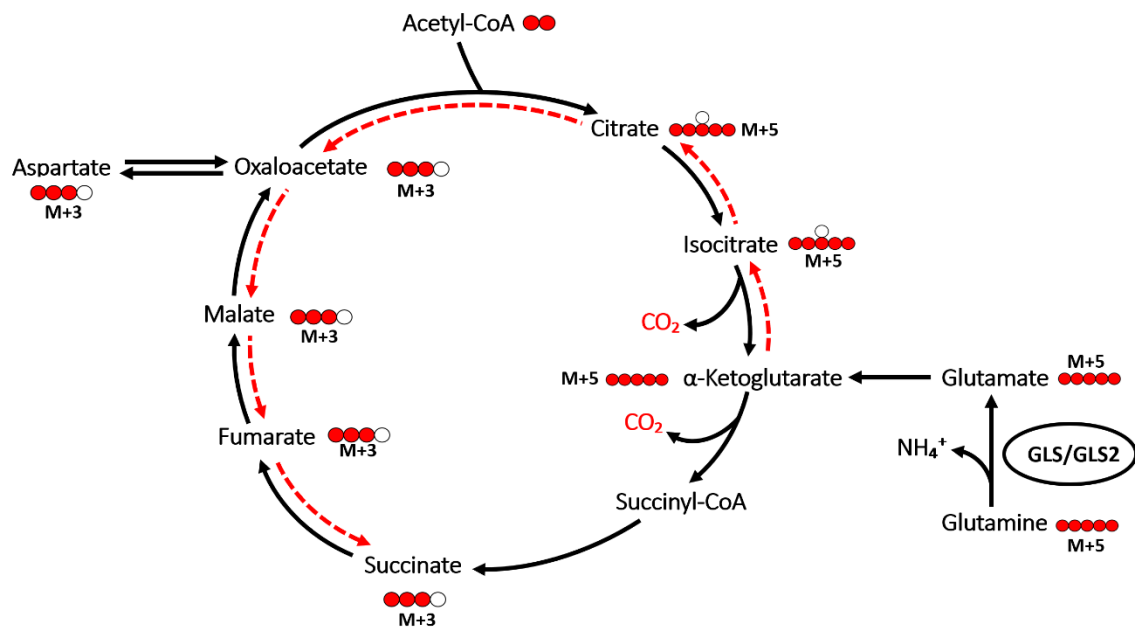


Figura 23. Esquema de herencia de carbonos marcados (rojo) simplificado por vía de carboxilación reductiva del α -KG derivado de Gln marcada. Este esquema no muestra todas las reacciones ni distingue entre los compartimentos celulares implicados. Figura tomada de De los Santos-Jiménez et al., 2023.

De esta forma, la sobreexpresión GLS2 causó igualmente un incremento en la marca m+3 de fumarato, malato y aspartato, que fue mayor en el modelo LN-GLS2(+) HI (Fig. 22, A). Este resultado era esperable por los mismos motivos que los argüidos en el caso del marcaje oxidativo: una mayor expresión GLS2 favorecerá una mayor generación de Glu a partir de glutamina, y por tanto, una mayor contribución de carbono desde Gln a α -KG, que podrá seguir tanto la vía oxidativa como la reductiva. No obstante, en el caso del citrato m+5 en LN-GLS2(+) HI, el aumento en el marcaje es proporcionalmente mucho mayor, casi triplicándose, pasando a estar la marca m+5 del 12% al 35% del citrato. En este caso, la expresión GLS2 causa que la marca m+5 pase a ser la preponderante para el citrato, en detrimento de la marca m+4, que en el control (LN-EV) es claramente muy superior (0,4 frente a 0,1 para citrato m+4 y citrato m+5, respectivamente). Este resultado sugiere que GLS2 podría estar de alguna forma favoreciendo la vía de carboxilación reductiva, al ocasionar ese cambio radical en la vía de generación de citrato desde Gln. El tratamiento con CB-839 originó una muy leve bajada en el marcaje reductivo de estos metabolitos (Fig. 22, B).

4.4. Análisis Metabolómico en Modelos con Sobreexpresión GLS2

Se realizaron estudios metabolómicos en los modelos con sobreexpresión GLS2, buscando obtener una visión global de los cambios metabólicos inducidos por la función de GLS2, comparando LN-GLS2(+) HI ó LN-GLS2(+) LO con el control LN-EV. Igualmente, se incluyó la condición de tratar a los modelos de sobreexpresión GLS2 con el inhibidor CB-839, de forma que la actividad GLS esté inhibida y la actividad glutaminasa preponderante en la célula pase a ser únicamente la actividad GLS2. La figura 24 muestra un *heatmap* donde se representan los 50 metabolitos con mayor cambio significativo de acuerdo con sus *VIP scores*, en la comparación de LN-GLS2(+) HI vs LN-EV. Los niveles de un total de 122 metabolitos relacionados con multitud de rutas metabólicas cambiaron de forma significativa en este modelo con respecto a su control, entre los que se incluyen aminoácidos, metabolitos intermediarios del ciclo TCA, glucólisis, ruta de las pentosas fosfato, nucleótidos y bases nitrogenadas, metabolitos metilados, etc.

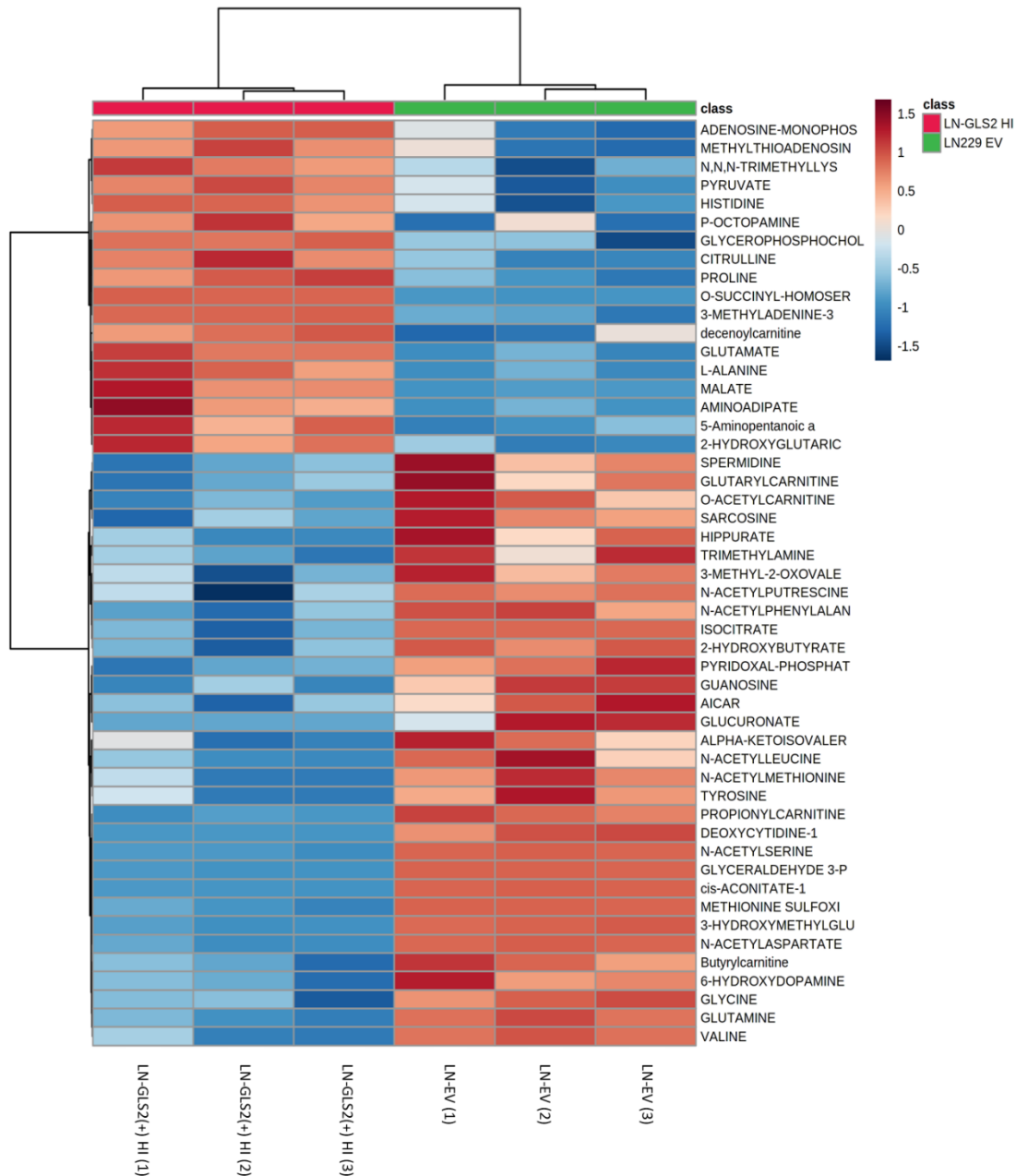


Figura 24. *Heatmap* donde se muestran los *VIP scores* obtenidos utilizando la herramienta web metaboanalyst para los 50 metabolitos con mayor cambio entre LN-GLS2(+)-HI y LN-EV.

Por otra parte, la figura 25 muestra igualmente un *heatmap* representando los 50 metabolitos con mayor cambio significativo con base en sus *VIP scores*, en la comparación de LN-GLS2(+)-HI tratado con CB-839 1 μ M por 24h vs LN-EV (no tratado). Esta condición experimental busca comparar los efectos de sustituir la actividad glutaminasa GLS por GLS2 en el experimental, mientras que el control LN-EV apenas posee expresión GLS2, pero si tiene una elevada expresión GLS, que se encuentra activa. En esta comparación, se obtuvo un cambio significativo en los niveles de 112 metabolitos.

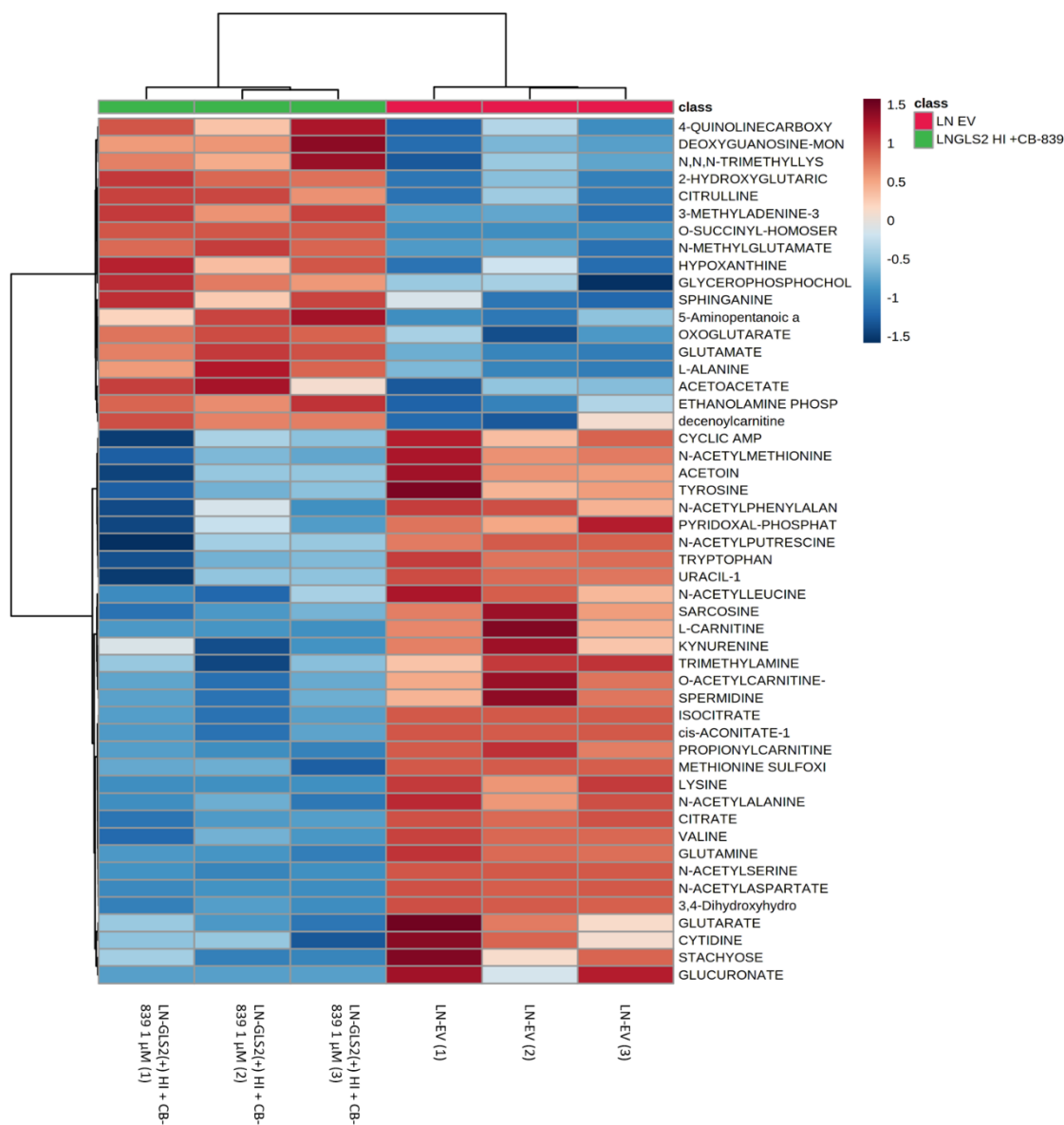


Figura 25. Heatmap donde se muestran los VIP scores obtenidos utilizando la herramienta web metaboanalyst para los 50 metabolitos con mayor cambio significativo entre LN-GLS2(+) HI tratada con CB-839 1 μM y LN-EV.

A continuación, se presentan una serie de figuras que agrupan algunos de los resultados de metabolómica más relevantes por rutas metabólicas o procesos relacionados, incluyendo también resultados de la comparación de LN-GLS2(+) LO vs LN-EV, para una más clara interpretación de estos.

4.4.1. Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos

Los resultados (figura 26) muestran que la expresión de GLS2 causó una disminución en los niveles de glutamina respecto al control tanto en LN-GLS2(+) HI como en LN-GLS2(+) LO, siendo mayor esta bajada en el primero. Igualmente, Glu, succinato y aspartato, aumentaron significativamente en ambos modelos, siendo cuantitativamente mayor el aumento en el modelo con mayor expresión de GLS2. Adicionalmente, el oxoglutarato (α -KG), fumarato y malato aumentaron significativamente también en el modelo LN-GLS2(+) HI (Fig. 26, A). Por último, ambos modelos de expresión GLS2 mostraron una bajada significativa de los metabolitos de 6 carbonos del ciclo TCA: citrato, cis-aconitato e isocitrato, que fue mayor en el modelo con mayores niveles de GLS2.

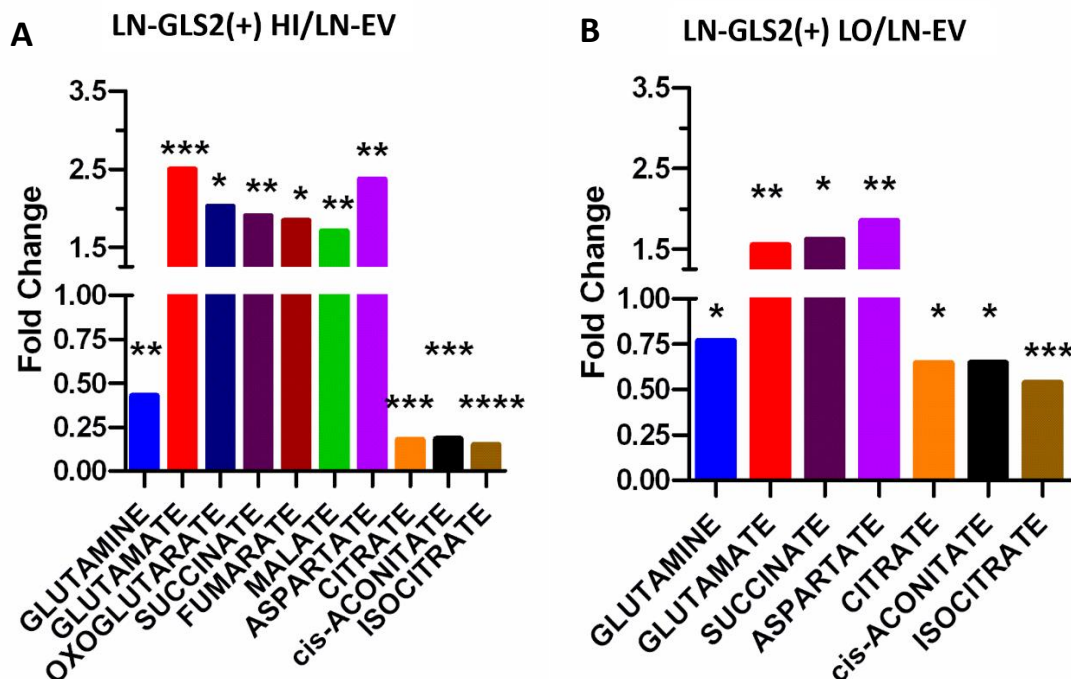


Figura 26. Se muestran las veces de cambio (*Fold Change*, FC) para metabolitos del ciclo TCA y relacionados, en la comparación del modelo LN-GLS2(+) HI vs LN-EV (A) o LN-GLS2(+) LO vs LN-EV (B). Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: *: p-value < 0,05; **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001; ****: p-value < 0,0001.

Los resultados obtenidos para los niveles de intermediarios del ciclo TCA y metabolitos relacionados entre los dos modelos de sobreexpresión son congruentes entre sí, observándose un efecto de dosis-respuesta en cuanto al nivel de expresión GLS2 entre los dos modelos (Fig. 26, A y B). De ese modo, los niveles de Gln disminuyen más cuanto mayor es la expresión de GLS2, y consecuentemente los de Glu aumentan más con mayor expresión GLS2. Este resultado es esperable ya que estos modelos presentan mayor actividad GA y por tanto más

Gln está siendo transformada en Glu por unidad de tiempo. Igualmente, el α -KG (oxoglutarato) derivado de Glu está aumentado, así como los metabolitos del ciclo TCA corriente abajo del α -KG en las subsecuentes reacciones de oxidación del ciclo: succinato, fumarato, malato o aspartato, que puede formarse por transaminación desde oxalacetato, generado este último desde malato por la enzima malato deshidrogenasa. Sin embargo, los resultados mostraron una depleción inesperada de los intermediarios de 6 átomos de carbono del ciclo TCA: citrato, aconitato e isocitrato, cuyos niveles eran más bajos en el modelo con mayor expresión de GLS2. Cuando se trató con CB-839 a los modelos de sobreexpresión (figura 27), se observó que apenas se modificaban los niveles de los metabolitos en LN-GLS2(+) HI respecto al control (Fig. 27, A), pero sí que variaban significativamente al tratar con CB-839 al modelo LN-GLS2(+) LO (Fig. 27, B), de forma que dejaba de haber diferencias significativas, retornando a los niveles del control, para Gln, Glu, succinato, fumarato y aspartato. No obstante, los niveles de citrato, aconitato e isocitrato no se ven afectados por la adición de CB-839, tanto en LN-GLS2(+) HI como en LN-GLS2(+) LO, siendo la bajada en estos respecto al control similar a la observada en estos modelos sin tratar (Fig. 26).

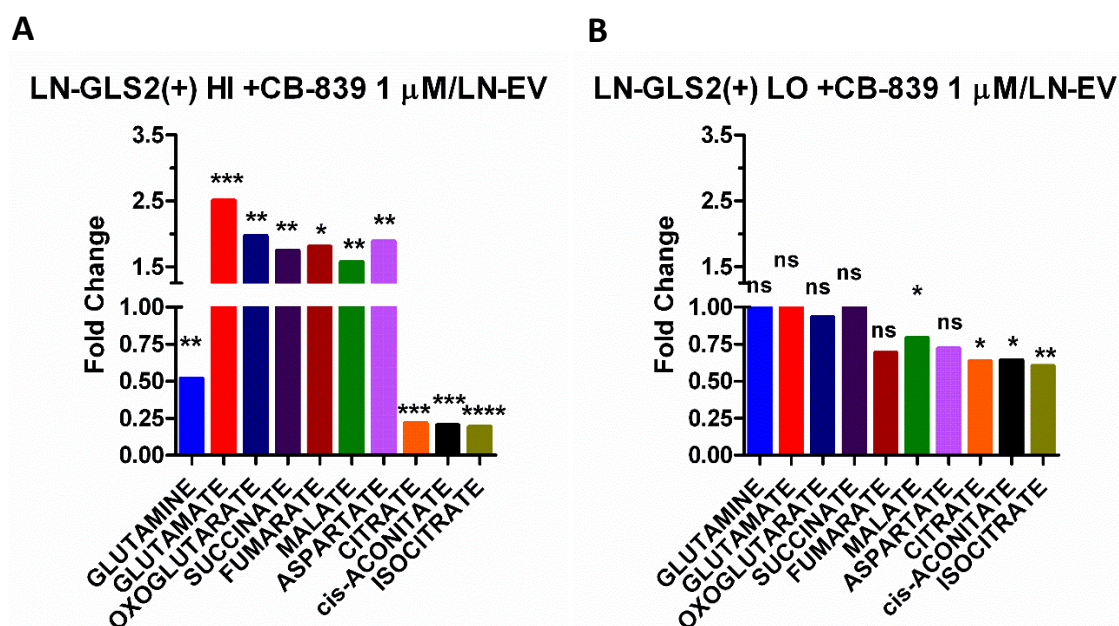


Figura 27. Se muestran las veces de cambio (FC) para metabolitos del ciclo TCA y relacionados, en la comparación del modelo LN-GLS2(+) HI +CB-839 1 μ M vs LN-EV (A) o LN-GLS2(+) LO +CB-839 1 μ M vs LN-EV (B). Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: *: p-value < 0,05; **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001; ****: p-value < 0,0001; ns: no significativo.

Todos estos datos tomados en su conjunto indican que GLS2 induce en estos modelos una depleción de los intermediarios de 6 carbonos del ciclo TCA, comportándose los niveles de

estos de forma opuesta a como lo hacen el resto de los metabolitos del ciclo, que se encuentran aumentados como cabría esperar. Además, este efecto de GLS2 es dominante sobre GLS, ya que GLS sigue activa (Fig. 26) y aun así los niveles de estos metabolitos bajan alrededor de un 80% en el modelo LN-GLS2(+) HI (Fig. 26, A), y ese cambio en sus niveles no se ve afectado por la inhibición de GLS mediante CB-839 en ninguno de los modelos (Fig. 27). Estos hallazgos metabolómicos, junto con los resultados de trazado isotópico previamente presentados en el subapartado 4.3., parecen apuntar en su conjunto a que la expresión de GLS2 induce un bloqueo en el punto del ciclo en que el oxalacetato se condensa con el acetyl-CoA para producir citrato, denotado por los bajos niveles de citrato y metabolitos derivados corriente abajo del mismo, y por la bajada en la marca oxidativa, m+4, en el citrato cuando se expresa GLS2. De hecho, en un primer momento los resultados de trazado isotópico, especialmente los de LN-GLS2(+) HI, parecían sugerir que GLS2 podría inducir de algún modo una reversión del metabolismo del ciclo TCA desde la vía oxidativa preponderante en condiciones normales hacia la de carboxilación reductiva, denotado por la bajada en citrato m+4 y la gran subida en citrato m+5. No obstante, la integración de los resultados de trazado isotópico con U-¹³C-Gln y los de metabolómica sugieren otra interpretación: GLS2 parece bloquear de algún modo la síntesis de citrato en el sentido oxidativo del ciclo, lo que explica tanto la bajada (80%) en los niveles de citrato (Fig. 26, A), como la bajada en la fracción del isotópico citrato m+4 (Fig. 20, A). De acuerdo con esta hipótesis, el incremento en la fracción de citrato m+5 (Fig. 22, A) podría explicarse considerando que los niveles globales de citrato son mucho más bajos en la célula en LN-GLS2(+) HI, de forma que, si el flujo de generación de citrato por vía reductiva no está siendo afectado, la proporción de citrato reductivo, esto es, con marca m+5, aumentará. En este escenario, probablemente la cantidad total de citrato m+5 sería similar entre LN-GLS2(+) HI y el control LN-EV. Sin embargo, la proporción de citrato m+5 sobre el total de citrato en la célula sería significativamente más alta en el modelo de sobreexpresión debido a que el nivel total de citrato es mucho más bajo, dado el bloqueo de su síntesis por vía oxidativa.

Los resultados de metabolómica en LN-GLS2(+) HI muestran que el resto de los metabolitos del ciclo (α -KG, succinato, fumarato, malato), así como el aspartato se acumulan. El oxalacetato es difícilmente detectable por espectrometría de masas, de ahí que no haya podido analizarse, pero si se poseen datos sobre los niveles de malato, inmediatamente corriente arriba en el ciclo TCA, y aspartato, generado por transaminación desde oxalacetato, por lo que con gran probabilidad los niveles de oxalacetato estén también aumentados. Los resultados sugieren por tanto que el paso que estaría inhibido por la expresión de GLS2 sería el de síntesis de citrato a partir de oxalacetato y acetyl-CoA. Una posible hipótesis para explicar este resultado es que la generación de acetyl-CoA en la mitocondria podría estar viéndose comprometida y resultando limitante para esta reacción, la catalizada por la enzima citrato sintasa. En las condiciones de cultivo experimentales, casi todo el acetyl-CoA mitocondrial procede del metabolismo glucolítico, ya que en las condiciones de cultivo la glucosa y la glutamina son los

principales nutrientes suministrados a la célula, por lo que cabría pensar que la reacción afectada por GLS2 podría ser la catalizada por la enzima PDH, que genera acetil-CoA en la mitocondria a partir de piruvato glucolítico: la inhibición de la enzima PDH originaría menores niveles de acetil-CoA en la mitocondria que limitarían la síntesis de citrato, y a su vez, de aconitato e isocitrato, mientras que el resto de metabolitos del ciclo no se verían afectados ya que el metabolismo de la Gln puede alimentar al ciclo TCA en otro punto de entrada, mediante la generación de α -KG. De hecho, los resultados de metabolómica apuntan en esta dirección también por otros motivos. La figura 28 muestra una acumulación de piruvato en el modelo LN-GLS2(+) HI respecto al control, así como de alanina, aminoácido que es generado por transaminación desde piruvato con la participación de Glu. La acumulación de piruvato es congruente con una hipotética inhibición de la actividad PDH. Adicionalmente, los niveles de acetil-CoA no pudieron cuantificarse por limitaciones técnicas de los experimentos de metabolómica realizados, sin embargo, sí pudieron cuantificarse los niveles de acetil-carnitina (Fig. 28).

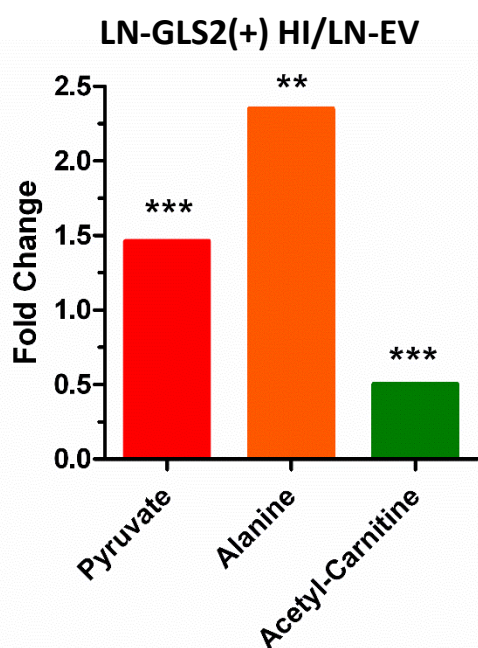


Figura 28. Niveles de piruvato, alanina y acetil-carnitina en el modelo LN-GLS2(+) HI, expresados como el FC entre LN-GLS2(+) HI y LN-EV. Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001.

Las carnitinas son parte fundamental de un sistema de lanzadera que permite la translocación a través de los sistemas de membrana (y por tanto, entre compartimentos celulares) de restos acilo, entre ellos, el acetilo. En condiciones fisiológicas normales, el sistema de carnitinas es esencial en el metabolismo lipídico, y en cáncer se ha considerado como un sistema de esencial

importancia para favorecer la plasticidad del metabolismo tumoral. El acetil-CoA no puede atravesar libremente la membrana mitocondrial, sino que para ello puede reaccionar con la carnitina libre en la reacción catalizada por la enzima carnitina acetiltransferasa, que transfiere el resto acetilo para dar acetil-carnitina y HS-CoA libre. De hecho, este mecanismo es fundamental en determinadas situaciones como cuando el flujo metabólico por el ciclo TCA está comprometido y el acetil-CoA se acumula en la mitocondria secuestrando la CoA e impidiendo que participe en otras reacciones para las que es necesaria. En esa situación, la transferencia del acetilo a la carnitina permite liberar a la CoA mitocondrial para otras reacciones metabólicas (Melone et al., 2018; Pietrocola et al., 2015). Igualmente, esta función tiene relevancia en las reacciones de acetilación de proteínas, entre ellas, la acetilación de histonas, ya que la acetil carnitina permite exportar el acetilo generado en la mitocondria a partir de piruvato al citosol y posteriormente al núcleo para allí regenerar el acetil-CoA, que sirve como donador de grupos acetilo en estas modificaciones epigenéticas catalizadas por las HAT (Madiraju et al., 2009). De ese modo, y dado que existe ese equilibrio entre acil-CoA y acil-carnitina, los niveles de acetil carnitina podrían funcionar como indicadores de los niveles de acetil-CoA. Así, los niveles de acetilcarnitina son significativamente más bajos (50%) en el modelo LN-GLS2(+) HI, apoyando igualmente los hipotéticos bajos niveles de acetil-CoA en la mitocondria.

Por otra parte, muchos de los los aminoácidos acetilados en su grupo amino (N-acetil-aminoácidos) proceden de proteínas que han sido acetiladas en el extremo amino terminal y posteriormente se han degradado, liberando esos aminoácidos (Ree et al., 2018). Otros son generados activamente en su forma de aminoácido libre en reacciones de acetilación, como el N-acetil aspartato, de gran importancia en cerebro. En cualquier caso, el donador del acetilo es siempre el acetil-CoA. En LN-GLS2(+) HI y LN-GLS2(+) LO, los niveles de diversos N-acetil aminoácidos son significativamente más bajos (Fig. 29).

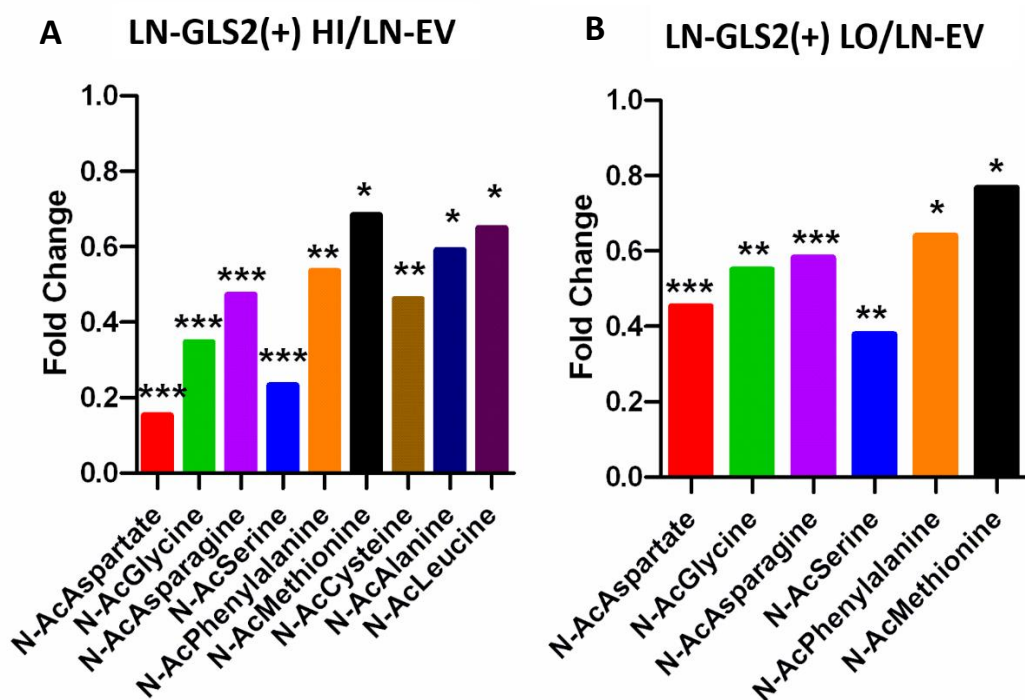


Figura 29. FC para los niveles de diversos N-acetil-aminoácidos, en la comparación del modelo LN-GLS2(+) HI vs LN-EV (A) y LN-GLS2(+) LO vs LN-EV (B). Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: *: p-value < 0,05; **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001.

Como ejemplo, entre otros muchos, los niveles de N-acetil aspartato son mucho más bajos en los modelos de expresión GLS2, aun cuando los niveles de aspartato (Fig. 26) en estos modelos son más altos que en el control; otro ejemplo es la N-acetil metionina, significativamente más baja (Fig. 29) aun cuando los niveles de metionina libre son más altos en LN-GLS2(+) HI (FC = 1,23, no mostrados). El mismo patrón se tiene en LN-GLS2(+) LO, siendo menores las diferencias, que de nuevo correlacionan con el nivel de expresión GLS2 entre los dos modelos. Estos resultados podrían indicar que los niveles de acetil-CoA estarían siendo limitantes en estas reacciones de acetilación. Este resultado apoya también, aunque de forma indirecta, la hipótesis de una menor tasa de generación de acetil-CoA inducida por GLS2. Igualmente, y como antes se mencionaba, esta hipotética bajada en los niveles de acetil-CoA cuando GLS2 se expresa podría estar también afectando a la regulación epigenética, potencialmente impactando la tasa de acetilación de histonas en el núcleo por limitación del sustrato donador del grupo acetilo, acetil-CoA. De hecho, el citrato citosólico es una importante fuente de acetil-CoA extramitocondrial, producido por la reacción catalizada por ACLY. Este acetil-CoA puede

ser igualmente importado al núcleo para participar en reacciones de acetilación. Por tanto, el cambio metabólico inducido por la expresión de GLS2 podría influenciar la regulación epigenética de forma indirecta por este mecanismo.

4.4.2. GLS2 y el Metabolismo de los Nucleótidos

La expresión de GLS2 influyó igualmente los niveles de diversos nucleótidos. Los resultados de metabolómica mostraron cambios significativos en los niveles de adenosina monofosfato (AMP), guanosina monofosfato (GMP) y uridina monofosfato (UMP), que se ilustran en la figura 30. El modelo LN-GLS2(+) HI muestra una acumulación de AMP respecto al control, mientras que los niveles de GMP y UMP son más bajos (Fig. 30, A). El tratamiento de este modelo con CB-839 indujo una bajada cuantitativa del nivel de AMP con respecto al modelo sin tratar, pero seguía acumulándose respecto al control (Fig. 30, B), mientras que produjo que los niveles de GMP y UMP sufrieran una bajada cuantitativa adicional. Por otra parte, el modelo LN-GLS2(+) LO mostraba igualmente una acumulación significativa de AMP (Fig. 30, C), menor que la del modelo LN-GLS2(+) HI, nuevamente correlacionando con el nivel de expresión GLS2 de cada modelo. En LN-GLS2(+) LO no se tuvieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de GMP y UMP, aunque cuantitativamente los niveles de estos sugieren una tendencia a la baja. Cuando LN-GLS2(+) LO se trató con CB-839 (Fig. 30, D), la acumulación de AMP respecto al control se redujo levemente, mientras que se observó una bajada significativa en los niveles de GMP y UMP.

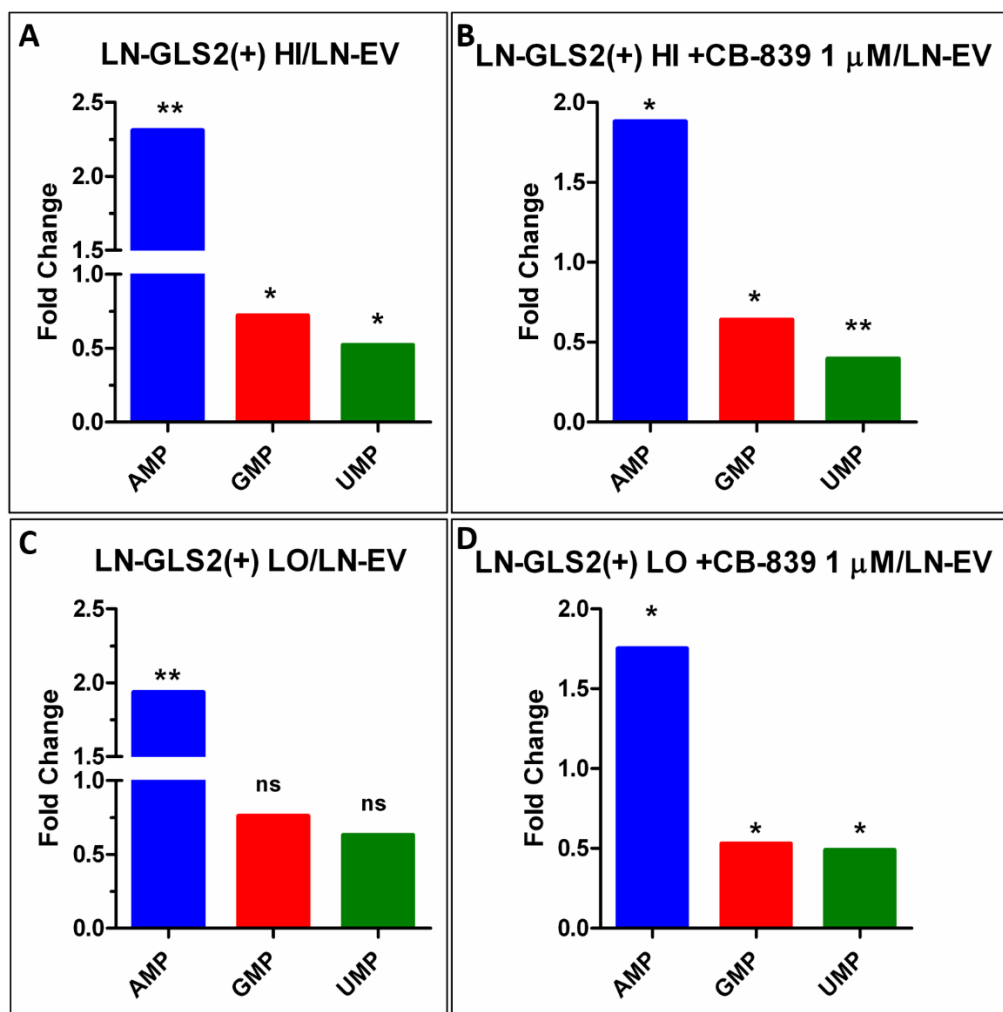


Figura 30. Cambios en los niveles de adenosina monofosfato (AMP), guanosina monofosfato (GMP) y uridina monofosfato (UMP) expresado como las veces de cambio (FC) respecto al control (LN-EV) en el modelo LN-GLS2(+) HI (A), LN-GLS2(+) HI +CB-839 1 μ M (B), LN-GLS2(+) LO (C) y LN-GLS2(+) LO +CB-839 1 μ M (D). Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: *: p-value < 0,05; **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001; ****: p-value < 0,0001; ns: no significativo.

Por tanto, en todas las condiciones experimentales la expresión de GLS2 indujo un aumento considerable de los niveles de AMP. Este incremento puede explicarse porque GLS2 esté favoreciendo la tasa de biosíntesis *de novo* de AMP al causar unos mayores niveles de aspartato (Fig. 22), que es esencial en la ruta de biosíntesis de purinas. El aspartato es necesario como sustrato en varias reacciones diferentes de la ruta de síntesis de purinas, por lo que es lógico pensar que mayores niveles de aspartato favorezcan una mayor tasa de síntesis de los productos finales de la ruta. Sin embargo, el otro metabolito final de esta ruta de biosíntesis, GMP, muestra niveles más bajos. Este hecho diferencial podría explicarse considerando que la inosina monofosfato (IMP), un nucleótido intermediario de esta ruta de

biosíntesis, actúa como sustrato de dos reacciones diferentes que bifurcan la ruta hacia la síntesis de los dos productos finales antes mencionados, AMP y GMP. La IMP puede aceptar aspartato para sintetizar adenilosuccinato, que a su vez podrá servir para sintetizar AMP. Por otra parte, la IMP puede servir para sintetizar xantosina monofosfato (XMP), y esta a su vez aceptar el grupo amido de la Gln para dar GMP. La síntesis de GMP desde IMP no requiere aspartato, sino Gln, entre otras cosas. Puede hipotetizarse que la IMP esté siendo dirigida preferencialmente en esta situación hacia la síntesis de AMP en detrimento de GMP, ya que el aspartato, necesario para sintetizar AMP está en exceso, mientras que la Gln, necesaria para sintetizar GMP, se encuentra más baja en la célula cuando GLS2 se sobreexpresa. Esta hipotética explicación consideraría que el efecto de GLS2 sobre los niveles de AMP y GMP es meramente debido a que en los modelos de expresión GLS2 se incrementa la actividad GA global de la célula, no siendo considerada una actividad específica de isoenzima. Esta interpretación está apoyada por el resultado obtenido cuando se trata con CB-839 (Fig. 30, B y D), que causa que el aumento en los niveles de AMP sea menor que sin la adición de CB-839, y que se tenga una mayor bajada en GMP. Esto, igualmente, podría explicarse porque la inhibición de GLS por CB-839 causaría una disminución de la actividad GA total de la célula y con ello supone una menor acumulación de aspartato en el modelo LN-GLS2(+) HI (Fig. 27, A) o restaura los niveles de aspartato y de glutamina a los del control, en el caso del modelo LN-GLS2(+) LO +CB-839 (Fig. 27, B). Sin embargo, en este último caso los niveles de AMP siguen siendo claramente más altos, y los de GMP más bajos que los del control (Fig. 30, D), aun cuando en esta condición experimental no se observan cambios significativos en los niveles de Gln ni de aspartato (Fig. 27, B). Este hecho sugiere que el cambio en los niveles de estos nucleótidos de purina pueda no ser debido únicamente a cambios en su tasa de biosíntesis, sino que pueden estar influidos también por otras causas. Una hipótesis alterativa y compatible con la anterior, es que la expresión de GLS2 esté afectando negativamente al metabolismo bioenergético. De hecho, los resultados antes presentados en el subapartado 4.4.1., sugieren que GLS2 afectaría al ciclo TCA causando un ciclo incompleto por la depleción de citrato, aconitato e isocitrato, lo que podría impactar sobre la OXPHOS y, por tanto, biosíntesis de ATP. Consecuentemente, podría especularse que parte del AMP que se acumula en los modelos de expresión GLS2 sea consecuencia de un desequilibrio en las tasas de síntesis e hidrólisis de ATP, lo que aumentaría los niveles de AMP en detrimento de los de ATP (no analizados).

Por otra parte, la bajada en los niveles de UMP, un nucleótido intermediario de la ruta de biosíntesis de pirimidinas, en LN-GLS2(+) HI fue sorprendente considerando que el aspartato se encuentra en exceso en estas condiciones, siendo necesario como sustrato en la reacción inicial de la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas, catalizada por CAD. Sin embargo, los niveles de Gln intracelulares son más bajos en este modelo, y la Gln es igualmente sustrato de CAD y por tanto necesaria en la síntesis de pirimidinas al proveer el grupo amido. Por otra parte, la reacción de CAD requiere de ATP. Si hipotéticamente este modelo presentase menores niveles

de ATP por los motivos antes expuestos, esto supondría también una limitación en esta ruta de biosíntesis (Pavlova y Thompson, 2016). En cualquier caso, los resultados concernientes a GMP y UMP en los modelos de sobreexpresión GLS2 resultan interesantes considerando que tanto un aumento en la expresión de GLS2, como una inhibición de la actividad GLS por CB-839, favorecen una bajada de los niveles de estos metabolitos respecto al control, lo que podría implicar que GLS y GLS2 llevan a cabo funciones opuestas al respecto. De hecho, en el caso del modelo LN-GLS2(+) LO, los niveles de expresión GLS2 por si solos no son suficientes como para causar una bajada estadísticamente significativa en los niveles de GMP y UMP, pero la combinación de la expresión GLS2 de este modelo y la inhibición de GLS por CB-839 si lo consiguen.

4.4.3. GLS2 y Metabolitos Metilados

Ambos modelos de expresión GLS2 mostraron una acumulación en los metabolitos metilados 3-metiladenina (3MA) y N,N,N-trimetil lisina (3meLys) con respecto al control, que fue mayor en el modelo LN-GLS2(+) HI. Además, el tratamiento de estos modelos con CB-839 incrementó muy notablemente la acumulación de ambos metabolitos metilados (Figura 31). Por otra parte, los niveles del metabolito S-adenosil metionina (SAM) aparecen significativamente incrementados respecto al control en el modelo LN-GLS2(+) HI, mientras que la adición de CB-839 no altera estas diferencias (Figura 32).

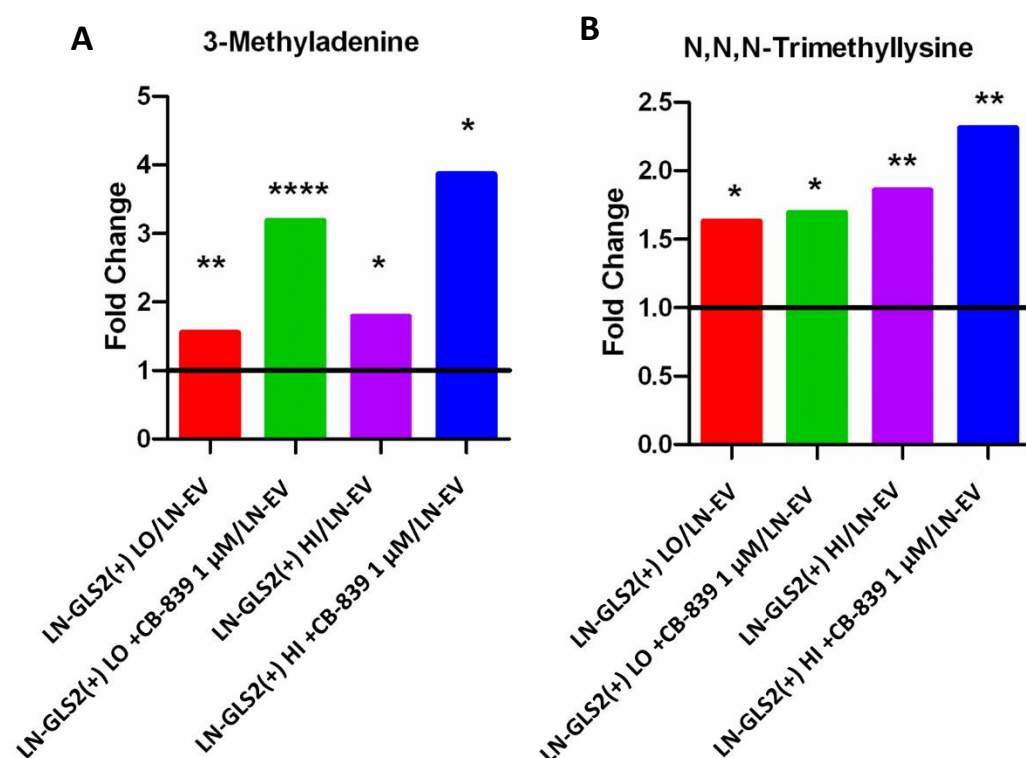


Figura 31. Veces de cambio (FC) en los metabolitos metilados 3-metil-adenina (A) y N,N,N-trimetil-lisina (B) para LN-GLS2(+) LO, LN-GLS2(+) LO +CB-839 1 μ M, LN-GLS2(+) HI y LN-GLS2(+) HI +CB-839 1 μ M. Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: *: p-value < 0,05; **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001; ****: p-value < 0,0001.

Los metabolitos metilados 3MA y 3meLys pueden reflejar, respectivamente, un incremento en los niveles de metilación globales de ácidos nucleicos y proteínas, incluyendo histonas, ya que la metilación de estos sustratos puede producirse en estas macromoléculas y ser liberados tras su degradación.

Generalmente, se considera que la 3MA aparece como resultado de errores en reacciones de metilación del ADN o incluso espontáneamente. En cualquier caso, esta modificación es considerada como un daño inespecífico al ADN que puede inducir la acción de enzimas de reparación como son las alquil-ADN glicosilasas (alkyl-DNA glycosylases o también llamadas 3-methyladenine DNA glycosylases). Estas enzimas reconocen estas modificaciones y llevan a cabo su acción por medio del mecanismo de reparación por escisión de base (*base excision repair*), liberando en este caso 3-metiladenina (Wyatt et al., 1999).

Múltiples residuos de lisina presentes en las histonas son dianas de metilación en su cadena lateral, reacciones llevadas a cabo por las enzimas lisina metil transferasas (KMTs) que tienen un importante papel en la regulación epigenética al modificar las propiedades químicas de las histonas, lo que en la mayoría de los casos promueve el estado heterocromático y por tanto la represión transcripcional. De hecho, la liberación de 3meLys por degradación proteolítica de histonas es considerada la principal fuente de este metabolito libre (Maas et al., 2020).

Los resultados muestran que tanto la expresión de GLS2 como la inhibición de GLS por CB-839 promueven el incremento de 3MA y 3meLys, sugiriendo de nuevo funciones diferenciales de las isoenzimas GA al respecto de los niveles de estos metabolitos metilados. Sorprendentemente, el modelo LN-GLS2(+) HI mostró un incremento en los niveles de SAM, que funciona como un metabolito donador de metilos en multitud de reacciones de metilación de diversos sustratos, incluyendo de proteínas y ácidos nucleicos. El aumento de los niveles de SAM no se modificó al inhibir GLS, sino que parecía depender únicamente de la expresión de GLS2.

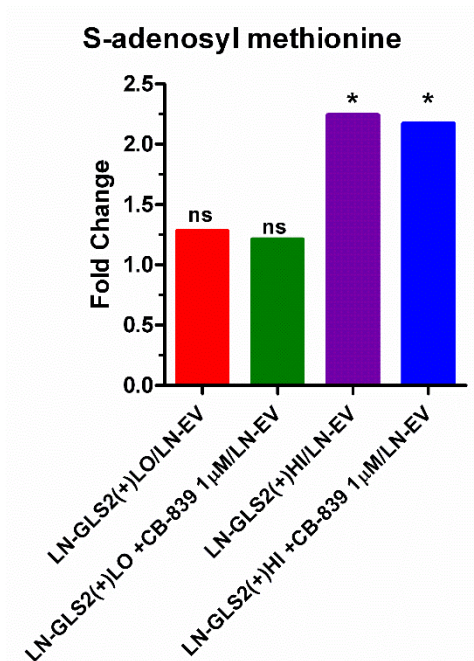


Figura 32. Cambio en los niveles del metabolito donador de metilos S-adenosil-metionina (SAM) en LN-GLS2(+) LO, LN-GLS2(+) LO +CB-839 1 μ M, LN-GLS2(+) HI y LN-GLS2(+) HI +CB-839 1 μ M. Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con una comparación mediante t de Student, como sigue: *: p-value < 0,05; **: p-value < 0,01; ***: p-value < 0,001; ****: p-value < 0,0001; ns: no significativo.

No está claro cómo GLS2 podría inducir un incremento en los niveles de SAM, pero la mayor disponibilidad de este sustrato en las reacciones de metilación podría explicar, al menos parcialmente, el incremento en los niveles de estos metabolitos metilados, que a su vez pueden ser indicativos de mayores tasas de metilación de histonas y ADN. No obstante, el tratamiento con CB-839 indujo una acumulación aún mayor de 3MA y 3meLys, y como se ha comentado ya, los resultados muestran que CB-839 no modificó significativamente los niveles de SAM, por lo que cabe pensar que este efecto sea ocasionado por un mecanismo independiente. Resultados mostrados previamente en esta tesis y ya publicados en Santos-Jiménez et al., 2023, mostraron que el tratamiento con CB-839 de las líneas de glioma LN229, T98G y U87MG inducían igualmente la acumulación de 3MA, 3meLys y, en el caso de T98G, también una gran acumulación de 5-metil citosina. No obstante, en este caso, la hipótesis más plausible que se encontró fue que CB-839 causaba un desequilibrio en los niveles relativos de α -KG y succinato, lo que podría incidir en la actividad de las demetilinas dependientes de α -KG, inhibiendo su función. En ese caso, se comprobó que las tres líneas celulares tratadas con CB-839 mostraban un cambio significativo en la ratio α -KG/succinato, y la reducción de esa relación correlacionaba con mayores niveles de metabolitos metilados. Sin embargo, los resultados de metabolómica obtenidos para los modelos de expresión GLS2 no

muestran ese desequilibrio en los niveles de α -KG y succinato en ningún caso, tampoco cuando se añadía CB-839. Por tanto, debe existir otro mecanismo por el cual la inhibición de GLS origine el incremento de 3MA y 3meLys.

Por otra parte, la 3MA es conocido por ser un agente inhibidor de la autofagia, que consigue este efecto actuando mediante la inhibición de PI3K (Wu et al., 2010). El aumento de los niveles de 3MA en los modelos de expresión GLS2 es particularmente interesante considerando que en los últimos años se ha reportado en modelos de HCC y de GBM que GLS2 tiene un papel de regulación negativa sobre la ruta de PI3K/AKT, que se ha relacionado con la función supresora tumoral de GLS2 y que correlacionaba con una menor capacidad proliferativa y sensibilidad frente a estrés oxidativo (Liu et al., 2014; Majewska et al., 2019). Aunque se necesita de una más profunda investigación, y una mayor confirmación de que el incremento observado en los niveles de 3MA inducidos por GLS2 es relevante de cara a sus funciones inhibitorias sobre PI3K, estos resultados sugieren un posible mecanismo por el cual GLS2 induce una menor activación de la ruta de PI3K/AKT y, en determinados contextos, ejerce efectos antitumorales.

4.5. Ensayo de Actividad Piruvato Deshidrogenasa (PDH)

Con base en los resultados de metabolómica presentados en el subapartado 4.4.1., y la hipótesis descrita en el mismo, se buscó cuantificar la actividad enzimática piruvato deshidrogenasa (PDH) en el modelo de sobreexpresión GLS2, LN-GLS2(+) HI. La figura 33 muestra los resultados de actividad PDH en el control LN-EV y el modelo LN-GLS2(+) HI, expresados como miliunidades de densidad óptica a 450 nm por minuto y miligramo de proteína total. Los resultados muestran una disminución significativa de la actividad PDH en el modelo LN-GLS2(+) HI del 53,2%.

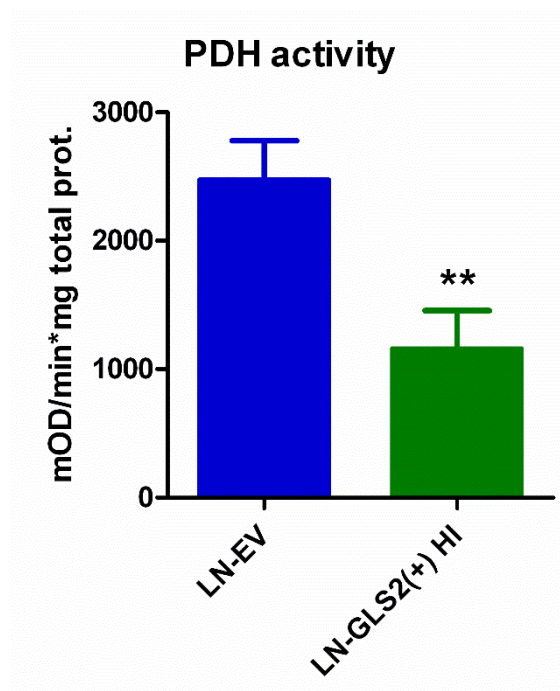


Figura 33. Actividad piruvato deshidrogenasa (PDH) en el modelo LN-EV (control) y LN-GLS2(+) HI, expresado como el cambio en miliunidades de densidad óptica a 450 nm por minuto y miligramo de proteína total. Los asteriscos indican la significancia estadística obtenida mediante t de Student: **: p-value < 0,01. Se realizaron cuatro experimentos independientes, con dos réplicas técnicas por condición.

Los resultados de actividad PDH muestran que la expresión de GLS2 induce una bajada significativa en la actividad enzimática de PDH de más del 50% con respecto a su control. Este resultado explica la bajada en los niveles de citrato, aconitato e isocitrato, encontrada en los modelos de expresión GLS2 y confirma la hipótesis propuesta a ese respecto en el apartado 4.4.1. de esta tesis: GLS2 minimiza la actividad PDH, con las consecuencias metabólicas que eso conlleva. Esta nueva actividad de GLS2, descrita por primera vez, puede encontrarse relacionada con el papel de GLS2 como un supresor tumoral contexto-dependiente.

Se necesita mayor investigación al respecto de los mecanismos implicados en este efecto de GLS2 sobre la actividad PDH, que puede ser más o menos directo. PDH constituye un complejo enzimático altamente regulado por multitud de elementos moleculares. A ese respecto, la menor actividad PDH inducida por GLS2 podría ser consecuencia de una menor expresión de alguna o algunas de las subunidades conformantes del complejo enzimático, o de cambios en la expresión o actividad de las enzimas piruvato deshidrogenasa quinasas (PDKs). Se conocen cuatro isoenzimas humanas (PDK1-4) que fosforilan a PDH en diferentes residuos, como son la Ser232, la Ser293 y la Ser300, de la subunidad PDHE1 α , lo que resulta en la inhibición de la actividad del complejo enzimático. Adicionalmente, la Y301 de PDHE1 α constituye otra diana

de fosforilación, la cual inhibe la actividad al bloquear la unión del piruvato. Por otra parte, otro posible mecanismo serían los cambios en los niveles de expresión o de actividad de las enzimas piruvato deshidrogenasa fosfatasas (PDPs), de las que en humanos se conocen dos isoenzimas (PDP1,2) que desfosforilan a PDH en los residuos antes mencionados favoreciendo con ello su actividad (Patel et al., 2006; Saunier et al., 2016); o bien, la actividad PDH podría encontrarse modulada por alguno de los productos del metabolismo de la Gln corriente abajo de la reacción catalizada por GLS2.

Clásicamente, la inhibición de la actividad PDH ha sido considerado un rasgo prooncogénico, dada la consideración de que la célula cancerosa favorece la glucólisis aerobia y generación de lactato (efecto Warburg) en detrimento del metabolismo mitocondrial. PDH es un nodo metabólico clave en la conexión de la glucólisis y el ciclo TCA y la OXPHOS, y su inhibición favorece el fenotipo del efecto Warburg. No obstante, es ampliamente conocido actualmente la necesidad del metabolismo mitocondrial de la mayoría de los tumores y células tumorales, como previamente se describe en la introducción de esta tesis, por lo que anticipar el efecto protumorigénico o antitumoral de la modulación de la actividad PDH no es una tarea sencilla. Por todo ello, no es descartable que, en determinados contextos moleculares, como el de los modelos de estudio aquí utilizados, la acción de GLS2 sobre la actividad de PDH pueda tener efectos antitumorales, pudiendo estar también relacionado con la menor capacidad proliferativa de estos modelos al expresar GLS2.

Igualmente, es necesaria una mayor investigación sobre la relación entre GLS2 y PDH en otros contextos tumorales y, sobre todo, en condiciones fisiológicas normales. La expresión de GLS2 está restringida a determinados tejidos u órganos, y fue descrita por primera vez en hígado. Dado que el hígado constituye un órgano gluconeogénico, es tentador especular que una función de modulación de GLS2 sobre la actividad PDH pueda estar relacionada con sus funciones homeostáticas en un contexto fisiológico normal, y que esta actividad de GLS2 pueda formar parte de un programa metabólico enfocado en favorecer la síntesis de glucosa en situaciones que lo requieran. Esta hipótesis, aunque especulativa, consideraría que GLS2 favorecería en este contexto el flujo glutaminolítico mientras minimiza la actividad PDH, consiguiendo direccionar el metabolismo de la Gln hacia la generación de oxalacetato, el cual constituye un sustrato gluconeogénico al ser sustrato de enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) que puede generar por esta reacción el intermediario glucolítico fosfoenolpiruvato (Chung et al., 2015). De esta forma, GLS2 actuaría previniendo que el oxalacetato y el piruvato sean dirigidos hacia el ciclo TCA al minimizar la actividad PDH, y por tanto, la direccionalidad neta de este “modo” metabólico sería la de dirigir los catabolitos de la Gln hacia la biosíntesis de glucosa.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusiones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusiones:

En relación con el objetivo 1:

- Tanto GLS como GLS2 están relacionadas con la expresión de varios miRNAs en células de glioblastoma, de forma que su función está indirectamente relacionada con la regulación ejercida por estos.
- La función de GLS y GLS2 maximiza la defensa antioxidante celular, principalmente favoreciendo la síntesis de GSH. GLS2 minimiza el daño oxidativo a lípidos y proteínas, y favorece la actividad GR.
- Los mecanismos por los cuáles GLS y GLS2 afectan tanto a miRNAs como a algunos de los elementos antioxidantes se desconocen, pero algunos de estos elementos varían de forma opuesta entre GLS y GLS2, denotando diferencias en la función de las isoenzimas sobre estos parámetros.

En relación con el objetivo 2:

- La vía glutaminolítica es una ruta metabólica de importancia principal en las células de glioblastoma analizadas, y la inhibición de las glutaminasas repercute sobre múltiples vías metabólicas y procesos celulares.
- La inhibición farmacológica de GLS por CB-839 minimiza la anaplerosis de forma variable en células de glioblastoma, afectando tanto a la vía oxidativa del ciclo TCA como a la de carboxilación reductiva.
- CB-839 induce un desequilibrio en los niveles de succinato respecto al resto de metabolitos del ciclo TCA, con potenciales repercusiones en regulación epigenética. De hecho, CB-839 favorece la acumulación de metabolitos metilados, indicando potencialmente un mayor grado de metilación en ADN y proteínas. Igualmente, CB-839 induce la acumulación de metabolitos acetilados, pudiendo alterar los niveles de acetilación al desequilibrar los niveles de acetil-CoA, denotado por el aumento en los niveles de acetil-carnitina. Este potencial impacto sobre la regulación epigenética también se encuadra en la relación de la función glutaminasa y regulación epigenética enmarcada en el objetivo 1.

- Restaurar la expresión de GLS2 en células de glioblastoma causa una menor capacidad proliferativa, pero al mismo tiempo protege a las células del efecto antiproliferativo de CB-839.
- GLS2 incrementa el flujo de carbono desde Gln hacia el ciclo TCA. Sin embargo, GLS2 induce una depleción de los metabolitos de 6 carbonos del ciclo, al causar una bajada en la actividad de PDH y con ello, una menor generación de acetil-CoA mitocondrial, lo cual puede afectar a diversas rutas metabólicas, así como a la regulación epigenética.
- La función de GLS2 se ha relacionado con el metabolismo de nucleótidos, alterando los niveles de AMP, GMP y UMP. Igualmente, GLS2 indujo la acumulación de metabolitos metilados y mayores niveles de SAM. Por ello, la función GLS2 podría estar relacionada con la regulación epigenética al alterar las tasas de metilación de proteínas y ácidos nucleicos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusions



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Based on aim 1:

- Both GLS and GLS2 are related to the expression of several miRNAs in glioblastoma cells, implying GLS and GLS2 functions are indirectly associated with the regulation carried out by these miRNAs.
- Both GLS and GLS2 function maximize the cell antioxidant defense, mainly by promoting GSH biosynthesis. GLS2 minimizes oxidative damage to lipids and proteins and elevates GR activity.
- The molecular mechanisms by which GLS and GLS2 affect miRNAs expression and regulation of some of the antioxidant-related elements are unknown. However, some of these parameters behave oppositely with GLS and GLS2, so apparently, they depend on isoenzyme-specific functions.

Based on aim 2:

- The glutaminolytic pathway is essentially important in the glioblastoma cells analyzed, since glutaminase inhibition affects multiple metabolic pathways and cellular processes.
- GLS inhibition by CB-839 minimizes anaplerosis in a variable fashion among the cell lines assayed, affecting both the oxidative metabolism in the TCA cycle and the reductive carboxylation pathway.
- CB-839 induces an imbalance in the levels of succinate related to other TCA cycle intermediates, potentially influencing epigenetic regulation. In fact, CB-839 caused accumulation of methylated metabolites, likely indicating higher methylation levels of DNA and proteins. Similarly, acetylated metabolites were observed when GLS was inhibited, so it may be affecting overall acetylation levels though disbalancing acetyl-CoA levels, denoted by higher acetyl-carnitine levels observed. All these changes may be impacting epigenetics, and are related as well to glutaminase function relationship with epigenetics included in aim 1.
- Nucleotide biosynthesis is strongly affected by GLS inhibition, likely through depletion of aspartate. Nucleotide biosynthesis may be limiting for tumor cell proliferation, which

Conclusions

suggest potential efficacy of treatments combining CB-839 and targeting of enzymes involved in these pathways.

- Restoring GLS2 expression in glioblastoma cells caused lower proliferative capacity but protected against the antiproliferative effect of CB-839 treatment.
- GLS2 increased the flux of carbon from Gln to the TCA cycle, but caused a depletion of the levels of the 6-carbon intermediates, which was a consequence of GLS2 causing lower activity of PDH and, therefore, lower mitochondrial acetyl-CoA production. This effect of GLS2 may be impacting diverse pathways and epigenetic regulation.
- GLS2 function was related to nucleotide metabolism, altering the levels of AMP, GMP and UMP. Besides, GLS2 caused accumulation of methylated metabolites and SAM, which may be impacting epigenetics by altering methylation rates of proteins and nucleic acids.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Bibliografía

Aledo JC, Gómez-Fabre PM, Olalla L, Márquez J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm Genome*. 2000 Dec;11(12):1107-10. doi: 10.1007/s003350010190. PMID: 11130979.

Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 Oct;16(10):619-34. doi: 10.1038/nrc.2016.71. Epub 2016 Jul 29. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2016 Dec;16(12):773. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2016 Nov;16(11):749. PMID: 27492215; PMCID: PMC5484415.

An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan QW, Weiss WA. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*. 2018 Mar;37(12):1561-1575. doi: 10.1038/s41388-017-0045-7. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29321659; PMCID: PMC5860944.

Anandhan A, Dodson M, Schmidlin CJ, Liu P, Zhang DD. Breakdown of an Ironclad Defense System: The Critical Role of NRF2 in Mediating Ferroptosis. *Cell Chem Biol*. 2020 Apr 16;27(4):436-447. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.03.011. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32275864; PMCID: PMC7597851.

Aoki C, Kaneko T, Starr A, Pickel VM. Identification of mitochondrial and non-mitochondrial glutaminase within select neurons and glia of rat forebrain by electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurosci Res*. 1991 Apr;28(4):531-48. doi: 10.1002/jnr.490280410. PMID: 1714509.

Arnér ES. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1790(6):495-526. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.01.014. Epub 2009 Feb 11. PMID: 19364476.

Avissar NE, Sax HC, Toia L. In human enterocytes, GLN transport and ASCT2 surface expression induced by short-term EGF are MAPK, PI3K, and Rho-dependent. *Dig Dis Sci*. 2008 Aug;53(8):2113-25. doi: 10.1007/s10620-007-0120-y. Epub 2007 Dec 20. PMID: 18157695.

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997 Jan 3;272(1):217-21. PMID: 8995250.

Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao F, Andreadis C, Thompson CB. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*. 2005 Sep 15;24(41):6314-22. doi: 10.1038/sj.onc.1208773. PMID: 16007201.

Berwick DC, Hers I, Heesom KJ, Moule SK, Tavaré JM. The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):33895-900. doi: 10.1074/jbc.M204681200. Epub 2002 Jul 9. PMID: 12107176.

Bhutia YD, Ganapathy V. Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Oct;1863(10):2531-9. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.017. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26724577; PMCID: PMC4919214.

Bid HK, Roberts RD, Manchanda PK, Houghton PJ. RAC1: an emerging therapeutic option for targeting cancer angiogenesis and metastasis. *Mol Cancer Ther*. 2013 Oct;12(10):1925-34. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0164. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24072884; PMCID: PMC3823055.

Boedtkjer E, Pedersen SF. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu Rev Physiol*. 2020 Feb 10;82:103-126. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034627. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31730395.

Bott AJ, Maimouni S, Zong WX. The Pleiotropic Effects of Glutamine Metabolism in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 4;11(6):770. doi: 10.3390/cancers11060770. PMID: 31167399; PMCID: PMC6627534.

Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1;47(9):1239-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023. Epub 2009 Jul 21. PMID: 19628035; PMCID: PMC2763943.

C. R. Reczek, N. S. Chandel, The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol*. 1, 79–98 (2017).

Cairns, R., Mak, T. The current state of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 16, 613–614 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.100>

Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, Santos-Jiménez JL, Matés JM, Alonso FJ, Márquez J. Antioxidant responses related to temozolomide resistance in glioblastoma. *Neurochem Int*. 2021 Oct;149:105136. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105136. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34274381.

Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Lobo C, Peñalver A, Márquez J. Glutaminases in brain: Multiple isoforms for many purposes. *Neurochem Int*. 2015 Sep;88:1-5. doi: 10.1016/j.neuint.2015.03.006. Epub 2015 Mar 30. PMID: 25837287.

Cardona C, Sánchez-Mejías E, Dávila JC, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Vitorica J, Alonso FJ, Matés JM, Segura JA, Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR, Gutiérrez A, Márquez J. Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia*. 2015 Mar;63(3):365-82. doi: 10.1002/glia.22758. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25297978.

Chandel NS. Mitochondria. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2021 Mar 1;13(3):a040543. doi: 10.1101/cshperspect.a040543. PMID: 33649187; PMCID: PMC7919390.

Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin ACL, Maddocks ODK, Chokkathukalam A, Coyle JE, Jankevics A, Holding FP, Vousden KH, Frezza C, O'Reilly M, Gottlieb E. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*. 2012 Nov 15;491(7424):458-462. doi: 10.1038/nature11540. Epub 2012 Oct 14. Erratum in: *Nature*. 2013 Apr 18;496(7445):386. PMID: 23064226; PMCID: PMC3894725.



Bibliografía

Chang X, Zhu W, Zhang H, Lian S. Sensitization of melanoma cells to temozolomide by overexpression of microRNA 203 through direct targeting of glutaminase-mediated glutamine metabolism. *Clin Exp Dermatol*. 2017 Aug;42(6):614-621. doi: 10.1111/ced.13119. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28597996.

Chen D, Xia S, Wang M, Lin R, Li Y, Mao H, Aguiar M, Famulare CA, Shih AH, Brennan CW, Gao X, Pan Y, Liu S, Fan J, Jin L, Song L, Zhou A, Mukherjee J, Pieper RO, Mishra A, Peng J, Arellano M, Blum WG, Lonial S, Boggon TJ, Levine RL, Chen J. Mutant and Wild-Type Isocitrate Dehydrogenase 1 Share Enhancing Mechanisms Involving Distinct Tyrosine Kinase Cascades in Cancer. *Cancer Discov*. 2019 Jun;9(6):756-777. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1040. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30862724; PMCID: PMC6548588.

Chen PH, Cai L, Huffman K, Yang C, Kim J, Faubert B, Boroughs L, Ko B, Sudderth J, McMillan EA, Girard L, Chen D, Peyton M, Shields MD, Yao B, Shames DS, Kim HS, Timmons B, Sekine I, Britt R, Weber S, Byers LA, Heymach JV, Chen J, White MA, Minna JD, Xiao G, DeBerardinis RJ. Metabolic Diversity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Mol Cell*. 2019 Dec 5;76(5):838-851.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.028. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31564558; PMCID: PMC6898782.

Chen Z, Li D, Xu N, Fang J, Yu Y, Hou W, Ruan H, Zhu P, Ma R, Lu S, Cao D, Wu R, Ni M, Zhang W, Su W, Ruan BH. Novel 1,3,4-Selenadiazole-Containing Kidney-Type Glutaminase Inhibitors Showed Improved Cellular Uptake and Antitumor Activity. *J Med Chem*. 2019 Jan 24;62(2):589-603. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01198. Epub 2018 Dec 31. PMID: 30543285.

Cheung EC, DeNicola GM, Nixon C, Blyth K, Labuschagne CF, Tuveson DA, Vousden KH. Dynamic ROS Control by TIGAR Regulates the Initiation and Progression of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Feb 10;37(2):168-182.e4. doi: 10.1016/j.ccell.2019.12.012. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31983610; PMCID: PMC7008247.

Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008a Mar 13;452(7184):230-3. doi: 10.1038/nature06734. PMID: 18337823.

Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*. 2008b Mar 13;452(7184):181-6. doi: 10.1038/nature06667. PMID: 18337815.

Chung ST, Chacko SK, Sunehag AL, Haymond MW. Measurements of Gluconeogenesis and Glycogenolysis: A Methodological Review. *Diabetes*. 2015 Dec;64(12):3996-4010. doi: 10.2337/db15-0640. PMID: 26604176; PMCID: PMC4657587.

Cockfield JA, Schafer ZT. Antioxidant Defenses: A Context-Specific Vulnerability of Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 20;11(8):1208. doi: 10.3390/cancers11081208. PMID: 31434226; PMCID: PMC6721511.

- Collins CL, Wasa M, Souba WW, Abcouwer SF. Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J Cell Physiol.* 1998 Jul;176(1):166-78. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<166::AID-JCP18>3.0.CO;2-5. PMID: 9618156.
- Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino Acids.* 2012 Jan;42(1):231-46. doi: 10.1007/s00726-011-0867-5. Epub 2011 Mar 16. PMID: 21409388.
- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J.* 2009 Dec 23;425(2):313-25. doi: 10.1042/BJ20091541. PMID: 20025614.
- Csibi A, Lee G, Yoon SO, Tong H, Ilter D, Elia I, Fendt SM, Roberts TM, Blenis J. The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-Myc translation. *Curr Biol.* 2014 Oct 6;24(19):2274-80. doi: 10.1016/j.cub.2014.08.007. Epub 2014 Sep 11. PMID: 25220053; PMCID: PMC4190129.
- Cunningham JT, Moreno MV, Lodi A, Ronen SM, Ruggero D. Protein and nucleotide biosynthesis are coupled by a single rate-limiting enzyme, PRPS2, to drive cancer. *Cell.* 2014 May 22;157(5):1088-103. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.052. Erratum in: *Cell.* 2014 Jul 31;158(3):689. PMID: 24855946; PMCID: PMC4140650.
- Dang CV. MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Aug 1;3(8):a014217.
- de Groot J, Sontheimer H. Glutamate and the biology of gliomas. *Glia.* 2011 Aug;59(8):1181-9. doi: 10.1002/glia.21113. Epub 2010 Dec 29. PMID: 21192095; PMCID: PMC3107875.
- de Groot JF, Liu TJ, Fuller G, Yung WK. The excitatory amino acid transporter-2 induces apoptosis and decreases glioma growth in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2005 Mar 1;65(5):1934-40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3626. PMID: 15753393.
- de la Rosa V, Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem Int.* 2009 Jul-Aug;55(1-3):76-84. doi: 10.1016/j.neuint.2009.02.021. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19428810.
- DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv.* 2016 May 27;2(5):e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200. PMID: 27386546; PMCID: PMC4928883.
- DeBerardinis RJ, Keshari KR. Metabolic analysis as a driver for discovery, diagnosis, and therapy. *Cell.* 2022 Jul 21;185(15):2678-2689. doi: 10.1016/j.cell.2022.06.029. Epub 2022 Jul 14. PMID: 35839759; PMCID: PMC9469798.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 4;104(49):19345-50. doi: 10.1073/pnas.0709747104. Epub 2007 Nov 21. PMID: 18032601; PMCID: PMC2148292.

Bibliografía

DeNicola GM, Chen PH, Mullarky E, Sudderth JA, Hu Z, Wu D, Tang H, Xie Y, Asara JM, Huffman KE, Wistuba II, Minna JD, DeBerardinis RJ, Cantley LC. NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat Genet.* 2015 Dec;47(12):1475-81. doi: 10.1038/ng.3421. Epub 2015 Oct 19. Erratum in: *Nat Genet.* 2016 Apr;48(4):473. PMID: 26482881; PMCID: PMC4721512.

DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Kern SE, Blair IA, Tuveson DA. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature.* 2011 Jul 6;475(7354):106-9. doi: 10.1038/nature10189. PMID: 21734707; PMCID: PMC3404470.

Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH. Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem.* 1997 Jul 11;272(28):17269-75. doi: 10.1074/jbc.272.28.17269. PMID: 9211863.

Diebold, L.P., Gil, H.J., Gao, P. et al. Mitochondrial complex III is necessary for endothelial cell proliferation during angiogenesis. *Nat Metab* 1, 158–171 (2019).

Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol.* 2019 May;23:101107. doi: 10.1016/j.redox.2019.101107. Epub 2019 Jan 11. PMID: 30692038; PMCID: PMC6859567.

Donald SP, Sun XY, Hu CA, Yu J, Mei JM, Valle D, Phang JM. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):1810-5. PMID: 11280728.

Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, Hall MN. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell.* 2012 Aug 10;47(3):349-58. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.043. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22749528.

Eagle H. The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *J Exp Med.* 1955 Nov 1;102(5):595-600. doi: 10.1084/jem.102.5.595. PMID: 13271674; PMCID: PMC2136536.

Earhart RH, Amato DJ, Chang AY, Borden EC, Shiraki M, Dowd ME, Comis RL, Davis TE, Smith TJ. Phase II trial of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine versus aclacinomycin-A in advanced sarcomas and mesotheliomas. *Invest New Drugs.* 1990 Feb;8(1):113-9. doi: 10.1007/BF00216936. PMID: 2188926.

Eberhardy SR, Farnham PJ. c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem.* 2001 Dec 21;276(51):48562-71. doi: 10.1074/jbc.M109014200. Epub 2001 Oct 22. PMID: 11673469.

Edwards DN, Ngwa VM, Raybuck AL, Wang S, Hwang Y, Kim LC, Cho SH, Paik Y, Wang Q, Zhang S, Manning HC, Rathmell JC, Cook RS, Boothby MR, Chen J. Selective glutamine metabolism

inhibition in tumor cells improves antitumor T lymphocyte activity in triple-negative breast cancer. *J Clin Invest*. 2021 Feb 15;131(4):e140100. doi: 10.1172/JCI140100. PMID: 33320840; PMCID: PMC7880417.

Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genomics*. 1999 Aug 31;1(2):51-62. doi: 10.1152/physiolgenomics.1999.1.2.51. PMID: 11015561.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3892-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2904. PMID: 15172999.

Engqvist MK, Eßer C, Maier A, Lercher MJ, Maurino VG. Mitochondrial 2-hydroxyglutarate metabolism. *Mitochondrion*. 2014 Nov;19 Pt B:275-81. doi: 10.1016/j.mito.2014.02.009. Epub 2014 Feb 21. PMID: 24561575.

Esemen Y, Awan M, Parwez R, Baig A, Rahman S, Masala I, Franchini S, Giakoumettis D. Molecular Pathogenesis of Glioblastoma in Adults and Future Perspectives: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 26;23(5):2607. doi: 10.3390/ijms23052607. PMID: 35269752; PMCID: PMC8910150.

Faubert B, Solmonson A, DeBerardinis RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*. 2020 Apr 10;368(6487):eaaw5473. doi: 10.1126/science.aaw5473. PMID: 32273439; PMCID: PMC7227780.

Finkel T. From sulfenylation to sulfhydration: what a thiolate needs to tolerate. *Sci Signal*. 2012 Mar 13;5(215):pe10. doi: 10.1126/scisignal.2002943. PMID: 22416275.

Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Apr;15(2):247-54. doi: 10.1016/s0955-0674(03)00002-4. PMID: 12648682.

Fisher JP, Adamson DC. Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. *Biomedicines*. 2021 Mar 22;9(3):324. doi: 10.3390/biomedicines9030324. PMID: 33810154; PMCID: PMC8004675.

Fitzgerald G, Soro-Arnaiz I, De Bock K. The Warburg Effect in Endothelial Cells and its Potential as an Anti-angiogenic Target in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Sep 11;6:100. doi: 10.3389/fcell.2018.00100. PMID: 30255018; PMCID: PMC6141712.

Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science*. 1987 Mar 20;235(4795):1492-5. doi: 10.1126/science.3103217. PMID: 3103217.

Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*. 2002 Jun;16(6):769-77. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00323-0. PMID: 12121659.

Bibliografía

Furnari FB, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat Rev Cancer*. 2015 May;15(5):302-10. doi: 10.1038/nrc3918. Epub 2015 Apr 9. PMID: 25855404; PMCID: PMC4875778.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007 Nov 1;21(21):2683-710. doi: 10.1101/gad.1596707. PMID: 17974913.

Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):762-5. doi: 10.1038/nature07823. Epub 2009 Feb 15. PMID: 19219026; PMCID: PMC2729443.

Giacobbe A, Bongiorno-Borbone L, Bernassola F, Terrinoni A, Markert EK, Levine AJ, Feng Z, Agostini M, Zolla L, Agrò AF, Notterman DA, Melino G, Peschiaroli A. p63 regulates glutaminase 2 expression. *Cell Cycle*. 2013 May 1;12(9):1395-405. doi: 10.4161/cc.24478. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23574722; PMCID: PMC3674067.

Goldstein LD, Lee J, Gnad F, Klijn C, Schaub A, Reeder J, Daemen A, Bakalarski CE, Holcomb T, Shames DS, Hartmaier RJ, Chmielecki J, Seshagiri S, Gentleman R, Stokoe D. Recurrent Loss of NFE2L2 Exon 2 Is a Mechanism for Nrf2 Pathway Activation in Human Cancers. *Cell Rep*. 2016 Sep 6;16(10):2605-2617. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.010. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27568559.

Gómez-Fabre PM, Aledo JC, Del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Núñez De Castro I, Campos JA, Márquez J. Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochem J*. 2000 Jan 15;345 Pt 2(Pt 2):365-75. PMID: 10620514; PMCID: PMC1220766.

Goncalves MD, Hopkins BD, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-Kinase, Growth Disorders, and Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Nov 22;379(21):2052-2062. doi: 10.1056/NEJMra1704560. PMID: 30462943.

Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev*. 2001 Jun 1;15(11):1406-18. doi: 10.1101/gad.889901. PMID: 11390360; PMCID: PMC312709.

Grassian AR, Metallo CM, Coloff JL, Stephanopoulos G, Brugge JS. Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes Dev*. 2011 Aug 15;25(16):1716-33. doi: 10.1101/gad.16771811. PMID: 21852536; PMCID: PMC3165936.

Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, Janes JR, Laidig GJ, Lewis ER, Li J, Mackinnon AL, Parlati F, Rodriguez ML, Shwonek PJ, Sjogren EB, Stanton TF, Wang T, Yang J, Zhao F, Bennett MK. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-

negative breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014 Apr;13(4):890-901. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0870. Epub 2014 Feb 12. PMID: 24523301.

Gu Z, Liu Y, Cai F, Patrick M, Zmajkovic J, Cao H, Zhang Y, Tasdogan A, Chen M, Qi L, Liu X, Li K, Lyu J, Dickerson KE, Chen W, Ni M, Merritt ME, Morrison SJ, Skoda RC, DeBerardinis RJ, Xu J. Loss of EZH2 Reprograms BCAA Metabolism to Drive Leukemic Transformation. *Cancer Discov.* 2019 Sep;9(9):1228-1247. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0152. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31189531; PMCID: PMC6726547.

Habib E, Linher-Melville K, Lin HX, Singh G. Expression of xCT and activity of system xc(-) are regulated by NRF2 in human breast cancer cells in response to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015 Aug;5:33-42. doi: 10.1016/j.redox.2015.03.003. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25827424; PMCID: PMC4392061.

Han T, Zhan W, Gan M, Liu F, Yu B, Chin YE, Wang JB. Phosphorylation of glutaminase by PKC ϵ is essential for its enzymatic activity and critically contributes to tumorigenesis. *Cell Res.* 2018 Jun;28(6):655-669. doi: 10.1038/s41422-018-0021-y. Epub 2018 Mar 7. PMID: 29515166; PMCID: PMC5993826.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.

Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal.* 2012 Jun 1;16(11):1323-67. doi: 10.1089/ars.2011.4123. Epub 2012 Feb 3. PMID: 22146081; PMCID: PMC3324814.

Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol.* 2020 Jun;30(6):440-451. doi: 10.1016/j.tcb.2020.03.002. Epub 2020 Apr 14. PMID: 32303435.

Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC, Yung KY, Brenner D, Knobbe-Thomsen CB, Cox MA, Elia A, Berger T, Cescon DW, Adeoye A, Brüstle A, Molyneux SD, Mason JM, Li WY, Yamamoto K, Wakeham A, Berman HK, Khokha R, Done SJ, Kavanagh TJ, Lam CW, Mak TW. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell.* 2015 Feb 9;27(2):211-22. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.019. Epub 2015 Jan 22. Erratum in: *Cancer Cell.* 2015 Feb 9;27(2):314. PMID: 25620030.

Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest.* 2013 Sep;123(9):3678-84. doi: 10.1172/JCI69600. Epub 2013 Sep 3. PMID: 23999442; PMCID: PMC3754270.

Bibliografía

Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, Shen R, Taylor AM, Cherniack AD, Thorsson V, Akbani R, Bowlby R, Wong CK, Wiznerowicz M, Sanchez-Vega F, Robertson AG, Schneider BG, Lawrence MS, Noushmehr H, Malta TM; Cancer Genome Atlas Network; Stuart JM, Benz CC, Laird PW. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell*. 2018 Apr 5;173(2):291-304.e6. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.022. PMID: 29625048; PMCID: PMC5957518.

Hoxhaj G, Ben-Sahra I, Lockwood SE, Timson RC, Byles V, Henning GT, Gao P, Selfors LM, Asara JM, Manning BD. Direct stimulation of NADP⁺ synthesis through Akt-mediated phosphorylation of NAD kinase. *Science*. 2019 Mar 8;363(6431):1088-1092. doi: 10.1126/science.aau3903. PMID: 30846598; PMCID: PMC7261235.

Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7455-60. doi: 10.1073/pnas.1001006107. Epub 2010 Apr 8. PMID: 20378837; PMCID: PMC2867677.

Huang Q, Stalneck C, Zhang C, McDermott LA, Iyer P, O'Neill J, Reimer S, Cerione RA, Katt WP. Characterization of the interactions of potent allosteric inhibitors with glutaminase C, a key enzyme in cancer cell glutamine metabolism. *J Biol Chem*. 2018 Mar 9;293(10):3535-3545. doi: 10.1074/jbc.M117.810101. Epub 2018 Jan 9. PMID: 29317493; PMCID: PMC5846160.

Ingold I, Berndt C, Schmitt S, Doll S, Poschmann G, Buday K, Roveri A, Peng X, Porto Freitas F, Seibt T, Mehr L, Aichler M, Walch A, Lamp D, Jastroch M, Miyamoto S, Wurst W, Ursini F, Arnér ESJ, Fradejas-Villar N, Schweizer U, Zischka H, Friedmann Angeli JP, Conrad M. Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell*. 2018 Jan 25;172(3):409-422.e21. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.048. Epub 2017 Dec 28. PMID: 29290465.

Israelsen WJ, Dayton TL, Davidson SM, Fiske BP, Hosios AM, Bellinger G, Li J, Yu Y, Sasaki M, Horner JW, Burga LN, Xie J, Jurczak MJ, DePinho RA, Clish CB, Jacks T, Kibbey RG, Wulf GM, Di Vizio D, Mills GB, Cantley LC, Vander Heiden MG. PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):397-409. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.025. PMID: 24120138; PMCID: PMC3850755.

Jewell JL, Kim YC, Russell RC, Yu FX, Park HW, Plouffe SW, Tagliabracci VS, Guan KL. Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*. 2015 Jan 9;347(6218):194-8. doi: 10.1126/science.1259472. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25567907; PMCID: PMC4384888.

Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev*. 2011 Mar;63(1):218-42. doi: 10.1124/pr.110.002980. Epub 2011 Jan 12. PMID: 21228261.

Jiang L, Shestov AA, Swain P, Yang C, Parker SJ, Wang QA, Terada LS, Adams ND, McCabe MT, Pietrak B, Schmidt S, Metallo CM, Dranka BP, Schwartz B, DeBerardinis RJ. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature*.

2016 Apr 14;532(7598):255-8. doi: 10.1038/nature17393. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27049945; PMCID: PMC4860952.

Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, Yang X. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol.* 2011 Mar;13(3):310-6. doi: 10.1038/ncb2172. Epub 2011 Feb 20. PMID: 21336310; PMCID: PMC3110666.

Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell.* 2005 Mar 11;120(5):649-61. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.041. PMID: 15766528.

Katt WP, Lukey MJ, Cerione RA. A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Med Chem.* 2017 Jan;9(2):223-243. doi: 10.4155/fmc-2016-0190. Epub 2017 Jan 23. Erratum in: *Future Med Chem.* 2017 Apr;9(5):527. PMID: 28111979; PMCID: PMC5558546.

Katt WP, Ramachandran S, Erickson JW, Cerione RA. Dibenzophenanthridines as inhibitors of glutaminase C and cancer cell proliferation. *Mol Cancer Ther.* 2012 Jun;11(6):1269-78. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0942. Epub 2012 Apr 11. PMID: 22496480.

Keyer K, Imlay JA. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13635-40. doi: 10.1073/pnas.93.24.13635. PMID: 8942986; PMCID: PMC19375.

Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol.* 2021 Jan;599(1):23-37. doi: 10.1113/JP280572. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33006160.

Kim J, DeBerardinis RJ. Mechanisms and Implications of Metabolic Heterogeneity in Cancer. *Cell Metab.* 2019 Sep 3;30(3):434-446. doi: 10.1016/j.cmet.2019.08.013. PMID: 31484055; PMCID: PMC6730674.

Kim J, Lee G. Metabolic Control of m6A RNA Modification. *Metabolites.* 2021 Jan 30;11(2):80. doi: 10.3390/metabo11020080. PMID: 33573224; PMCID: PMC7911930.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):177-85. doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.002. PMID: 16517405.

Kim SH, Kwon CH, Nakano I. Detoxification of oxidative stress in glioma stem cells: mechanism, clinical relevance, and therapeutic development. *J Neurosci Res.* 2014 Nov;92(11):1419-24. doi: 10.1002/jnr.23431. Epub 2014 Jul 9. PMID: 25043479.

Kollareddy M, Dimitrova E, Vallabhaneni KC, Chan A, Le T, Chauhan KM, Carrero ZI, Ramakrishnan G, Watabe K, Haupt Y, Haupt S, Pochampally R, Boss GR, Romero DG, Radu CG, Martinez LA. Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nat Commun.* 2015 Jun 12;6:7389. doi: 10.1038/ncomms8389. PMID: 26067754; PMCID: PMC4467467.

Bibliografía

Konaté MM, Antony S, Doroshow JH. Inhibiting the Activity of NADPH Oxidase in Cancer. *Antioxid Redox Signal*. 2020 Aug 20;33(6):435-454. doi: 10.1089/ars.2020.8046. Epub 2020 Apr 17. PMID: 32008376; PMCID: PMC7370979.

Kuo TC, Chen CK, Hua KT, Yu P, Lee WJ, Chen MW, Jeng YM, Chien MH, Kuo KT, Hsiao M, Kuo ML. Glutaminase 2 stabilizes Dicer to repress Snail and metastasis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2016 Dec 28;383(2):282-294. doi: 10.1016/j.canlet.2016.10.012. Epub 2016 Oct 8. Erratum in: *Cancer Lett*. 2017 May 1;393:130-131. PMID: 27725225.

Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):495-501. doi: 10.1038/nature12912. Epub 2014 Jan 5. PMID: 24390350; PMCID: PMC4048962.

Lee JV, Carrer A, Shah S, Snyder NW, Wei S, Venneti S, Worth AJ, Yuan ZF, Lim HW, Liu S, Jackson E, Aiello NM, Haas NB, Rebbeck TR, Judkins A, Won KJ, Chodosh LA, Garcia BA, Stanger BZ, Feldman MD, Blair IA, Wellen KE. Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell histone acetylation. *Cell Metab*. 2014 Aug 5;20(2):306-319. doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.004. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24998913; PMCID: PMC4151270.

Lee P, Vousden KH, Cheung EC. TIGAR, TIGAR, burning bright. *Cancer Metab*. 2014 Jan 3;2(1):1. doi: 10.1186/2049-3002-2-1. PMID: 24383451; PMCID: PMC3892023.

Lee YZ, Yang CW, Chang HY, Hsu HY, Chen IS, Chang HS, Lee CH, Lee JC, Kumar CR, Qiu YQ, Chao YS, Lee SJ. Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget*. 2014 Aug 15;5(15):6087-101. doi: 10.18632/oncotarget.2173. PMID: 25026281; PMCID: PMC4171615.

Li J, Song P, Jiang T, Dai D, Wang H, Sun J, Zhu L, Xu W, Feng L, Shin VY, Morrison H, Wang X, Jin H. Heat Shock Factor 1 Epigenetically Stimulates Glutaminase-1-Dependent mTOR Activation to Promote Colorectal Carcinogenesis. *Mol Ther*. 2018 Jul 5;26(7):1828-1839. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.04.014. Epub 2018 Apr 14. PMID: 29730197; PMCID: PMC6035735.

Lignitto L, LeBoeuf SE, Homer H, Jiang S, Askenazi M, Karakousi TR, Pass HI, Bhutkar AJ, Tsigos A, Ueberheide B, Sayin VI, Papagiannakopoulos T, Pagano M. Nrf2 Activation Promotes Lung Cancer Metastasis by Inhibiting the Degradation of Bach1. *Cell*. 2019 Jul 11;178(2):316-329.e18. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.003. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31257023; PMCID: PMC6625921.

Linder-Horowitz M, Knox WE, Morris HP. Glutaminase activities and growth rates of rat hepatomas. *Cancer Res*. 1969 Jun;29(6):1195-9. PMID: 4307782.

Linehan WM, Schmidt LS, Crooks DR, Wei D, Srinivasan R, Lang M, Ricketts CJ. The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer Discov*. 2019 Aug;9(8):1006-1021. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1354. Epub 2019 May 14. PMID: 31088840.

Liu J, Zhang C, Lin M, Zhu W, Liang Y, Hong X, Zhao Y, Young KH, Hu W, Feng Z. Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014 May 15;5(9):2635-47. doi: 10.18632/oncotarget.1862. PMID: 24797434; PMCID: PMC4058033.

Liu W, Le A, Hancock C, Lane AN, Dang CV, Fan TW, Phang JM. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 5;109(23):8983-8. doi: 10.1073/pnas.1203244109. Epub 2012 May 21. PMID: 22615405; PMCID: PMC3384197.

Liu Y, Borchert GL, Donald SP, Diwan BA, Anver M, Phang JM. Proline oxidase functions as a mitochondrial tumor suppressor in human cancers. *Cancer Res*. 2009 Aug 15;69(16):6414-22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1223. Epub 2009 Aug 4. PMID: 19654292; PMCID: PMC4287397.

Liu Z, Wang J, Li Y, Fan J, Chen L, Xu R. MicroRNA-153 regulates glutamine metabolism in glioblastoma through targeting glutaminase. *Tumour Biol*. 2017 Feb;39(2):1010428317691429. doi: 10.1177/1010428317691429. PMID: 28218035.

Lo M, Wang YZ, Gout PW. The x(c)- cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J Cell Physiol*. 2008 Jun;215(3):593-602. doi: 10.1002/jcp.21366. PMID: 18181196.

Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem J*. 2000 Jun 1;348 Pt 2(Pt 2):257-61. PMID: 10816417; PMCID: PMC1221061.

Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT, Anastasiou D, Mullarky E, Vokes NI, Sasaki M, Beroukhim R, Stephanopoulos G, Ligon AH, Meyerson M, Richardson AL, Chin L, Wagner G, Asara JM, Brugge JS, Cantley LC, Vander Heiden MG. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet*. 2011 Jul 31;43(9):869-74. doi: 10.1038/ng.890. PMID: 21804546; PMCID: PMC3677549.

López de la Oliva AR, Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, Cardona C, Martín-Rufián M, Sialana FJ, Castilla L, Bae N, Lobo C, Peñalver A, García-Frutos M, Carro D, Enrique V, Paz JC, Mirmira RG, Gutiérrez A, Alonso FJ, Segura JA, Matés JM, Lubec G, Márquez J. Author Correction: Nuclear Translocation of Glutaminase GLS2 in Human Cancer Cells Associates with Proliferation Arrest and Differentiation. *Sci Rep*. 2021 Jan 4;11(1):249. doi: 10.1038/s41598-020-80651-0. Erratum for: *Sci Rep*. 2020 Feb 10;10(1):2259. PMID: 33397990; PMCID: PMC7782474.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9. PMID: 27157931.

Bibliografía

Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. 2014 Jan;66:75-87. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036. Epub 2013 Jul 27. PMID: 23899494.

Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1830(5):3143-53. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008. Epub 2012 Sep 17. PMID: 22995213; PMCID: PMC3549305.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb-Apr;30(1-2):42-59. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005. Epub 2008 Jun 14. PMID: 18601945; PMCID: PMC2704241.

Luengo A, Li Z, Gui DY, Sullivan LB, Zagorulya M, Do BT, Ferreira R, Naamati A, Ali A, Lewis CA, Thomas CJ, Spranger S, Matheson NJ, Vander Heiden MG. Increased demand for NAD⁺ relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Mol Cell*. 2021 Feb 18;81(4):691-707.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.012. Epub 2020 Dec 30. PMID: 33382985; PMCID: PMC8315838.

Lukey MJ, Cluntun AA, Katt WP, Lin MJ, Druso JE, Ramachandran S, Erickson JW, Le HH, Wang ZE, Blank B, Greene KS, Cerione RA. Liver-Type Glutaminase GLS2 Is a Druggable Metabolic Node in Luminal-Subtype Breast Cancer. *Cell Rep*. 2019

Lukey MJ, Greene KS, Erickson JW, Wilson KF, Cerione RA. The oncogenic transcription factor c-Jun regulates glutaminase expression and sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy. *Nat Commun*. 2016 Apr 18;7:11321. doi: 10.1038/ncomms11321. PMID: 27089238; PMCID: PMC4837472.

Lynch G, Kemeny N, Casper E. Phase II evaluation of DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucine) in patients with advanced colorectal carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 1982 Oct;5(5):541-3. PMID: 7180833.

Maas MN, Hintzen JCJ, Porzberg MRB, Mecinović J. Trimethyllysine: From Carnitine Biosynthesis to Epigenetics. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 11;21(24):9451. doi: 10.3390/ijms21249451. PMID: 33322546; PMCID: PMC7764450.

Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, Vousden KH. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*. 2013 Jan 24;493(7433):542-6. doi: 10.1038/nature11743. Epub 2012 Dec 16. PMID: 23242140; PMCID: PMC6485472.

Madiraju P, Pande SV, Prentki M, Madiraju SR. Mitochondrial acetylcarnitine provides acetyl groups for nuclear histone acetylation. *Epigenetics*. 2009 Aug 16;4(6):399-403. doi: 10.4161/epi.4.6.9767. Epub 2009 Aug 18. PMID: 19755853.

Magill GB, Myers WP, Reilly HC, Putnam RC, Magill JW, Sykes MP, Escher GC, Karnofsky DA, Burchenal JH. Pharmacological and initial therapeutic observations on 6-diazo-5-oxo-1-norleucine (DON) in human neoplastic disease. *Cancer*. 1957 Nov-Dec;10(6):1138-50. doi: 10.1002/1097-0142(195711/12)10:6<1138::aid-cnrc2820100608>3.0.co;2-k. PMID: 13489662.

Majewska E, Márquez J, Albrecht J, Szeliga M. Transfection with GLS2 Glutaminase (GAB) Sensitizes Human Glioblastoma Cell Lines to Oxidative Stress by a Common Mechanism

Involving Suppression of the PI3K/AKT Pathway. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 19;11(1):115. doi: 10.3390/cancers11010115. Erratum in: *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 27;12(8): PMID: 30669455; PMCID: PMC6356507.

Manford AG, Rodríguez-Pérez F, Shih KY, Shi Z, Berdan CA, Choe M, Titov DV, Nomura DK, Rape M. A Cellular Mechanism to Detect and Alleviate Reductive Stress. *Cell*. 2020 Oct 1;183(1):46-61.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.034. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32941802.

Mannava S, Grachtchouk V, Wheeler LJ, Im M, Zhuang D, Slavina EG, Mathews CK, Shewach DS, Nikiforov MA. Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle*. 2008 Aug;7(15):2392-400. doi: 10.4161/cc.6390. Epub 2008 Jun 3. PMID: 18677108; PMCID: PMC3744895.

Marchesini G, Bianchi G, Zoli M, Dondi C, Forlani G, Melli A, Bua V, Vannini P, Pisi E. Plasma amino acid response to protein ingestion in patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology*. 1983 Aug;85(2):283-90. PMID: 6345256.

Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J*. 2008 Aug;275(15):3959-70. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x. Epub 2008 Jul 4. PMID: 18616466.

Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang XL, Rajagopalan KN, Maddie M, Vemireddy V, Zhao Z, Cai L, Good L, Tu BP, Hatanpaa KJ, Mickey BE, Matés JM, Pascual JM, Maher EA, Malloy CR, Deberardinis RJ, Bachoo RM. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab*. 2012 Jun 6;15(6):827-37. doi: 10.1016/j.cmet.2012.05.001. Erratum in: *Cell Metab*. 2012 Nov 7;16(5):686. PMID: 22682223; PMCID: PMC3372870.

Márquez J, Alonso FJ, Matés JM, Segura JA, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA. Glutamine Addiction In Gliomas. *Neurochem Res*. 2017a Jun;42(6):1735-1746. doi: 10.1007/s11064-017-2212-1. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28281102.

Márquez J, Campos-Sandoval JA, Peñalver A, Matés JM, Segura JA, Blanco E, Alonso FJ, de Fonseca FR. Glutamate and Brain Glutaminases in Drug Addiction. *Neurochem Res*. 2017b Mar;42(3):846-857. doi: 10.1007/s11064-016-2137-0. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28012058.

Márquez J, Matés JM. Tumor Metabolome: Therapeutic Opportunities Targeting Cancer Metabolic Reprogramming. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 16;13(2):314. doi: 10.3390/cancers13020314. PMID: 33467031; PMCID: PMC7830791.

Márquez, J., Matés, J.M., Alonso, F.J., Martín-Rufián, M., Lobo, C., Campos-Sandoval, J.A. (2015). Canceromics Studies Unravel Tumor's Glutamine Addiction After Metabolic Reprogramming. In: Mazurek, S., Shoshan, M. (eds) *Tumor Cell Metabolism*. Springer, Vienna.

Márquez, J., Matés, J.M., Alonso, F.J., Martín-Rufián, M., Lobo, C., Campos-Sandoval, J.A. (2015). Canceromics Studies Unravel Tumor's Glutamine Addiction After Metabolic Reprogramming. In: Mazurek, S., Shoshan, M. (eds) *Tumor Cell Metabolism*. Springer, Vienna.



Bibliografía

Márquez, J., Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A. (2016). Glutaminases, in *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle, Advances in Neurobiology*, 13 (Schousboe, A. & Sonnewald, U., Eds.), pp. 133–171, Springer.

Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021 Oct;21(10):669-680. doi: 10.1038/s41568-021-00378-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34272515.

Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021 Oct;21(10):669-680. doi: 10.1038/s41568-021-00378-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34272515.

Martín-Rufián M, Nascimento-Gomes R, Higuero A, Crisma AR, Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, Cardona C, Cheng T, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Szeliga M, Albrecht J, Curi R, Márquez J, Colquhoun A, Deberardinis RJ, Matés JM. Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Mar;92(3):277-90. doi: 10.1007/s00109-013-1105-2. Epub 2013 Nov 26. PMID: 24276018; PMCID: PMC4327995.

Martín-Rufián M, Tosina M, Campos-Sandoval JA, Manzanares E, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Márquez J. Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One*. 2012;7(6):e38380. doi: 10.1371/journal.pone.0038380. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22679499; PMCID: PMC3367983.

Matés JM, Campos-Sandoval JA, de Los Santos-Jiménez J, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Metabolic Reprogramming of Cancer by Chemicals that Target Glutaminase Isoenzymes. *Curr Med Chem*. 2020a;27(32):5317-5339. doi: 10.2174/0929867326666190416165004. PMID: 31038055.

Matés JM, Campos-Sandoval JA, Márquez J. Glutaminase isoenzymes in the metabolic therapy of cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018 Dec;1870(2):158-164. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.07.007. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30053497.

Matés JM, Campos-Sandoval JA, Santos-Jiménez JL, Márquez J. Dysregulation of glutaminase and glutamine synthetase in cancer. *Cancer Lett*. 2019 Dec 28;467:29-39. doi: 10.1016/j.canlet.2019.09.011. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31574293.

Matés JM, Di Paola FJ, Campos-Sandoval JA, Mazurek S, Márquez J. Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2020b Feb;98:34-43. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.05.012. Epub 2019 May 22. PMID: 31100352.

McBrayer SK, Mayers JR, DiNatale GJ, Shi DD, Khanal J, Chakraborty AA, Sarosiek KA, Briggs KJ, Robbins AK, Sewastianik T, Shareef SJ, Olenchock BA, Parker SJ, Tateishi K, Spinelli JB, Islam M, Haigis MC, Looper RE, Ligon KL, Bernstein BE, Carrasco RD, Cahill DP, Asara JM, Metallo CM, Yennawar NH, Vander Heiden MG, Kaelin WG Jr. Transaminase Inhibition by 2-Hydroxyglutarate Impairs Glutamate Biosynthesis and Redox Homeostasis in Glioma. *Cell*. 2018 Sep 20;175(1):101-116.e25. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.038. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30220459; PMCID: PMC6219629.

Mellinghoff IK, van den Bent MJ, Blumenthal DT, Touat M, Peters KB, Clarke J, Mendez J, Yust-Katz S, Welsh L, Mason WP, Ducray F, Umemura Y, Nabors B, Holdhoff M, Hottinger AF, Arakawa Y, Sepulveda JM, Wick W, Soffietti R, Perry JR, Giglio P, de la Fuente M, Maher EA, Schoenfeld S, Zhao D, Pandya SS, Steelman L, Hassan I, Wen PY, Cloughesy TF. Vorasidenib in IDH1- or IDH2-Mutant Low-Grade Glioma. *N Engl J Med*. 2023 Jun 4. doi: 10.1056/NEJMoa2304194. Epub ahead of print. PMID: 37272516.

Melone MAB, Valentino A, Margarucci S, Galderisi U, Giordano A, Peluso G. The carnitine system and cancer metabolic plasticity. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 14;9(2):228. doi: 10.1038/s41419-018-0313-7. PMID: 29445084; PMCID: PMC5833840.

Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O, Stephanopoulos G. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*. 2011 Nov 20;481(7381):380-4. doi: 10.1038/nature10602. PMID: 22101433; PMCID: PMC3710581.

Muir A, Danai LV, Gui DY, Waingarten CY, Lewis CA, Vander Heiden MG. Environmental cystine drives glutamine anaplerosis and sensitizes cancer cells to glutaminase inhibition. *Elife*. 2017 Aug 15;6:e27713. doi: 10.7554/eLife.27713. PMID: 28826492; PMCID: PMC5589418.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;279(47):49064-73. doi: 10.1074/jbc.M407715200. Epub 2004 Aug 17. PMID: 15317809.

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1-13. doi: 10.1042/BJ20081386. PMID: 19061483; PMCID: PMC2605959.

Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, Myer VE, MacKeigan JP, Porter JA, Wang YK, Cantley LC, Finan PM, Murphy LO. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009 Feb 6;136(3):521-34. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.044. PMID: 19203585; PMCID: PMC3733119.

Nilsson R, Jain M, Madhusudhan N, Sheppard NG, Strittmatter L, Kampf C, Huang J, Asplund A, Mootha VK. Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer. *Nat Commun*. 2014;5:3128. doi: 10.1038/ncomms4128. PMID: 24451681; PMCID: PMC4106362.

Olalla L, Aledo JC, Bannenberg G, Márquez J. The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett*. 2001 Jan 19;488(3):116-22. doi: 10.1016/s0014-5793(00)02373-5. Erratum in: *FEBS Lett* 2002 Nov 20;531(3):570. PMID: 11163757.

Olalla L, Gutiérrez A, Jiménez AJ, López-Téllez JF, Khan ZU, Pérez J, Alonso FJ, de la Rosa V, Campos-Sandoval JA, Segura JA, Aledo JC, Márquez J. Expression of the scaffolding PDZ protein glutaminase-interacting protein in mammalian brain. *J Neurosci Res*. 2008 Feb 1;86(2):281-92. doi: 10.1002/jnr.21505. PMID: 17847083.

Bibliografía

Pan M, Reid MA, Lowman XH, Kulkarni RP, Tran TQ, Liu X, Yang Y, Hernandez-Davies JE, Rosales KK, Li H, Hugo W, Song C, Xu X, Schones DE, Ann DK, Gradinaru V, Lo RS, Locasale JW, Kong M. Regional glutamine deficiency in tumours promotes dedifferentiation through inhibition of histone demethylation. *Nat Cell Biol.* 2016 Oct;18(10):1090-101. doi: 10.1038/ncb3410. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27617932; PMCID: PMC5536113.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):187-97. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.012. PMID: 16517406.

Pate KT, Stringari C, Sprowl-Tanio S, Wang K, TeSlaa T, Hoverter NP, McQuade MM, Garner C, Digman MA, Teitell MA, Edwards RA, Gratton E, Waterman ML. Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *EMBO J.* 2014 Jul 1;33(13):1454-73. doi: 10.15252/embj.201488598. Epub 2014 May 13. PMID: 24825347; PMCID: PMC4194089.

Patel MS, Korotchikina LG. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans.* 2006 Apr;34(Pt 2):217-22. doi: 10.1042/BST20060217. PMID: 16545080.

Pavlova NN, King B, Josselsohn RH, Violante S, Macera VL, Vardhana SA, Cross JR, Thompson CB. Translation in amino-acid-poor environments is limited by tRNAGln charging. *Elife.* 2020 Dec 8;9:e62307. doi: 10.7554/eLife.62307. PMID: 33289483; PMCID: PMC7744096.

Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016 Jan 12;23(1):27-47. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006. PMID: 26771115; PMCID: PMC4715268.

Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metab.* 2022 Mar 1;34(3):355-377. doi: 10.1016/j.cmet.2022.01.007. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35123658; PMCID: PMC8891094.

Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, González ME, Márquez J, Matés JM. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J.* 2005 Mar 15;386(Pt 3):535-42. doi: 10.1042/BJ20040996. PMID: 15496140; PMCID: PMC1134872.

Pérez-Gómez C, Matés JM, Gómez-Fabre PM, del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Márquez J. Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):771-84. doi: 10.1042/BJ20021445. PMID: 12444921; PMCID: PMC1223212.

Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.* 2015 Jun 2;21(6):805-21. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.014. PMID: 26039447.

Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF,

Driggers EM, Sabatini DM. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 2011 Aug 18;476(7360):346-50. doi: 10.1038/nature10350. PMID: 21760589; PMCID: PMC3353325.

Quinlan CL, Treberg JR, Perevoshchikova IV, Orr AL, Brand MD. Native rates of superoxide production from multiple sites in isolated mitochondria measured using endogenous reporters. *Free Radic Biol Med*. 2012 Nov 1;53(9):1807-17. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.015. Epub 2012 Aug 17. PMID: 22940066; PMCID: PMC3472107.

Rais R, Jančařík A, Tenora L, Nedelcovych M, Alt J, Englert J, Rojas C, Le A, Elgogary A, Tan J, Monincová L, Pate K, Adams R, Ferraris D, Powell J, Majer P, Slusher BS. Discovery of 6-Diazo-5-oxo-l-norleucine (DON) Prodrugs with Enhanced CSF Delivery in Monkeys: A Potential Treatment for Glioblastoma. *J Med Chem*. 2016 Sep 22;59(18):8621-33. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01069. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27560860.

Ramirez-Peña E, Arnold J, Shivakumar V, Joseph R, Vidhya Vijay G, den Hollander P, Bhangre N, Allegakoen P, Prasad R, Conley Z, Matés JM, Márquez J, Chang JT, Vasaikar S, Soundararajan R, Sreekumar A, Mani SA. The Epithelial to Mesenchymal Transition Promotes Glutamine Independence by Suppressing GLS2 Expression. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 22;11(10):1610. doi: 10.3390/cancers11101610. PMID: 31652551; PMCID: PMC6826439.

Rao AD, DeBerardinis RJ. Metabolic vulnerability in tumours illuminated. *Nature*. 2019 Nov;575(7782):296-297. doi: 10.1038/d41586-019-03239-3. PMID: 31719692.

Rathore MG, Saumet A, Rossi JF, de Bettignies C, Tempé D, Lecellier CH, Villalba M. The NF- κ B member p65 controls glutamine metabolism through miR-23a. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Sep;44(9):1448-56. doi: 10.1016/j.biocel.2012.05.011. Epub 2012 May 24. PMID: 22634383.

Redis RS, Vela LE, Lu W, Ferreira de Oliveira J, Ivan C, Rodriguez-Aguayo C, Adamoski D, Pasculli B, Taguchi A, Chen Y, Fernandez AF, Valledor L, Van Roosbroeck K, Chang S, Shah M, Kinnebrew G, Han L, Atlasi Y, Cheung LH, Huang GY, Monroig P, Ramirez MS, Catela Ivkovic T, Van L, Ling H, Gafà R, Kapitanovic S, Lanza G, Bankson JA, Huang P, Lai SY, Bast RC, Rosenblum MG, Radovich M, Ivan M, Bartholomeusz G, Liang H, Fraga MF, Widger WR, Hanash S, Berindan-Neagoe I, Lopez-Berestein G, Ambrosio ALB, Gomes Dias SM, Calin GA. Allele-Specific Reprogramming of Cancer Metabolism by the Long Non-coding RNA CCAT2. *Mol Cell*. 2016 Feb 18;61(4):520-534. doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.015. Epub 2016 Feb 4. Erratum in: *Mol Cell*. 2016 Feb 18;61(4):640. PMID: 26853146; PMCID: PMC4982398.

Ree R, Varland S, Arnesen T. Spotlight on protein N-terminal acetylation. *Exp Mol Med*. 2018 Jul 27;50(7):1-13. doi: 10.1038/s12276-018-0116-z. PMID: 30054468; PMCID: PMC6063853.

Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*. 1979 Apr 25;254(8):2669-76. PMID: 429309.

Bibliografía

Reynolds MR, Lane AN, Robertson B, Kemp S, Liu Y, Hill BG, Dean DC, Clem BF. Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene*. 2014 Jan 30;33(5):556-66. doi: 10.1038/onc.2012.635. Epub 2013 Jan 28. PMID: 23353822; PMCID: PMC3918885.

Robinson MM, McBryant SJ, Tsukamoto T, Rojas C, Ferraris DV, Hamilton SK, Hansen JC, Curthoys NP. Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem J*. 2007 Sep 15;406(3):407-14. doi: 10.1042/BJ20070039. PMID: 17581113; PMCID: PMC2049044.

Romero R, Sayin VI, Davidson SM, Bauer MR, Singh SX, LeBoeuf SE, Karakousi TR, Ellis DC, Bhutkar A, Sánchez-Rivera FJ, Subbaraj L, Martinez B, Bronson RT, Prigge JR, Schmidt EE, Thomas CJ, Goparaju C, Davies A, Dolgalev I, Heguy A, Allaj V, Poirier JT, Moreira AL, Rudin CM, Pass HI, Vander Heiden MG, Jacks T, Papagiannakopoulos T. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat Med*. 2017 Nov;23(11):1362-1368. doi: 10.1038/nm.4407. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28967920; PMCID: PMC5677540.

Ruan JJ, Yu Y, Hou W, Chen Z, Fang J, Zhang J, Ni M, Li D, Lu S, Rui J, Wu R, Zhang W, Ruan BH. Kidney-Type Glutaminase Inhibitor Hexylselen Selectively Kills Cancer Cells via a Three-Pronged Mechanism. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2019 Jan 11;2(1):18-30. doi: 10.1021/acsptsci.8b00047. PMID: 32219214; PMCID: PMC7088945.

Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, Van Veldhoven PP, Waltregny D, Daniëls VW, Machiels J, Vanderhoydonc F, Smans K, Waelkens E, Verhoeven G, Swinnen JV. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res*. 2010 Oct 15;70(20):8117-26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3871. Epub 2010 Sep 28. PMID: 20876798.

Saunier E, Benelli C, Bortoli S. The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: An old metabolic gatekeeper regulated by new pathways and pharmacological agents. *Int J Cancer*. 2016 Feb 15;138(4):809-17. doi: 10.1002/ijc.29564. Epub 2015 Apr 28. PMID: 25868605.

Scalise M, Pochini L, Galluccio M, Console L, Indiveri C. Glutamine transporters as pharmacological targets: From function to drug design. *Asian J Pharm Sci*. 2020 Mar;15(2):207-219. doi: 10.1016/j.ajps.2020.02.005. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32373200; PMCID: PMC7193454.

Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, Gao S, Puigserver P, Brugge JS. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*. 2009 Sep 3;461(7260):109-13. doi: 10.1038/nature08268. Epub 2009 Aug 19. PMID: 19693011; PMCID: PMC2931797.

Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005 Jan;7(1):77-85. doi: 10.1016/j.ccr.2004.11.022. PMID: 15652751.

Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Rabinowitz JD, Dang CV, Riggins GJ. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res.* 2010 Nov 15;70(22):8981-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1666. Epub 2010 Nov 2. PMID: 21045145; PMCID: PMC3058858.

Sengupta D, Cassel T, Teng KY, Aljuhani M, Chowdhary VK, Hu P, Zhang X, Fan TW, Ghoshal K. Regulation of hepatic glutamine metabolism by miR-122. *Mol Metab.* 2020 Apr;34:174-186. doi: 10.1016/j.molmet.2020.01.003. Epub 2020 Jan 9. PMID: 32180557; PMCID: PMC7044666.

Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94(13):6658-63. doi: 10.1073/pnas.94.13.6658. PMID: 9192621; PMCID: PMC21214.

Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, Stathis M, Duvall B, Delahanty G, Alt J, Rais R, Rojas C, Gao P, Xiang Y, Dang CV, Slusher BS, Tsukamoto T. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors. *J Med Chem.* 2012 Dec 13;55(23):10551-63. doi: 10.1021/jm301191p. Epub 2012 Nov 30. PMID: 23151085; PMCID: PMC3539823.

Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017 Apr;11:613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035. Epub 2017 Jan 5. PMID: 28110218; PMCID: PMC5256672.

Sircar K, Huang H, Hu L, Cogdell D, Dhillon J, Tzelepi V, Efstathiou E, Koumakpayi IH, Saad F, Luo D, Bismar TA, Aparicio A, Troncoso P, Navone N, Zhang W. Integrative molecular profiling reveals asparagine synthetase is a target in castration-resistant prostate cancer. *Am J Pathol.* 2012 Mar;180(3):895-903. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.030. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22245216; PMCID: PMC4715215.

Smith EM, Watford M. Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. Sequence similarity to kidney-type glutaminase. *J Biol Chem.* 1990 Jun 25;265(18):10631-6. PMID: 2191954.

Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera RM, Ferrone CR, Mullarky E, Shyh-Chang N, Kang Y, Fleming JB, Bardeesy N, Asara JM, Haigis MC, DePinho RA, Cantley LC, Kimmelman AC. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature.* 2013 Apr 4;496(7443):101-5. doi: 10.1038/nature12040. Epub 2013 Mar 27. Erratum in: *Nature.* 2013 Jul 25;499(7459):504. PMID: 23535601; PMCID: PMC3656466.

Stalneck CA, Ulrich SM, Li Y, Ramachandran S, McBrayer MK, DeBerardinis RJ, Cerione RA, Erickson JW. Mechanism by which a recently discovered allosteric inhibitor blocks glutamine metabolism in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jan 13;112(2):394-9. doi: 10.1073/pnas.1414056112. Epub 2014 Dec 29. PMID: 25548170; PMCID: PMC4299208.



Bibliografía

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.

Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 2014 Nov 28;2:17. doi: 10.1186/2049-3002-2-17. PMID: 25671107; PMCID: PMC4323058.

Sunayama J, Matsuda K, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C. Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells.* 2010 Nov;28(11):1930-9. doi: 10.1002/stem.521. PMID: 20857497.

Sunayama J, Matsuda K, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C. Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells.* 2010 Nov;28(11):1930-9. doi: 10.1002/stem.521. PMID: 20857497.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.* 1995 Oct 13;270(5234):296-9. doi: 10.1126/science.270.5234.296. PMID: 7569979.

Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 20;107(16):7461-6. doi: 10.1073/pnas.1002459107. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20351271; PMCID: PMC2867754.

Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1991 Feb 1;51(3):794-8. PMID: 1846317.

Szeliga M, Bogacińska-Karaś M, Kuźmicz K, Rola R, Albrecht J. Downregulation of GLS2 in glioblastoma cells is related to DNA hypermethylation but not to the p53 status. *Mol Carcinog.* 2016 Sep;55(9):1309-16. doi: 10.1002/mc.22372. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26258493.

Szeliga M, Obara-Michlewska M, Matyja E, Łazarczyk M, Lobo C, Hilgier W, Alonso FJ, Márquez J, Albrecht J. Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia*. 2009 Jul;57(9):1014-23. doi: 10.1002/glia.20825. PMID: 19062176.

Szeliga M, Zgrzywa A, Obara-Michlewska M, Albrecht J. Transfection of a human glioblastoma cell line with liver-type glutaminase (LGA) down-regulates the expression of DNA-repair gene MGMT and sensitizes the cells to alkylating agents. *J Neurochem*. 2012 Nov;123(3):428-36. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07917.x. Epub 2012 Sep 21. PMID: 22888977.

Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):299-312. doi: 10.3322/caac.21613. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32478924.

Tang D, Kroemer G. Ferroptosis. *Curr Biol*. 2020 Nov 2;30(21):R1292-R1297. doi: 10.1016/j.cub.2020.09.068. PMID: 33142092.

Thangavelu K, Pan CQ, Karlberg T, Balaji G, Uttamchandani M, Suresh V, Schüler H, Low BC, Sivaraman J. Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 15;109(20):7705-10. doi: 10.1073/pnas.1116573109. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22538822; PMCID: PMC3356676.

Timmerman LA, Holton T, Yuneva M, Louie RJ, Padró M, Daemen A, Hu M, Chan DA, Ethier SP, van 't Veer LJ, Polyak K, McCormick F, Gray JW. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell*. 2013 Oct 14;24(4):450-65. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.020. Epub 2013 Oct 3. PMID: 24094812; PMCID: PMC3931310.

Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Nov;7(11):833-46. doi: 10.1038/nrm2039. PMID: 17057753.

Trujillo M, Clippe A, Manta B, Ferrer-Sueta G, Smeets A, Declercq JP, Knoops B, Radi R. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Nov 1;467(1):95-106. doi: 10.1016/j.abb.2007.08.008. Epub 2007 Aug 22. PMID: 17892856.

Tsutsumi R, Harizanova J, Stockert R, Schröder K, Bastiaens PIH, Neel BG. Assay to visualize specific protein oxidation reveals spatio-temporal regulation of SHP2. *Nat Commun*. 2017 Sep 6;8(1):466. doi: 10.1038/s41467-017-00503-w. PMID: 28878211; PMCID: PMC5587708.

van den Heuvel AP, Jing J, Wooster RF, Bachman KE. Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biol Ther*. 2012 Oct;13(12):1185-94. doi: 10.4161/cbt.21348. Epub 2012 Aug 15. PMID: 22892846; PMCID: PMC3469476.

Bibliografía

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809. PMID: 19460998; PMCID: PMC2849637.

Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):657-669. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.039. PMID: 28187287; PMCID: PMC5329766.

Vasan K, Werner M, Chandel NS. Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metab*. 2020 Sep 1;32(3):341-352. doi: 10.1016/j.cmet.2020.06.019. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32668195; PMCID: PMC7483781.

Velletri T, Romeo F, Tucci P, Peschiaroli A, Annicchiarico-Petruzzelli M, Niklison-Chirou MV, Amelio I, Knight RA, Mak TW, Melino G, Agostini M. GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle*. 2013 Nov 15;12(22):3564-73. doi: 10.4161/cc.26771. Epub 2013 Oct 10. Erratum in: *Cell Cycle*. 2015;14(10):1611-2. PMID: 24121663; PMCID: PMC3906342.

Venneti S, Dunphy MP, Zhang H, Pitter KL, Zanzonico P, Campos C, Carlin SD, La Rocca G, Lyashchenko S, Ploessl K, Rohle D, Omuro AM, Cross JR, Brennan CW, Weber WA, Holland EC, Mellinghoff IK, Kung HF, Lewis JS, Thompson CB. Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. *Sci Transl Med*. 2015 Feb 11;7(274):274ra17. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1009. PMID: 25673762; PMCID: PMC4431550.

Villa E, Sahu U, O'Hara BP, Ali ES, Helmin KA, Asara JM, Gao P, Singer BD, Ben-Sahra I. mTORC1 stimulates cell growth through SAM synthesis and m6A mRNA-dependent control of protein synthesis. *Mol Cell*. 2021 May 20;81(10):2076-2093.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2021.03.009. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33756106; PMCID: PMC8141029.

Wahlström T, Henriksson MA. Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1849(5):563-9. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.07.004. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25038584.

Wang C, Guo K, Gao D, Kang X, Jiang K, Li Y, Sun L, Zhang S, Sun C, Liu X, Wu W, Yang P, Liu Y. Identification of transaldolase as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma metastasis using xenografted mouse model and clinic samples. *Cancer Lett*. 2011 Dec 27;313(2):154-66. doi: 10.1016/j.canlet.2011.08.031. Epub 2011 Oct 8. PMID: 22023829.

Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF, Ambrosio AL, Dias SM, Dang CV, Cerione RA. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010 Sep 14;18(3):207-19. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.009. Erratum in: *Cancer Cell*. 2010 Oct 19;18(4):397. PMID: 20832749; PMCID: PMC3078749.

Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GR, Chandel NS. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May

11;107(19):8788-93. doi: 10.1073/pnas.1003428107. Epub 2010 Apr 26. PMID: 20421486; PMCID: PMC2889315.

Wellen KE, Lu C, Mancuso A, Lemons JM, Ryczko M, Dennis JW, Rabinowitz JD, Collier HA, Thompson CB. The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev.* 2010 Dec 15;24(24):2784-99. doi: 10.1101/gad.1985910. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21106670; PMCID: PMC3003197.

Wiel C, Le Gal K, Ibrahim MX, Jahangir CA, Kashif M, Yao H, Ziegler DV, Xu X, Ghosh T, Mondal T, Kanduri C, Lindahl P, Sayin VI, Bergo MO. BACH1 Stabilization by Antioxidants Stimulates Lung Cancer Metastasis. *Cell.* 2019 Jul 11;178(2):330-345.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.005. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31257027.

Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell.* 2007 Apr;18(4):1437-46. doi: 10.1091/mbc.e06-07-0593. Epub 2007 Feb 14. PMID: 17301289; PMCID: PMC1838986.

Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* 1995 Dec;82-83:969-74. doi: 10.1016/0378-4274(95)03532-x. PMID: 8597169.

Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 2;105(48):18782-7. doi: 10.1073/pnas.0810199105. Epub 2008 Nov 24. PMID: 19033189; PMCID: PMC2596212.

Wise DR, Ward PS, Shay JE, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, Platt JM, DeMatteo RG, Simon MC, Thompson CB. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 6;108(49):19611-6. doi: 10.1073/pnas.1117773108. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22106302; PMCID: PMC3241793.

Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2010 Apr 2;285(14):10850-61. doi: 10.1074/jbc.M109.080796. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20123989; PMCID: PMC2856291.

Wyatt MD, Allan JM, Lau AY, Ellenberger TE, Samson LD. 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. *Bioessays.* 1999 Aug;21(8):668-76. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199908)21:8<668::AID-BIES6>3.0.CO;2-D. PMID: 10440863.

Xia HL, Lv Y, Xu CW, Fu MC, Zhang T, Yan XM, Dai S, Xiong QW, Zhou Y, Wang J, Cao X. MiR-513c suppresses neuroblastoma cell migration, invasion, and proliferation through direct targeting glutaminase (GLS). *Cancer Biomark.* 2017 Dec 6;20(4):589-596. doi: 10.3233/CBM-170577. Erratum in: *Cancer Biomark.* 2018;23(2):311. PMID: 28800318.

Bibliografía

Xiang L, Xie G, Liu C, Zhou J, Chen J, Yu S, Li J, Pang X, Shi H, Liang H. Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):2996-3005. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.003. Epub 2013 Aug 13. PMID: 23954443.

Xiao D, Ren P, Su H, Yue M, Xiu R, Hu Y, Liu H, Qing G. Myc promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2. *Oncotarget*. 2015 Dec 1;6(38):40655-66. doi: 10.18632/oncotarget.5821. PMID: 26528759; PMCID: PMC4747359.

Xiao H, Jedrychowski MP, Schweppe DK, Huttlin EL, Yu Q, Heppner DE, Li J, Long J, Mills EL, Szpyt J, He Z, Du G, Garrity R, Reddy A, Vaites LP, Paulo JA, Zhang T, Gray NS, Gygi SP, Chouchani ET. A Quantitative Tissue-Specific Landscape of Protein Redox Regulation during Aging. *Cell*. 2020 Mar 5;180(5):968-983.e24. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.012. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32109415; PMCID: PMC8164166.

Xu J, Reznik E, Lee HJ, Gundem G, Jonsson P, Sarungbam J, Bialik A, Sanchez-Vega F, Creighton CJ, Hoekstra J, Zhang L, Sajjakulnukit P, Kremer D, Tolstyka Z, Casuscelli J, Stirdivant S, Tang J, Schultz N, Jeng P, Dong Y, Su W, Cheng EH, Russo P, Coleman JA, Papaemmanuil E, Chen YB, Reuter VE, Sander C, Kennedy SR, Hsieh JJ, Lyssiotis CA, Tickoo SK, Hakimi AA. Abnormal oxidative metabolism in a quiet genomic background underlies clear cell papillary renal cell carcinoma. *Elife*. 2019 Apr 1;8:e38986. doi: 10.7554/eLife.38986. PMID: 30924768; PMCID: PMC6459676.

Xu X, Zur Hausen A, Coy JF, Löchelt M. Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *Int J Cancer*. 2009 Mar 15;124(6):1330-7. doi: 10.1002/ijc.24078. PMID: 19065656.

Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Oct 1;1514(2):291-302. doi: 10.1016/s0005-2736(01)00384-4. PMID: 11557028.

Yang C, Sudderth J, Dang T, Bachoo RM, McDonald JG, DeBerardinis RJ. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res*. 2009 Oct 15;69(20):7986-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2266. Epub 2009 Oct 13. Erratum in: *Cancer Res*. 2010 Feb 1;70(3):1275. Bachoo, Robert G [corrected to Bachoo, Robert M]. PMID: 19826036; PMCID: PMC2764330.

Yang WH, Qiu Y, Stamatatos O, Janowitz T, Lukey MJ. Enhancing the Efficacy of Glutamine Metabolism Inhibitors in Cancer Therapy. *Trends Cancer*. 2021 Aug;7(8):790-804. doi: 10.1016/j.trecan.2021.04.003. Epub 2021 May 18. PMID: 34020912; PMCID: PMC9064286.

Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, Schreiber SL, Stockwell

BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014 Jan 16;156(1-2):317-331. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010. PMID: 24439385; PMCID: PMC4076414.

Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD, Thompson CB. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 1;109(18):6904-9. doi: 10.1073/pnas.1204176109. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22509023; PMCID: PMC3345000.

Ye P, Mimura J, Okada T, Sato H, Liu T, Maruyama A, Ohyama C, Itoh K. Nrf2- and ATF4-dependent upregulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition. *Mol Cell Biol*. 2014 Sep 15;34(18):3421-34. doi: 10.1128/MCB.00221-14. Epub 2014 Jul 7. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2015 Jul;35(13):2366. PMID: 25002527; PMCID: PMC4135628.

Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Coloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik JH, Lim C, Guimaraes AR, Martin ES, Chang J, Hezel AF, Perry SR, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara JM, Weissleder R, Wang YA, Chin L, Cantley LC, DePinho RA. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*. 2012 Apr 27;149(3):656-70. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.058. PMID: 22541435; PMCID: PMC3472002.

Yu CC, Wu PJ, Hsu JL, Ho YF, Hsu LC, Chang YJ, Chang HS, Chen IS, Guh JH. Ardisianone, a natural benzoquinone, efficiently induces apoptosis in human hormone-refractory prostate cancers through mitochondrial damage stress and survivin downregulation. *Prostate*. 2013 Jan;73(2):133-45. doi: 10.1002/pros.22548. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22674285. Oct 1;29(1):76-88.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.076. PMID: 31577957; PMCID: PMC6939472.

Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, Schmidt K, Willson JK, Markowitz S, Zhou S, Diaz LA Jr, Velculescu VE, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science*. 2009 Sep 18;325(5947):1555-9. doi: 10.1126/science.1174229. Epub 2009 Aug 6. PMID: 19661383; PMCID: PMC2820374.

Yuneva M. Finding an "Achilles' heel" of cancer: the role of glucose and glutamine metabolism in the survival of transformed cells. *Cell Cycle*. 2008 Jul 15;7(14):2083-9. doi: 10.4161/cc.7.14.6256. Epub 2008 May 8. PMID: 18635953.

Yuneva MO, Fan TW, Allen TD, Higashi RM, Ferraris DV, Tsukamoto T, Matés JM, Alonso FJ, Wang C, Seo Y, Chen X, Bishop JM. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab*. 2012 Feb 8;15(2):157-70. doi: 10.1016/j.cmet.2011.12.015. PMID: 22326218; PMCID: PMC3282107.

Zhang C, Liu J, Zhao Y, Yue X, Zhu Y, Wang X, Wu H, Blanco F, Li S, Bhanot G, Haffty BG, Hu W, Feng Z. Glutaminase 2 is a novel negative regulator of small GTPase Rac1 and mediates p53 function in suppressing metastasis. *Elife*. 2016 Jan 11;5:e10727. doi: 10.7554/eLife.10727. PMID: 26751560; PMCID: PMC4749555.

Bibliografía

Zhang J, Fan J, Venneti S, Cross JR, Takagi T, Bhinder B, Djaballah H, Kanai M, Cheng EH, Judkins AR, Pawel B, Baggs J, Cherry S, Rabinowitz JD, Thompson CB. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. *Mol Cell*. 2014 Oct 23;56(2):205-218. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.018. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25242145; PMCID: PMC4224619.

Zhang J, Wang C, Chen M, Cao J, Zhong Y, Chen L, Shen HM, Xia D. Epigenetic silencing of glutaminase 2 in human liver and colon cancers. *BMC Cancer*. 2013 Dec 14;13:601. doi: 10.1186/1471-2407-13-601. PMID: 24330717; PMCID: PMC3878668.

Zhang J, Wang L, Mao S, Liu M, Zhang W, Zhang Z, Guo Y, Huang B, Yan Y, Huang Y, Yao X. miR-1-3p Contributes to Cell Proliferation and Invasion by Targeting Glutaminase in Bladder Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(2):513-527. doi: 10.1159/000495273. Epub 2018 Nov 20. PMID: 30458442.

Zhang WB, Wang Z, Shu F, Jin YH, Liu HY, Wang QJ, Yang Y. Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *J Biol Chem*. 2010 Dec 24;285(52):40461-71. doi: 10.1074/jbc.M110.164046. Epub 2010 Sep 29. PMID: 20880848; PMCID: PMC3003344.

Zhao Y, Feng X, Chen Y, Selfridge JE, Gorityala S, Du Z, Wang JM, Hao Y, Cioffi G, Conlon RA, Barnholtz-Sloan JS, Saltzman J, Krishnamurthi SS, Vinayak S, Veigl M, Xu Y, Bajor DL, Markowitz SD, Meropol NJ, Eads JR, Wang Z. 5-Fluorouracil Enhances the Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 against PIK3CA-Mutant Colorectal Cancers. *Cancer Res*. 2020 Nov 1;80(21):4815-4827. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0600. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32907836; PMCID: PMC7642187.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Anexos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Metabolic Reprogramming of Cancer by Chemicals that Target Glutaminase Isoenzymes

Matés JM, Campos-Sandoval JA, de Los Santos-Jiménez J, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Metabolic Reprogramming of Cancer by Chemicals that Target Glutaminase Isoenzymes. *Curr Med Chem.* 2020;27(32):5317-5339. doi: 10.2174/0929867326666190416165004. PMID: 31038055.

Abstract: Background: Metabolic reprogramming of tumours is a hallmark of cancer. Among the changes in the metabolic network of cancer cells, glutaminolysis is a key reaction altered in neoplasms. Glutaminase proteins control the first step in glutamine metabolism and their expression correlates with malignancy and growth rate of a great variety of cancers. The two types of glutaminase isoenzymes, GLS and GLS2, differ in their expression patterns and functional roles: GLS has oncogenic properties and GLS2 has been described as a tumour suppressor factor.

Results: We have focused on glutaminase connections with key oncogenes and tumour suppressor genes. Targeting glutaminase isoenzymes includes different strategies aimed at deactivating the rewiring of cancer metabolism. In addition, we found a long list of metabolic enzymes, transcription factors and signalling pathways dealing with glutaminase. On the other hand, a number of chemicals have been described as isoenzyme-specific inhibitors of GLS and/or GLS2 isoforms. These molecules are being characterized as synergic and therapeutic agents in many types of tumours.

Conclusion: This review states the metabolic pathways that are rewired in cancer, the roles of glutaminase isoforms in cancer, as well as the metabolic circuits regulated by glutaminases. We also show the plethora of anticancer drugs that specifically inhibit glutaminase isoenzymes for treating several sets of cancer.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. Glutaminases Regulate Glutathione and Oxidative Stress in Cancer

Matés JM, Campos-Sandoval JA, de Los Santos-Jiménez J, Márquez J. Glutaminases regulate glutathione and oxidative stress in cancer. *Arch Toxicol.* 2020 Aug;94(8):2603-2623. doi: 10.1007/s00204-020-02838-8. Epub 2020 Jul 18. PMID: 32681190.

Targeted therapies against cancer have improved both survival and quality of life of patients. However, metabolic rewiring evokes cellular mechanisms that reduce therapeutic mightiness. Resistant cells generate more glutathione, elicit nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) activation, and overexpress many anti-oxidative genes such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and thioredoxin reductase, providing stronger antioxidant capacity to survive in a more oxidative environment due to the sharp rise in oxidative metabolism and reactive oxygen species generation. These changes dramatically alter tumour microenvironment and cellular metabolism itself. A rational design of therapeutic combination strategies is needed to flatten cellular homeostasis and accomplish a drop in cancer development. Context-dependent glutaminase isoenzymes show oncogenic and tumour suppressor properties, being mainly associated to MYC and p53, respectively. Glutaminases catalyze glutaminolysis in mitochondria, regulating oxidative phosphorylation, redox status and cell metabolism for tumour growth. In addition, the substrate and product of glutaminase reaction, glutamine and glutamate, respectively, can work as signalling molecules moderating redox and bioenergetic pathways in cancer. Novel synergistic approaches combining glutaminase inhibition and redox-dependent modulation are described in this review. Pharmacological or genetic glutaminase regulation along with oxidative chemotherapy can help to improve the design of combination strategies that escalate the rate of therapeutic success in cancer patients.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. Antioxidant Responses Related to Temozolomide Resistance in Glioblastoma

Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, Santos-Jiménez JL, Matés JM, Alonso FJ, Márquez J. Antioxidant responses related to temozolomide resistance in glioblastoma. *Neurochem Int.* 2021 Oct;149:105136. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105136. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34274381.

Glioblastoma remains one of the most challenging and devastating cancers, with only a very small proportion of patients achieving 5-year survival. The current standard of care consists of surgery, followed by radiation therapy with concurrent and maintenance chemotherapy with the alkylating agent temozolomide. To date, this drug is the only one that provides a significant survival benefit, albeit modest, as patients end up acquiring resistance to this drug. As a result, tumor progression and recurrence inevitably occur, leading to death. Several factors have been proposed to explain this resistance, including an upregulated antioxidant system to keep the elevated intracellular ROS levels, a hallmark of cancer cells, under control. In this review, we discuss the mechanisms of chemoresistance -including the important role of glioblastoma stem cells-with emphasis on antioxidant defenses and how agents that impair redox balance (i.e.: sulfasalazine, erastin, CB-839, withaferin, resveratrol, curcumin, chloroquine, and hydroxychloroquine) might be advantageous in combined therapies against this type of cancer.