



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA DIVISIÓN DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**Regulación del metabolismo por el GDF11 en células derivadas de tumores
hepáticos**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Lic. En B.E. Sharik Hernández Rizo

CO-DIRECTORAS

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Dra. Carmen García Ruíz

ASESOR

Dr. Benjamín Pérez Aguilar

(Septiembre/2018)

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

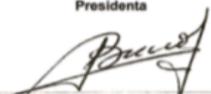
Durante el transcurso de la maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí la beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 615896/791019, en el periodo 2016-2018, organismo al que agradezco su apoyo. También conté con la beca mixta o de movilidad que me permitió realizar la estancia, de tres meses, en el Laboratorio de la Dra. Carmen García Ruiz en Barcelona.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa/Laboratorio de Medicina Experimental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM/INCICH en la ciudad de México, México y en el laboratorio de muerte y proliferación celular del Centro Esther Koplowitz en Barcelona, España, bajo la dirección de la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz y la Dra. Carmen García Ruíz. El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, por medio de los proyectos con clave INFR-2017-280788, bajo la responsabilidad técnica de la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz, así como del proyecto CB-252942 y Fronteras de la Ciencia 1320 bajo la responsabilidad técnica del Dr. Luis E. Gómez Quiroz, así como PRODEP 913026-14612111).

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Regulación del metabolismo por GDF11 en células derivadas de tumores hepáticos”, que presentó: Lic. En B.E. Sharik Hernández Rizo. El día 6 de septiembre del año 2018

Miembros del jurado

Presidenta



DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

Presidente

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Universidad Autónoma Metropolitana-I,
Lab. Med. Exp. Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM/INCICH

Secretario



DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

Secretario

Dr. Armando Luna López
Instituto Nacional de Geriátría



DRA. NATALIA NUÑO LÁMBARRI

Vocal 1

Dra. Natalia Nuño Lámbarri
Clínica Médica Sur



DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR

Vocal 2

Dr. Benjamín Pérez Aguilar
Universidad Autónoma Metropolitana-I,
Lab. Med. Exp. Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM/INCICH

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORA

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz.

Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, Laboratorio de Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Unidad UNAM/INCICH teléfono: 55732911 ext 27304, mcgr@xanum.uam.mx

CO-DIRECTORA

Dra. Carmen García Ruíz.

Departamento de Muerte y Proliferación Celular, Instituto Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC, 08036 Barcelona, España, teléfono: 933638310, cgrbam@iibb.csic.es

Asesor

Dr. Benjamín Pérez Aguilar.

Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, Laboratorio de Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Unidad UNAM/INCICH teléfono: 55732911 ext 27304, bpa@xanum.uam.mx

Agradecimientos

En primera estancia quisiera agradecer a mi comité tutorial, por el gran apoyo que me han brindado.

A la Dra. Conchita por su gran dedicación y trabajo constante, por apoyarme y siempre motivarme.

Al Doctor Luis por todo el conocimiento que me ha transmitido y por mostrarme el camino de la ciencia, así como la confianza que ha puesto en mí.

A la Dra. Carmen por abrirme las puertas en su laboratorio y su orientación en todo momento.

A Benja por su paciencia, y a mis compañeros de laboratorio que se han convertido en mi segunda familia.

A mi familia por motivarme día a día.

Y finalmente a Jon por su gran apoyo incondicional, por el empeño y amor que siempre muestra.

Resumen

Las células cancerosas se caracterizan por presentar alteraciones en las vías metabólicas, que son clave para satisfacer sus altas demandas biosintéticas asociadas a la proliferación. Parte de este fenotipo se traduce en una dependencia en el uso de glucosa como fuente de energía y una mayor síntesis de lípidos para favorecer la proliferación celular. El factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11 / BMP11), miembro de la superfamilia del TGF- β , se ha descrito recientemente como un regulador importante de la proliferación y diferenciación en células que mantienen características troncales. Sin embargo, el papel que juega en células que demandan una mayor cantidad de energía, como es el caso del carcinoma hepatocelular (HCC) aún no se ha caracterizado. Nuestros resultados indican que GDF11 induce un efecto antitumoral en las líneas celulares de carcinoma hepatocelular asociado con el efecto que produce en el estado metabólico en glucólisis y el metabolismo de los lípidos en el HCC.

Abstract

Cancer cells are characterized by alterations in key metabolic pathways to fulfill the biosynthetic demands associated with proliferation. Part of this phenotype is translated in a significant reliance in the use of glucose as an energy source, and a greater synthesis of lipids to favor cell proliferation. The growth differentiation factor 11 (GDF11/ BMP11), a member of TGF- β superfamily, has recently been described as an important regulator of proliferation and differentiation in cells that maintain stem characteristics. However, the role it plays in cells that demand a greater amount of energy, as in the case of hepatocellular carcinoma (HCC), has not yet been characterized. Our results indicate that GDF11 induces an anti-tumorigenic effect in hepatocellular carcinoma cell lines associated with the outcome that exert on glycolysis and lipid metabolism. These results show that GDF11 could be an important factor in the control of hepatocellular carcinoma.

Índice general

Resumen	vi
Abstract	vii
Índice general.....	viii
Introducción.....	1
<i>Hepatocarcinoma celular</i>	1
<i>Efecto Warburg</i>	1
<i>Lipogénesis en HCC</i>	3
<i>Mitocondria y cáncer</i>	6
<i>Factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11)</i>	8
<i>Líneas celulares en el estudio de HCC</i>	9
Antecedentes	10
Justificación.....	11
Pregunta de Investigación	12
Hipótesis	12
Objetivo General	12
Objetivos Particulares	13
Materiales y métodos.....	13
<i>Cultivo celular</i>	13
<i>Análisis del contenido de proteína por Western blot</i>	14
<i>Proliferación celular</i>	15
<i>Determinación de lípidos neutros</i>	15
<i>Determinación de la funcionalidad mitocondrial</i>	16

<i>Determinación de colesterol</i>	17
<i>Análisis de flujo extracelular</i>	17
<i>Red mitocondrial y análisis morfométrico</i>	18
<i>Análisis transcriptómico</i>	19
<i>Viabilidad celular</i>	19
<i>Análisis estadístico</i>	20
Resultados	20
<i>El GDF11 disminuye la proliferación y migración en células de HCC</i>	20
<i>Efecto del GDF11 en la funcionalidad mitocondrial y el contenido de lípidos neutros</i>	23
<i>Inactivación de proteínas lipogénicas por GDF11</i>	24
<i>GDF11 disminuye la glucólisis y el consumo de oxígeno con alteraciones en la morfología de la red mitocondrial en HCC.</i>	26
<i>Efecto del GDF11 en la expresión diferencial de genes en HCC</i>	32
Discusión	34
Conclusión	40
Bibliografía	41

Introducción

Hepatocarcinoma celular

El hepatocarcinoma celular (HCC) es uno de los cánceres más letales y prevalentes en la población. Diferentes factores etiológicos como infección crónica del virus de la hepatitis B y C, el alcohol y la diabetes causan daño hepático, seguido de un proceso inflamatorio, necrosis y la proliferación de las células hepáticas. Ciclos continuos de procesos de daño y regeneración culminan en cirrosis hepática, la cual se caracteriza por la presencia de nódulos regenerativos que progresan en algunos casos hacia nódulos displásicos y finalmente en HCC (Tahmasebi Birgani & Carloni, 2017).

El HCC es la neoplasia primaria más común del hígado, es el quinto cáncer más común en hombres y el séptimo en mujeres a nivel mundial, con más de medio millón de nuevos casos diagnosticados anualmente en todo el mundo. (World Health Organization Mortality Database. WHO Statistical Information System. 2008 Available at: <http://www.who.int/whosis>.). La incidencia anual del HCC es igual al número de muertes por año que este genera, lo cual es un indicador de la agresividad de esta enfermedad (Jemal et al., 2011).

Efecto Warburg

Las células tumorales reprograman su metabolismo energético para cubrir sus altas demandas bioenergéticas, para mantener un crecimiento rápido y descontrolado. El primer evento adaptativo en el metabolismo del tumor es el denominado efecto Warburg. El efecto Warburg se caracteriza por un incremento en la captación y

consumo de glucosa en condiciones aerobias, una disminución en la fosforilación oxidativa y la producción de lactato (Currie et al., 2013). En un tejido normal, aproximadamente el 10% de la energía de la célula se genera por glucólisis, mientras que la respiración aeróbica, que tiene lugar en la mitocondria, contribuye con 90%. Sin embargo, en tejidos tumorales, aproximadamente el 50% de la energía celular, se genera por glucólisis y la energía restante es generada en la mitocondria.

Los tumores comparten una proliferación celular descontrolada y para esto requieren generar eficientemente energía y componentes de su biomasa, con la finalidad de expandirse y diseminarse (Boroughs & DeBerardinis, 2015). La reprogramación metabólica es una característica bien establecida en el cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Como se ha descrito previamente, las células tumorales basan su metabolismo en la glucólisis aerobia para consumir glucosa y generar ATP, el cual es un proceso rápido pero poco eficiente (Cairns et al., 2011). El paso inicial de la glucólisis es el transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma, el cual depende de la familia de transportadores de glucosa (GLUTs) (Macheda et al., 2005). Existe evidencia suficiente de que los transportadores de glucosa (GLUT1-4) se encuentran expresados de forma aberrante en diferentes tipos de cánceres, teniendo una influencia significativa en el metabolismo de glucosa en el cáncer (Szablewski, 2013). En otro estudio se analizó la expresión del transportador de glucosa GLUT2 en 60 muestras de pacientes con HCC revelando que GLUT2 se encuentra sobre-expresado en el HCC (Daskalow et al., 2009), además se ha demostrado que los pacientes con

HCC y GLUT2 positivo predice un mal pronóstico en pacientes con HCC (Paudyal et al., 2008).

Existen dos vías importantes involucradas en la reprogramación metabólica. La primer vía es la de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), la cual funciona como un sensor y regulador en la homeostasis energética (Hardie et al., 2012). La activación de AMPK por estrés energético promueve el cambio de glucólisis hacia fosforilación oxidativa, este cambio tiene un efecto inhibitorio en el efecto Warburg en células con una rápida proliferación (Hardie, 2015). La activación de AMPK disminuye la síntesis de RNA, DNA, proteínas y lípidos para inhibir la proliferación celular y el crecimiento. El efecto de la activación de AMPK en el metabolismo del cáncer ha sido bien caracterizado. Por otro lado, mTOR es un regulador crucial, río abajo, en la señalización de AMPK en las células de cáncer, de esta manera AMPK puede inhibir la actividad de mTOR de forma directa o indirecta. La inactivación de mTOR suprime la expresión de genes que son reguladores de la glucólisis ((Hardie, 2011; Hay & Sonenberg, 2004)).

Lipogénesis en HCC

Una de las rutas metabólicas que se desregulan a lo largo de la carcinogénesis es la vía de síntesis de ácidos grasos, específicamente hay un incremento en la lipogénesis (Rohrig & Schulze, 2016). En el cáncer la desregulación en la síntesis de lípidos es necesaria para proveer una fuente constante de energía y de lípidos así como precursores lipídicos que promueven la producción de membranas, modificaciones

postraduccionales de proteínas necesarias para la transducción de señales en el contexto de una elevada proliferación (Rohrig & Schulze, 2016). Evidencia reciente indica que la vía de señalización AKT/mTOR se encuentra involucrada en la regulación de la lipogénesis (Menendez & Lupu, 2007; Swinnen et al., 2006), el incremento en esta vía se asocia con el aumento de enzimas lipogénicas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol (Calvisi et al., 2011).

La lipogénesis es la síntesis de ácidos grasos endógenos a partir de acetil CoA (Ameer et al., 2014). Una vez que la glucosa entra a la célula, se forma piruvato a través de la glucólisis en el citosol. En la mitocondria, el piruvato es convertido en citrato por medio del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El citrato sale de la mitocondria, y es convertido en acetil CoA por la ATP citrato liasa (ACLY). A continuación la acetil CoA carboxilasa (ACC) convierte la acetil CoA en malonil CoA por una carboxilación irreversible. Finalmente, la ácido graso sintasa (FASN), enzima clave responsable del paso catalítico final en la biosíntesis de ácidos grasos, induce la condensación de acetil CoA y malonil CoA para producir ácido palmítico, un ácido graso saturado de 16 carbonos (Figura A). El ácido palmítico es extendido por una elongasa y forma ácido esteárico. Enseguida la estearoil-CoA desaturasa (SCD1) es la responsable de la desaturación del ácido esteárico y palmítico en el carbono nueve, resultando en la formación de palmitato y oleato que son ácidos grasos monoinsaturados (MUSFAS). Los ácidos grasos pueden ser insaturados por la desaturasa de ácidos grasos (FADS) para formar ácidos grasos poliinsaturados (PUSFAs). Los ácidos grasos libres (FAs) pueden ser utilizados como sustratos para la síntesis de triglicéridos, esteres de colesterol y fosfolípidos (Che et al., 2017).

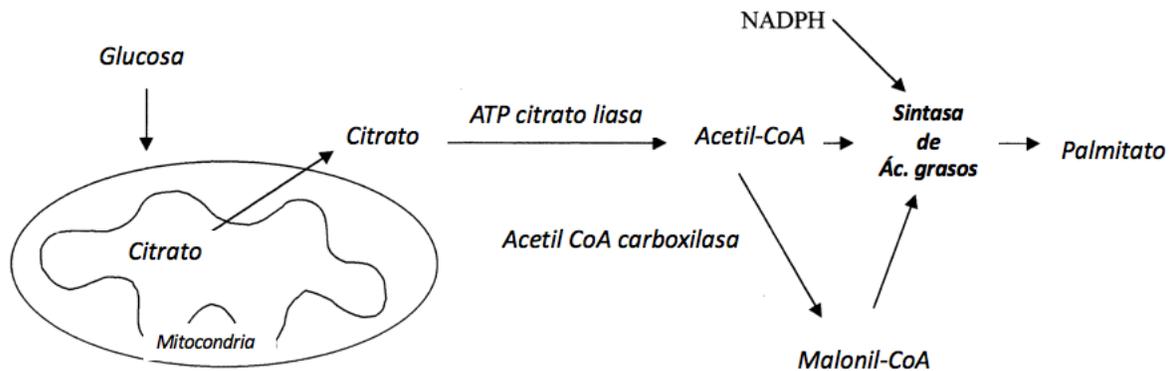


Figura A. Síntesis de ácidos grasos de glucosa a palmitato.

Evidencia experimental indica que la alta proliferación celular (Bensinger et al., 2008; Lo Sasso et al., 2010) y el crecimiento del tumor (Clendening et al., 2010; Dang, 2012) se encuentran estrechamente asociados con altos requerimientos de colesterol. Algunos tipos de cáncer, como el HCC, son dependientes del colesterol para crecer (Borena et al., 2012). El mecanismo predominante que provee el colesterol necesario para las necesidades celulares es la síntesis *de novo* a partir de acetil-CoA en la llamada vía del mevalonato. La hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCR) cataliza la reducción de HMG CoA a mevalonato, el paso limitante en la síntesis de colesterol. El mevalonato es transformado hacia isopentenil-difosfato, tras la acción de la mevalonato cinasa (MVK) y la mevalonato descarboxilasa (MVD). A continuación, se polimerizan seis de estas moléculas para formar escualeno, a través de la escualeno sintasa (SQS), el escualeno se cicla a lanosterol. El lanosterol después de una serie de reacciones es finalmente transformado en colesterol (Goldstein & Brown, 1990).

La expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos es controlada por las proteínas de unión a elementos regulados por esterol (SREBPs), que son una familia de factores de transcripción. SREBP1 y SREBP1c son dos variantes del

empalme del gen SREBP1 y, SREBP2 es el producto del gen SREBPF2 (Horton, 2002). Los SREBPs se unen a elementos regulatorios de esterol (SREs) y algunas secuencias E-box, elemento palindrómico de DNA, en los promotores de sus genes blanco (Amemiya-Kudo et al., 2002).

Mitocondria y cáncer

A nivel celular la mitocondria es el conector central del metabolismo, integrando las vías de señalización involucradas en la demanda energética y biosintética de la célula. Es un organelo altamente dinámico que responde al estrés celular a través de cambios en su masa total, sus interconexiones y su localización subcelular (Wai & Langer, 2016). Cambios en la masa total mitocondrial reflejan una alteración en el balance entre la biogénesis mitocondrial y la mitofagia (Twig et al., 2008).

La morfología mitocondrial varía dependiendo el tipo celular y el tejido, cambiando rápidamente en respuesta a señales externas y metabólicas como el estado de nutrientes. Las muchas funciones de la mitocondria se han asociado estrechamente a su morfología. La red mitocondrial abarca la estructura ramificada y reticular de las mitocondrias fusionadas, así como una estructura separada que se distingue por puntuaciones individuales (Valente et al., 2017).

Las mitocondrias se interconectan unas con otras como una red continua determinada por la fusión mitocondrial, mientras que la fisión mitocondrial resulta en la fragmentación de la red generando mitocondrias con dimensiones más pequeñas (Suen et al., 2008).

La remodelación de la red mitocondrial en las células está mecánicamente regulada por procesos de fusión y fisión en respuesta a hipoxia, ciclo celular, cambios en la demanda de energía y diferentes tipos de estrés celular (Detmer & Chan, 2007).

La fusión involucra la asociación coordinada de la membrana interna y externa de la mitocondria. Las mitofusinas (Mfn), Mfn1 y Mfn2, son proteínas esenciales para este proceso (Chen et al., 2003) junto con OPA1 (dinamina mitocondrial tipo GTPasa) (Chen et al., 2005). El proceso opuesto, la fisión mitocondrial depende de la proteína relacionada a dinamina Drp1, (Smirnova et al., 2001) que se localiza en regiones específicas en la mitocondria, y un subgrupo de estas zonas marca los sitios de la futura fisión. Las dinaminas son enzimas mecano-químicas que emplean la hidrólisis de GTP para dirigir la escisión de la membrana (Praefcke & McMahon, 2004), y se conoce que la desregulación de estos procesos se encuentra implicada en la carcinogénesis. Se ha investigado sobre la alteración de la dinámica mitocondrial y su papel funcional en la regulación de la autofagia y la supervivencia celular en el HCC, indicando que el proceso de fisión se encuentra incrementado, debido a un aumento en la expresión de dinaminas (DRP1) que contribuye a un mal pronóstico en pacientes con HCC. El aumento de la fisión por la expresión forzada de DRP1 o el silenciamiento de Mfn1 promueve la supervivencia de las células de HCC tanto *in vitro* como *in vivo*, facilitando la autofagia e inhibiendo la apoptosis dependiente de la mitocondria (Huang et al., 2016). También se ha demostrado que la fisión mitocondrial mediada por Drp1 juega un papel crucial en la regulación de la progresión del ciclo celular y la proliferación celular en el HCC (Zhan et al., 2016).

Factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11)

El factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11) también conocido como proteína morfogénica de hueso 11 (BMP11), es un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) (Nakashima et al., 1999). El GDF8 y el GDF11 son dos miembros de la familia que comparten un 90% de homología, se unen al mismo receptor y a los mismos antagonistas extracelulares, lo que hacía suponer que eran funcionalmente indistinguibles (Walker et al., 2017). Como otros miembros de la súper familia de TGF β , el GDF11 se une a los receptores tipo I ActRIIA y ActRIIB (Tsuchida et al., 2008), el complejo recluta a los receptores tipo II de activina ALK4, ALK5 y ALK7 para activar a las proteínas Smad2/3, las cuales se asocian a Smad4. El complejo de proteínas Smad se trasloca al núcleo e interactúa con co-activadores o con co-represores transcripcionales para regular la expresión génica (Y. H. Zhang et al., 2016).

Mientras el papel del GDF11 durante el desarrollo está bien definido, su papel en el adulto es poco comprendido. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que el GDF11 es un factor circulante importante que disminuye con la edad. Tratamientos exógenos con GDF11 pueden revertir los efectos relacionados a la edad incluyendo la reducción de la hipertrofia cardiaca (Loffredo et al., 2013), regeneración muscular (Sinha et al., 2014) así como promover la neurogénesis (Katsimpardi et al., 2014). Por otra parte, otros estudios reportan aspectos contradictorios de la función del GDF11 así como controversia acerca de las similitudes entre el GDF11 y el GDF8 (Egerman et al., 2015; Hinken et al., 2016; Rodgers & Eldridge, 2015; Smith et al., 2015). Un

estudio reciente sugiere que tanto el GDF11 y el GDF8 no son funcionalmente equivalentes y que el GDF11 es un activador más potente de Smad2/3 *in vitro* e *in vivo* a través de los receptores de activina tipo I ALK4/5/7 que GDF8 (Walker et al., 2017).

Líneas celulares en el estudio de HCC

Las líneas celulares se han usado extensamente en el estudio del HCC. El uso de sistemas *in vitro* ofrece la posibilidad de realizar análisis bajo condiciones experimentales bien controladas. Las líneas celulares más comunes para el estudio del HCC incluyen Hep3B, Huh-7, HepG2 entre otras (Qiu et al., 2015).

La línea celular Hep3B proviene de un varón estadounidense de 8 años con HCC primario. Presenta la característica de sintetizar varias proteínas de plasma humano incluyendo albúmina y alfa-fetoproteína. Estudios epigenéticos sugieren que la línea Hep3B tiene un fenotipo más agresivo en comparación con la línea Huh-7 y HepG2 (Jiang et al., 2007). La línea celular Hep3B secreta proteínas características de transición epitelio mesénquima (EMT), al igual que la línea celular Huh-7, proceso que se recapitula en el cáncer (Slany et al., 2010). Las células Hep3B son deficientes en p53 (proteína supresora de tumores, cuya función se encuentra frecuentemente alterada en el cáncer) y expresan la proteína viral de la hepatitis B (HBx) que juega un papel crucial en el desarrollo del HCC (Qiu et al., 2015).

La línea celular Huh-7 es una línea celular bien establecida y diferenciada derivada de células epiteliales de un carcinoma celular, originada a partir de un tumor hepático de un hombre japonés de 57 años. Se ha demostrado que esta línea celular es un buen

modelo de estudio del HCC, en cuanto estudios de fármacos, estudios asociados al metabolismo y toxicidad de xenobióticos (Mersch-Sundermann et al., 2004), a su vez presenta una mutación puntual en p53 (Bressac et al., 1990).

Antecedentes

En células troncales tratadas con GDF11 se ha demostrado que, este factor es un regulador maestro de la transcripción que puede suprimir la proliferación y migración celular por la regulación de la expresión de genes involucrados en ambos procesos (Williams et al., 2013).

Estudios en cáncer colorrectal muestran que la expresión del RNAm de GDF11 fue significativamente mayor en tejidos cancerosos que en los tejidos normales, también muestran que tumores con una alta expresión de GDF11 presentaron una mayor frecuencia a metástasis en comparación con los tumores que presentaban baja expresión de GDF11 (Yokoe et al., 2007).

Un estudio reciente en células triple negativo de cáncer de mama, el cual es un carcinoma agresivo y heterogéneo en el cual varios genes supresores de tumores se pierden por mutación, delección o silenciamiento en cultivos 3D cuando son tratadas con GDF11 se promueve un fenotipo epitelial y antiinvasivo, induciendo la expresión de E-cadherina. Los resultados muestran que el cáncer triple negativo de mama retiene el locus y la expresión de GDF11, sin embargo, la actividad de la proteína se pierde debido a deficiencia en su convertasa (PCSK5), provocando que el precursor inactivo de GDF11 se acumule intracelularmente. La reconstitución de PCSK5

moviliza el reservorio de GDF11 in vitro y suprime la metástasis a pulmón del cáncer de mama triple negativo (Bajikar et al., 2017).

Se ha reportado la expresión de GDF11 en biopsias de pacientes con HCC, indicando que los niveles de expresión de GDF11 son significativamente menores en tejido tumoral de hígado en comparación con el tejido normal. Por otra parte, los niveles de expresión y contenido de proteína de GDF11 en las líneas celulares provenientes de cáncer de hígado en comparación con las líneas celulares provenientes de hígado normal son significativamente menores (Y. H. Zhang et al., 2018).

Estudios previos en nuestro grupo de trabajo indican que el GDF11 induce un efecto antitumorigénico en líneas celulares de carcinoma hepatocelular. El tratamiento con GDF11 en células Huh-7 induce la activación de Smad3. Los efectos observados por este factor de crecimiento fue la disminución en la formación de colonias y el número de esferoides. Se analizaron marcadores asociados al proceso de EMT, mostrando que el GDF11 disminuye los marcadores mesenquimales como snail e incrementa los epiteliales como E-cadherina. En un modelo de invasión en embriones de pollo, el GDF11 disminuyó la intravasación de las células Huh-7 tratadas con este factor, a diferencia de las no tratadas que se intravasaron e invadieron al embrión.

Justificación

El HCC es uno de los cánceres más letales y prevalentes en la población. Es el quinto cáncer más común en hombres y el séptimo en mujeres a nivel mundial, con más de medio millón de nuevos casos diagnosticados anualmente en todo el mundo. Es un

cáncer altamente agresivo, cuya detección se realiza en estadios tardíos, generalmente por exploración indirecta, además de que no existen terapias adecuadas contra esta patología. Evaluar el mecanismo por el cual el GDF11 ejerce un efecto sobre la proliferación en células tumorales, así como determinar los procesos metabólicos asociados a la disminución de la tasa proliferativa, permitirá entender el fenotipo metabólico asociado a la disminución del carácter tumoral de las células derivadas de tumores hepáticos.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto del GDF11 sobre el metabolismo en células provenientes de tumores hepáticos?

Hipótesis

El GDF11 inducirá cambios en los parámetros de malignidad celular a través de la modulación en el metabolismo energético, principalmente en glucólisis, respiración celular y síntesis de lípidos, en células derivadas de HCC.

Objetivo General

Establecer los efectos de GDF11 sobre el metabolismo en células derivadas de tumores hepáticos humanos.

Objetivos Particulares

1. Determinar el efecto de GDF11 en la viabilidad, proliferación y migración celular en células Hep3B y Huh-7.
2. Determinar los efectos inducidos por el GDF11 en el metabolismo lipídico en la línea celular Hep3B y Huh-7.
3. Determinar el efecto del GDF11 en el metabolismo energético y su relación con la morfología mitocondrial en células de HCC.

Materiales y métodos

Cultivo celular

La línea celular Hep3B y Huh-7 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC). Las células se sembraron a una densidad de 48 000 células / cm² en cajas de Petri de 60 mm de diámetro (Corning, EE. UU.) en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) para la línea Hep3B, y medio Williams E (Sigma-aldrich) para las Huh-7, suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) (SBF, Hyclone Laboratories Inc., Logan Utah, EE. UU.). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de aire a humedad de saturación. Se verificó la adherencia de las células y la formación de una monocapa después de 4 h. Una vez adheridas, las células se lavaron con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y el medio se reemplazó por un medio de crecimiento

sin suero. Pasadas 4 h, las células se trataron o no con 50 ng/ml de rhGDF11 (PeproTech Inc.) cada 24 h durante 3 días. El rhGDF11 usado para tratar las células se adquirió de PeproTech Inc. siguiendo las instrucciones del fabricante. El GDF11 se utilizó según los métodos descritos en estudios previos (Loffredo et al., 2013; Y. H. Zhang et al., 2016). Las células del grupo control se trataron con el mismo volumen de agua ultrapura estéril utilizado con el GDF11.

Análisis del contenido de proteína por Western blot

El análisis del contenido de proteína por Western blot se realizó como se describió en estudios previos por nuestro grupo (Enriquez-Cortina et al., 2017). Las células se lisaron con M-PER (reactivo de extracción de proteínas de mamíferos) (Thermo Scientific) suplementado con inhibidor de proteasas e inhibidor de fosfatasa COMPLETE y phosSTOP respectivamente (Roche Diagnostics, Barcelona, España) y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se recolectaron y las concentraciones de proteína se determinaron por un ensayo de ácido bicinconínico (Pierce™ BCA, Thermo Scientific). La proteína (80 µg/ml) se sometió a SDS-PAGE al 10% y se transfirió a membranas de PVDF de 0,2µm de baja fluorescencia (GE Healthcare Life Sciences). Después de bloquear con leche descremada al 5% a 4 °C durante 2 h, las membranas se trataron con los anticuerpos primarios contra las proteínas indicadas en la tabla (dilución 1:1000) y β-actina (dilución 1:10 000) a 4 °C durante la noche. Después de tres lavados con TBS-Tween, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de

rábano picante a temperatura ambiente durante 2 h de acuerdo con la especie en que se produjeron los anticuerpos primarios. Las membranas se revelaron usando luminol. Las bandas de proteínas se escanearon y las intensidades de la banda se cuantificaron usando un densitómetro Imaging System (Gel Logic 1500, Kodak).

Proliferación celular

Se realizó mediante el ensayo de CCK-8 (Dojingo, Kumamoto, Japón) para medir el efecto del tratamiento con GDF11 sobre la proliferación. El ensayo se basa en la conversión de una sal de tetrazolio soluble en agua, 2- (2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disulfofenil) -2H-tetrazolio, sal monosódica (WST-8), a un colorante formazán soluble en agua tras la reducción por deshidrogenasas en presencia de un transportador de electrones. Las células se sembraron en placas de 96 pozos (48 000 células/cm²) y se trataron o no con GDF11 en ausencia de agentes mitogénicos (sin SBF: SBF-). Después de 24, 48 y 72 h, las células se lavaron con medio de crecimiento sin suero, y se añadió la solución CCK-8 (10 µl) a cada pozo, seguido de incubación durante 1 hora a 37 °C. La absorbancia del colorante de formazán se leyó a 450 nm mediante un lector multiplaca, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Determinación de lípidos neutros

Las células incubadas o no con GDF11, se lavaron cuidadosamente con solución de PBS a pH 7,4 después del tratamiento. La tinción con aceite rojo O se realizó según lo descrito (Hernandez et al., 2015). Brevemente, las células se fijaron con

paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min y se tiñeron con solución aceite rojo oleoso recién preparada al 0.2% durante 1 h. Después de enjuagar con PBS, las células se contratiñeron con hematoxilina durante 1 min y fueron observadas al microscopio.

Determinación de la funcionalidad mitocondrial

La funcionalidad mitocondrial se evaluó usando el ensayo de MTT, que mide la actividad de la deshidrogenasa de succinato mitocondrial en células vivas. El ensayo depende de la capacidad de las células viables para biotransformar una sal de tetrazolio soluble en agua en un producto de formazán insoluble en agua. Las células se despegaron usando tripsina y se sembraron en una placa de 24 pozos a una densidad de 48 000 células/cm². Después de la adherencia de las células, el medio completo se reemplazó por medio basal y se dejó durante 4 h. Tras una incubación de 24, 48 y 72 h a 37 °C con los respectivos reactivos, se añadió a cada pozo un total de 500 µl de medio DMEM que contenía 0.5 mg/ml de MTT, y se dejó incubar durante 30 min. Posteriormente, el medio se eliminó mediante aspiración, y se dejó secar la placa durante 10 min. El colorante fue removido usando 1 ml de isopropanol durante 10 min en agitación. Se determinó la absorbancia de cada pozo a 490 nm usando un lector de multiplacas.

Determinación de colesterol

El análisis se realizó como se ha descrito previamente en nuestro grupo de trabajo (Nuno-Lambarri et al., 2016). 2×10^6 células en 200 μ L de PBS se saponificaron con KOH alcohólico en un bloque de calentamiento a 60 °C durante 15 min. Después de que la mezcla se había enfriado, se añadieron 2 ml de hexano y 600 ml de agua destilada y se agitaron para asegurar la mezcla completa. Las alícuotas apropiadas de la capa de hexano se evaporaron usando el concentrador SpeedVac y se usaron para la determinación del colesterol con el reactivo de O-ftalaldehído (Sigma-Aldrich) disuelto en ácido acético; después se añadió ácido sulfúrico y luego se leyó a 550 nm en el espectrofotómetro. La concentración de colesterol se determinó mediante una curva control.

Análisis de flujo extracelular

La respiración mitocondrial *in vivo* en tiempo real (OCR) y la tasa glucolítica (ECAR) se controlaron con el Seahorse XF24 Flux Analyzer (Seahorse Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la densidad celular para cada una de las líneas celulares. Se sembraron 50 000 células/pozo y 40 000 células/pozo (Hep3B y Huh7, respectivamente) en placas de XFe24. La línea celular Hep3B se dejó durante 4 h en medio DMEM completo (10% de FBS, 1% antibiótico) para permitir la adherencia a la placa. Se realizó el mismo procedimiento para las células Huh-7 pero en presencia de medio Williams' completo (10% de FBS, 1% antibiótico). Para la evaluación del ECAR en tiempo real, las células se incubaron con medio de ensayo no

amortiguado (XF Media Base que contiene L-glutamina 2 mM) seguido de una inyección secuencial de glucosa 10 mM, oligomicina 2 μ M y 2-desoxiglucosa 50 mM. Para la evaluación del OCR las células se incubaron con medio de ensayo no amortiguado (XF Media Base que contiene glucosa 10mM, L-glutamina 2mM y piruvato 1mM) seguido de una inyección secuencial de oligomicina 1 μ M, carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) 0.25 μ M y la mezcla de rotenona/antimicina A 0.5 μ M. Los datos se normalizaron por μ g de proteína total usando el ensayo del ácido bicinconínico.

Red mitocondrial y análisis morfométrico

Las células se sembraron a una densidad de 48 000 células/cm² en placas de 12 pozos en cubreobjetos de 12 mm y por inmunofluorescencia se emplearon los marcadores de mitocondria Tom20 y Tim23, dilución 1/250, los núcleos se tiñieron con DAPI. Las células fueron analizadas por microscopia confocal (Tom20/DAPI) y microscopia de epifluorescencia (Tim23/DAPI) aumento original 630X. El análisis cuantitativo de la morfología mitocondrial se realizó mediante un análisis computacional para calcular los valores del área, perímetro, redondez y relación de aspecto (AR). Las imágenes de las mitocondrias se analizaron usando el software ImageJ. El valor de 1 para AR indica un círculo perfecto, conforme la mitocondria se va alargando y se convierte en una forma más elíptica el valor de AR incrementa.

Análisis transcriptómico

El ARN se extrajo de células Huh7 tratadas o no, por 72 h con GDF11, usando el reactivo Trizol (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se verificó la integridad del ARN total de las muestras en un gel de agarosa. Mismas cantidades de las muestras individuales se analizaron con el Illumina Genome Analyser Iix. El análisis de Enriquecimiento (GSEA) identificó los grupos de genes que se encuentran funcionalmente asociados, basados en diferentes ontologías y/o vías. El grupo de genes con un FDR <0.5 (Tasa de Descubrimientos Falsos) se consideraron como funcionalmente asociados. Para el análisis de enriquecimiento, se tomaron los 139 genes que se encontraron diferencialmente expresados. Todos los genes humanos fueron usados como background para calcular la significancia estadística. Se empleó un fold change de 1.5 con una $p=0.001$.

Viabilidad celular

Las células se sembraron a una densidad de 48 000 células/cm² en placas de 12 pozos. Una vez transcurridas 72h las células se despegaron con 250µl de tripsina, la cual se inactivó con 500µl de PBS. Una vez que las células estuvieron en suspensión se prosiguió con la tinción con azul tripano 0.4% relación 1:1 (células en suspensión: colorante). Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer. La viabilidad celular se reportó en porcentaje de células vivas respecto a células totales.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm EEM (Error Estandar de la Media). Los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independiente por triplicado. La comparación entre grupos se llevó a cabo mediante el análisis t de student. Las diferencias se consideraron significativas tomando una $p < 0.05$. El software Prism versión 6 se usó para llevar a cabo el análisis.

Resultados

El GDF11 disminuye la proliferación y migración en células de HCC.

Para investigar los efectos del GDF11 sobre la proliferación celular en células de HCC, se incubaron células Hep3B con 50ng/ml de rhGDF11 cada 24h y se corroboraron los efectos en la línea celular Huh-7. Los resultados del ensayo de proliferación mostraron que el GDF11 induce una inhibición significativa de la proliferación significativamente en una forma dependiente al tiempo en la línea celular Hep3B (Figura 1A) y se corroboró el efecto en células Huh-7 (Figura 1B). Dado que el proceso de proliferación se vio afectado, se realizó la prueba de viabilidad de exclusión de colorante azul tripano, la cual demostró que no existen cambios en la viabilidad celular entre el grupo no tratado (NT) y el tratado con GDF11 durante 72h en la línea celular Hep3B (Figura 1C). Los datos se corroboraron en la línea celular Huh-7 (Figura 1D). Consistente con los resultados en la Figura 1A se muestran imágenes representativas del cultivo en monocapa transcurridas 72h de tratamiento con GDF11 de las células Hep3B NT (Figura 1E). Los resultados fueron corroborados con la línea celular Huh-7 (Figura 1F).

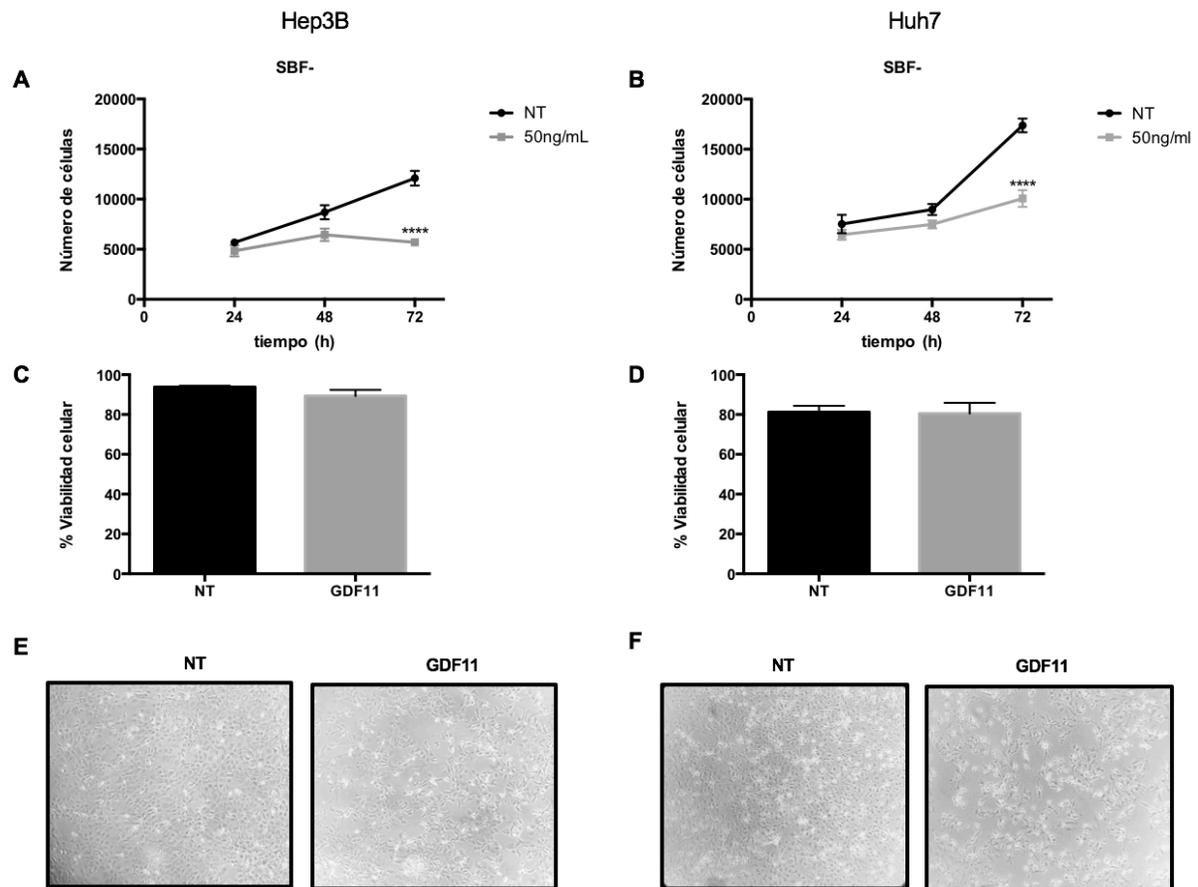


Figura 1. El GDF11 disminuye significativamente la proliferación celular sin afectar la viabilidad celular. Las células tratadas con 50 ng/ml GDF11 disminuyen su proliferación a las 72h en comparación con el grupo no tratado tanto en la línea celular Hep3B como en la Huh-7. **(A)** Proliferación celular en células Hep3B. **(B)** Proliferación celular en células Huh-7. **(C)** Viabilidad celular en células Hep3B. **(D)** Viabilidad celular en células Huh-7. **(E)** Cultivo en monocapa de células Hep3B aumento original 100X. **(F)** Cultivo en monocapa de células Huh-7 aumento original 100X. La proliferación celular se determinó empleando el kit de CCK-8, la viabilidad celular por azul tripano. En ausencia de suero (SBF-). Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EEM. **** $p < 0.0001$ vs NT.

Para investigar si el GDF11 tiene un efecto sobre la migración celular, se realizó un ensayo *in vitro* de herida-cicatrización en células Hep3B. El ensayo mostró que el cierre de la herida fue mucho menor en el grupo tratado con GDF11 en comparación con el NT (Figura 2A). Se corroboró el efecto del GDF11 sobre la migración celular en células Huh-7 (Figura 2B). Estos resultados indican que el tratamiento con GDF11 disminuye significativamente la proliferación celular y la migración en células HCC sin afectar la viabilidad celular, lo que sugiere que el GDF11 tiene un efecto antiproliferativo.

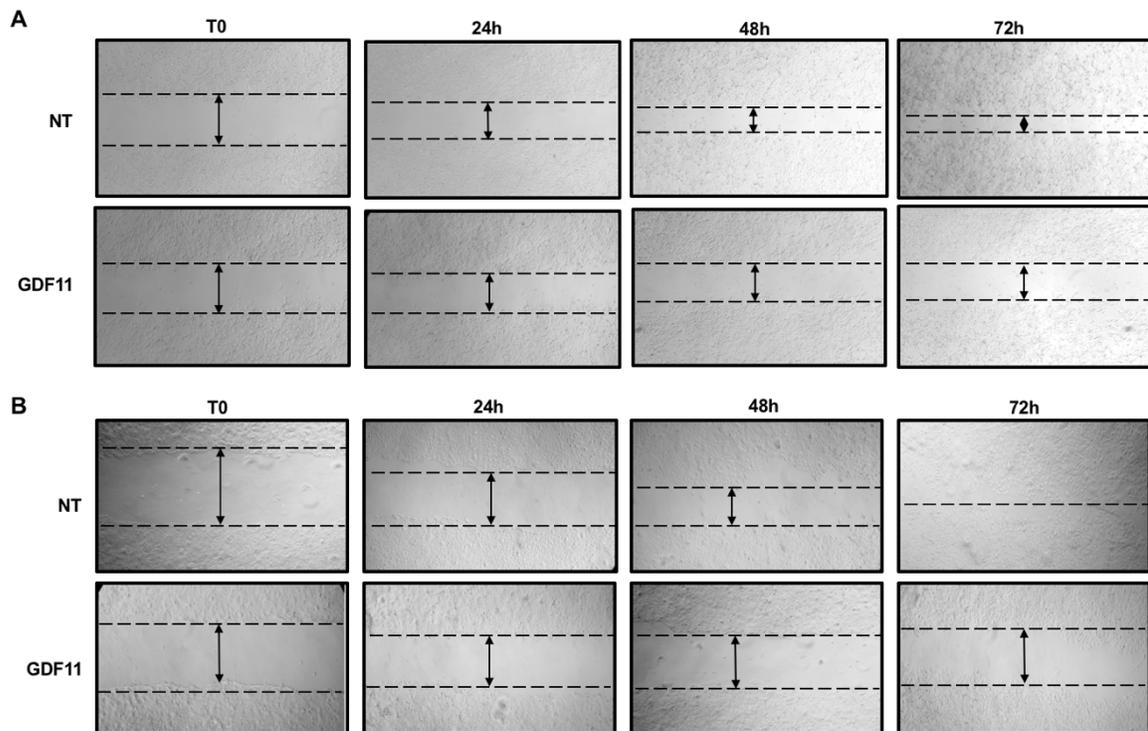


Figura 2. El GDF11 disminuye la migración en células de HCC. (A) Migración en células Hep3B aumento original 50X. **(B)** Migración en células Huh-7 aumento original 50X. La migración se determinó mediante el ensayo de herida-cicatrización.

Efecto del GDF11 en la funcionalidad mitocondrial y el contenido de lípidos neutros.

Para evaluar si el GDF11 puede inducir cambios en la funcionalidad mitocondrial se empleó el ensayo de MTT. Los resultados muestran que el GDF11 disminuye significativamente la funcionalidad mitocondrial en células Hep3B en comparación con el grupo NT (Figura 3A). El efecto se corroboró en la línea celular Huh-7 (Figura 3B).

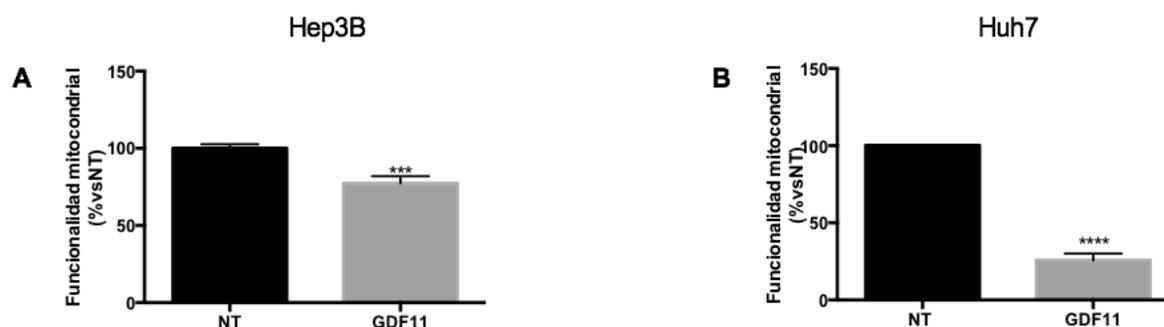


Figura 3. GDF11 disminuye la funcionalidad mitocondrial. La funcionalidad mitocondrial se determinó mediante el ensayo con MTT. **(A)** Células Hep3B tratadas o no con GDF11 durante 72h. **(B)** Células Huh-7 tratadas o no con GDF11 durante 72h. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EEM. *** $p \leq 0.0005$, **** $p \leq 0.0001$ vs. NT.

Debido a que el metabolismo de lípidos se encuentra alterado en las células con una alta proliferación se examinó el contenido de lípidos neutros en células Hep3B en presencia de GDF11 (Figura 4A), la adición de GDF11 cada 24 h durante 3 días disminuyó el contenido de lípidos neutros. Se corroboró el efecto en células Huh-7 (Figura 4B). Estos datos sugieren que el GDF11, al estar disminuyendo la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, está también afectando el metabolismo celular y la acumulación de lípidos neutros.

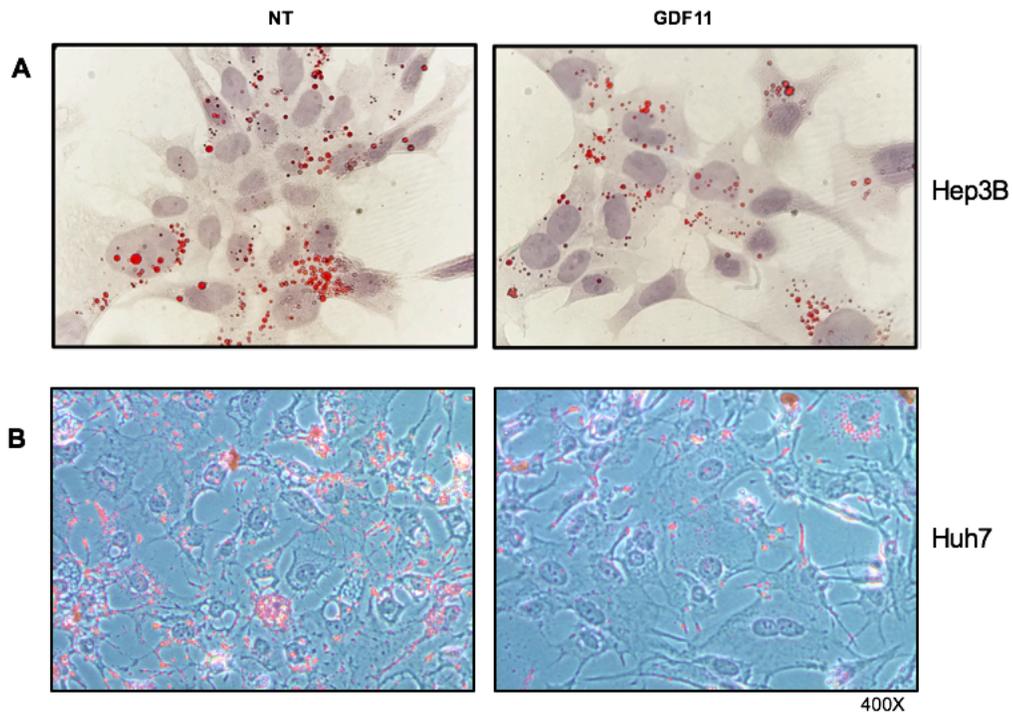


Figura 4. El tratamiento con GDF11 durante 72 h disminuye el contenido de lípidos en células Hep3B y Huh-7. La acumulación de lípidos neutros se monitoreó por medio de la tinción con aceite rojo O. **(A)** Tinción en células Hep3B . **(B)** Tinción en células Huh-7. Aumento original 400X. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

Inactivación de proteínas lipogénicas por GDF11

Para corroborar la disminución en el depósito de lípidos neutros, se evaluó el contenido de proteínas asociadas a la síntesis de lípidos. Evidencia reportada recientemente indica que mTOR se encuentra implicado en la regulación de la lipogénesis. Por ello se evaluó la activación y niveles totales de las proteínas mTOR, AMPK α , el regulador negativo del fenotipo lipogénico, y la forma inactiva del factor de transcripción p-SREBP1c. Las proteínas mTOR y SREBP1 disminuyen de una forma dependiente al tiempo en presencia de GDF11, para la AMPK α no se observaron cambios con

respecto al NT. La disminución progresiva de FASN, enzima limitante en la biosíntesis de ácidos grasos disminuye a las 72 h con GDF11 en células Hep3B (Figura 5A). La HMGCR primer enzima limitante en la vía del mevalonato, disminuye significativamente con el tratamiento de GDF11 respecto al control, lo mismo se observa para la MVD y la MVK (Figura 5A). Se evaluaron los niveles de las proteínas lipogénicas en la línea celular Huh-7 y se corroboró el efecto del GDF11 en la lipogénesis observado en células Hep3B (Figura 5B). Dado que el GDF11 disminuye el contenido de enzimas asociadas a la síntesis de colesterol se evaluó el contenido de colesterol total en células Hep3B, observándose que el tratamiento con GDF11 disminuye significativamente los niveles de colesterol total a las 72h de tratamiento con el factor en células en Hep3B (Figura 5C). Resultados equivalentes se observaron en la línea celular Huh-7 (Figura 5D).

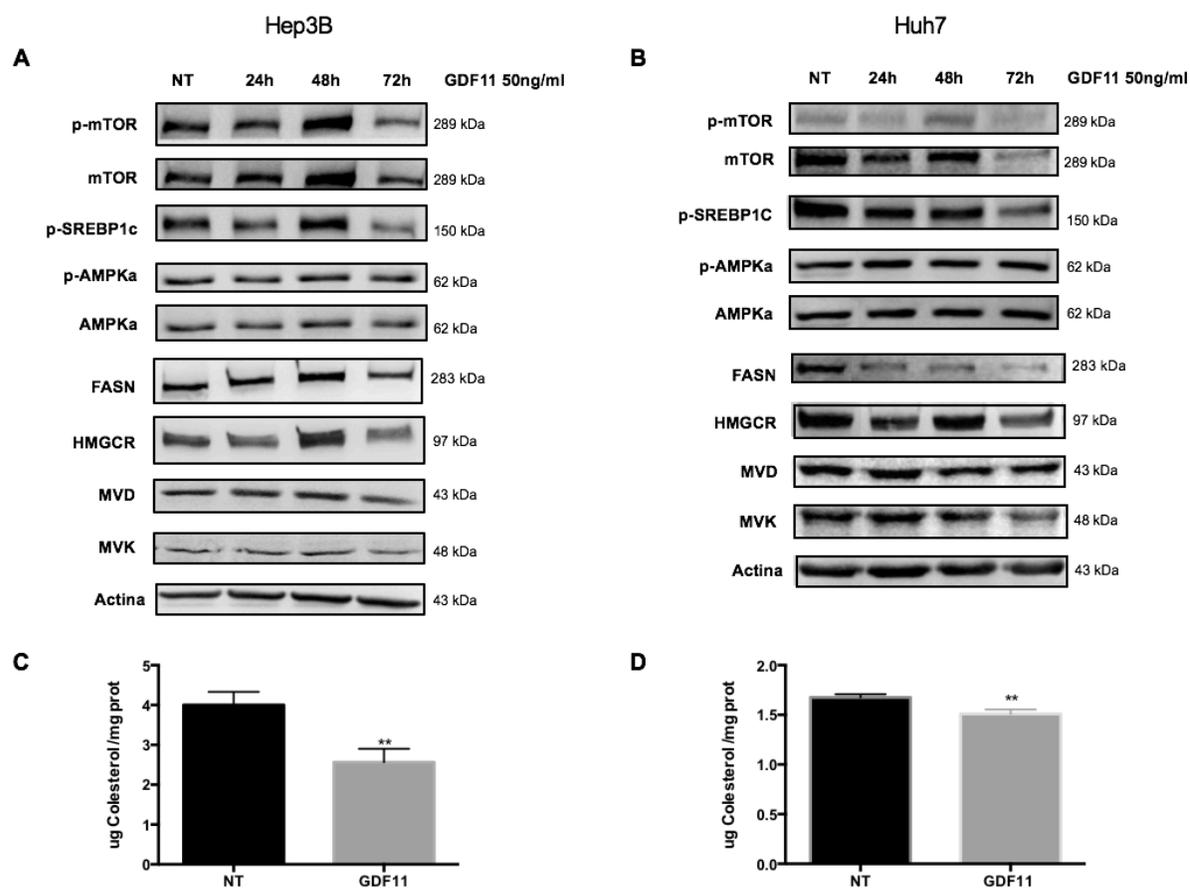


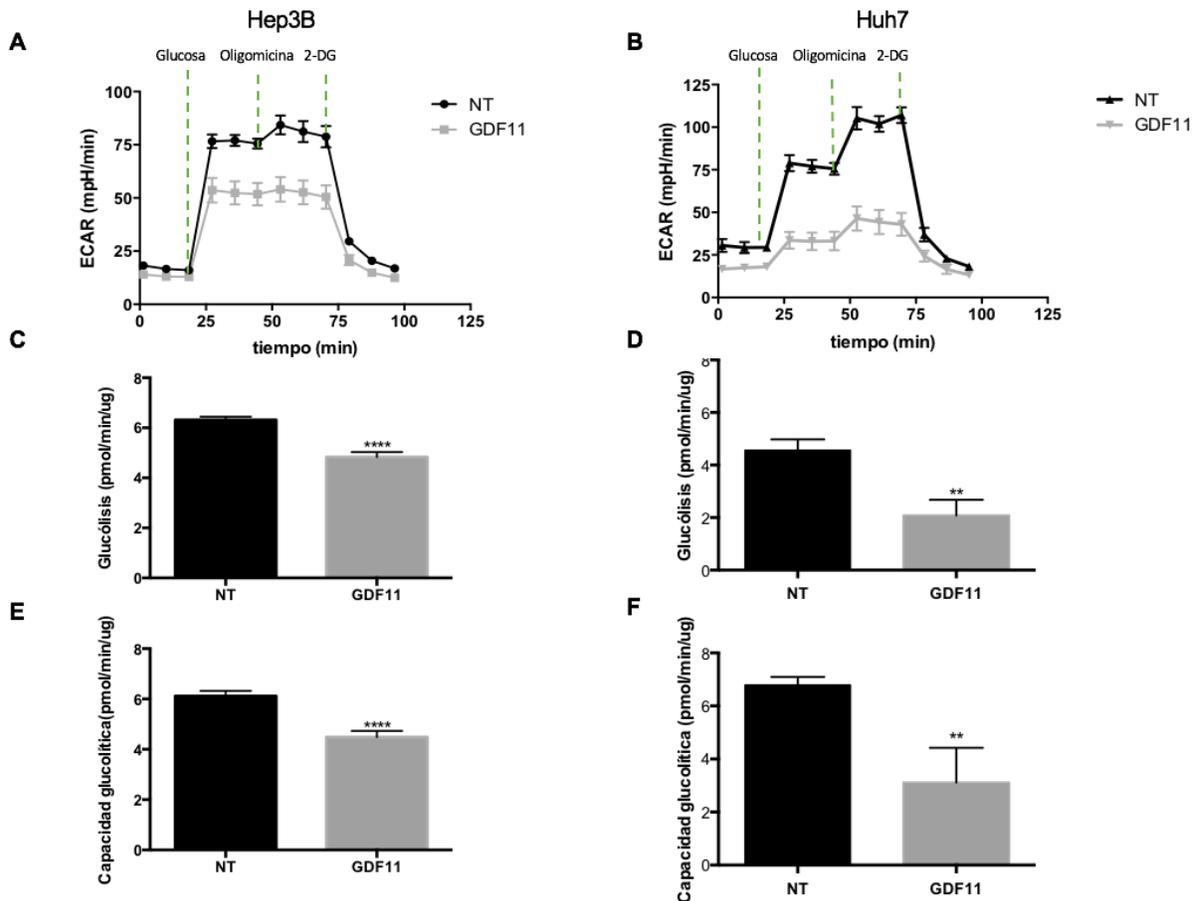
Figura 5. GDF11 induce cambios en la lipogénesis y en la síntesis de colesterol. (A)

Células Hep3B. **(B)** Células Huh-7. El tratamiento con GDF11 a las 72h disminuye significativamente el contenido de enzimas lipogénicas como FASN, p-mTOR, mTOR y el factor de transcripción p-SREBP1c. El mismo efecto se observa para las enzimas limitantes de la vía del mevalonato como HMGCR, MVD, MVK. **(C)** Contenido de colesterol en células Hep3B. **(D)** Contenido de colesterol en células Huh-7. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM. ** $p < 0.006$ vs. NT.

GDF11 disminuye la glucólisis y el consumo de oxígeno con alteraciones en la morfología de la red mitocondrial en HCC.

Para determinar el efecto del GDF11 en el metabolismo celular se usó el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 para evaluar el proceso de glucólisis. El GDF11

tuvo un impacto significativo en la disminución de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) (Figura 6A), glucólisis (Figura 6C) y capacidad glucolítica (Figura 6E) así como la disminución en los niveles de proteína del transportador de glucosa Glut2 (Figura 6G). Se corroboró el mismo efecto en células Huh-7 para ECAR (Figura 6B), glucólisis (Figura 6D) y capacidad glucolítica (Figura 6F). La adición de oligomicina (Figura 6A) impide la fosforilación oxidativa llevando a la célula a que use la glucólisis a su máxima capacidad. Las células tratadas con GDF11 parecen no responder a la oligomicina por lo que no hay un incremento en ECAR.



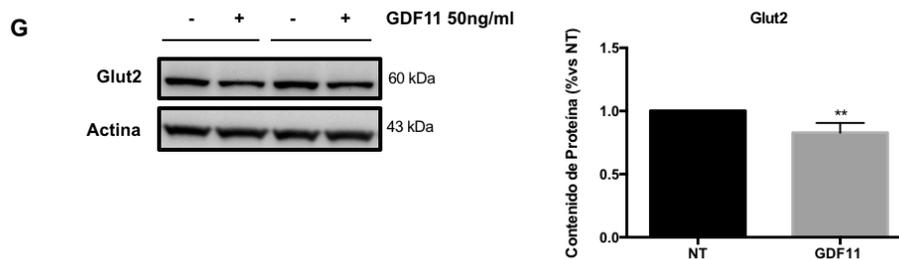


Figura 6. GDF11 induce cambios en Glucólisis. (A) Análisis en tiempo real de ECAR en células Hep3B tratadas con o sin GDF11. **(B)** Análisis en tiempo real de ECAR en células Huh-7 tratadas con o sin GDF11. **(C)** Determinación de glucólisis en células Hep3B tratadas GDF11. **(D)** Determinación de glucólisis en células Huh-7 tratadas GDF11. **(E)** Determinación de la capacidad glucolítica en células Hep3B tratadas GDF11. **(F)** Determinación de la capacidad glucolítica en células Huh-7 tratadas GDF11. **(G)** Contenido de Glut2 en células Hep3B tratadas con GDF11. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM ** $p < 0.0044$, **** $p < 0.0001$ vs. NT.

Lo siguiente fue determinar el papel de GDF11 en la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial (OCR) (Figura 7A y B). La respiración basal mitocondrial se estimó midiendo el OCR después de la resta del consumo de oxígeno residual en presencia de antimicina A y rotenona. Como se muestra, el GDF11 disminuye la respiración basal en células Hep3B (Figura 7A y C). Además, la respiración máxima, determinada por la adición del protonóforo FCCP para desacoplar la generación de ATP mitocondrial, disminuye con GDF11 en células Hep3B (Figura 7E) y Huh-7 (Figura 7H). Este efecto fue acompañado por la disminución en la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa en las células Hep3B y Huh-7 (Figura 7D y G, respectivamente). Estos resultados indican que GDF11 puede alterar la función mitocondrial al disminuir la actividad respiratoria de la mitocondria. De este modo, GDF11 restringe la generación de ATP en células Hep3B y Huh-7 por la alteraciones en la fosforilación oxidativa y la

glucólisis.

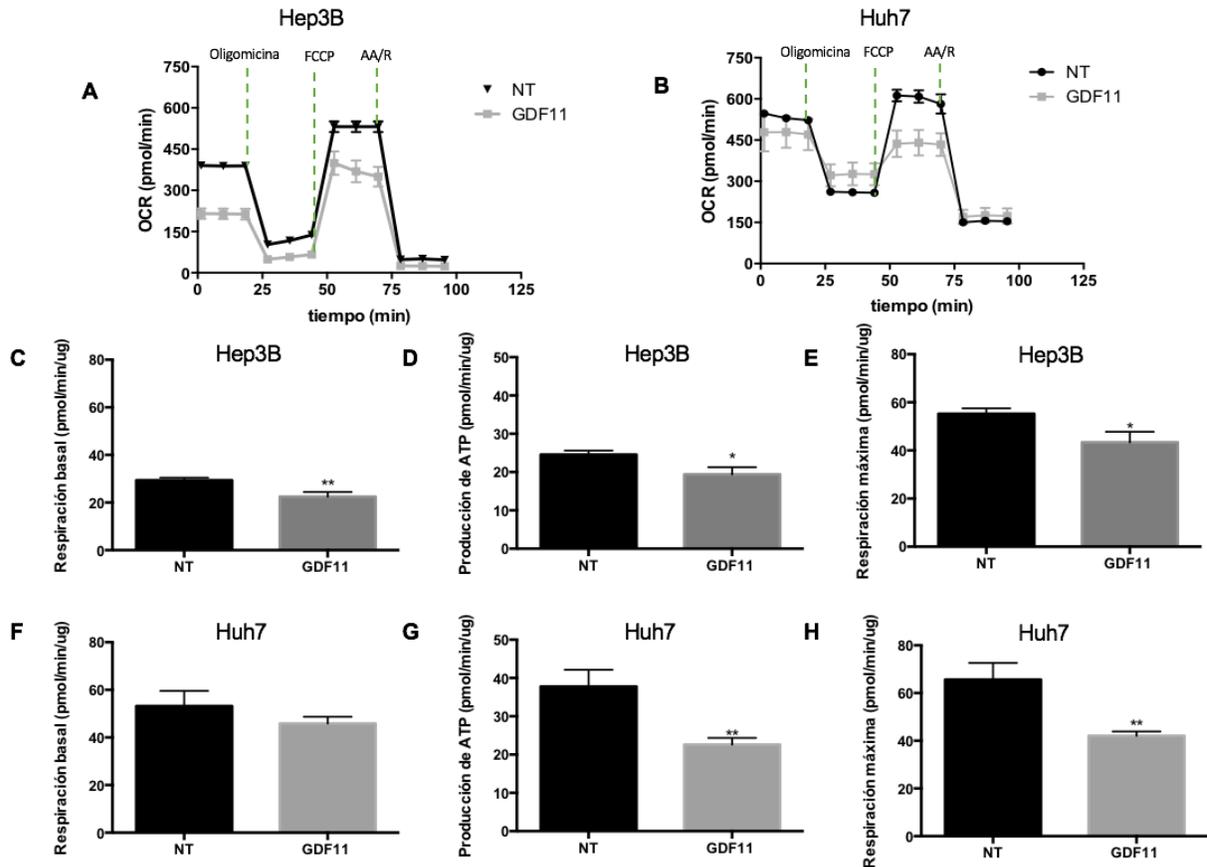
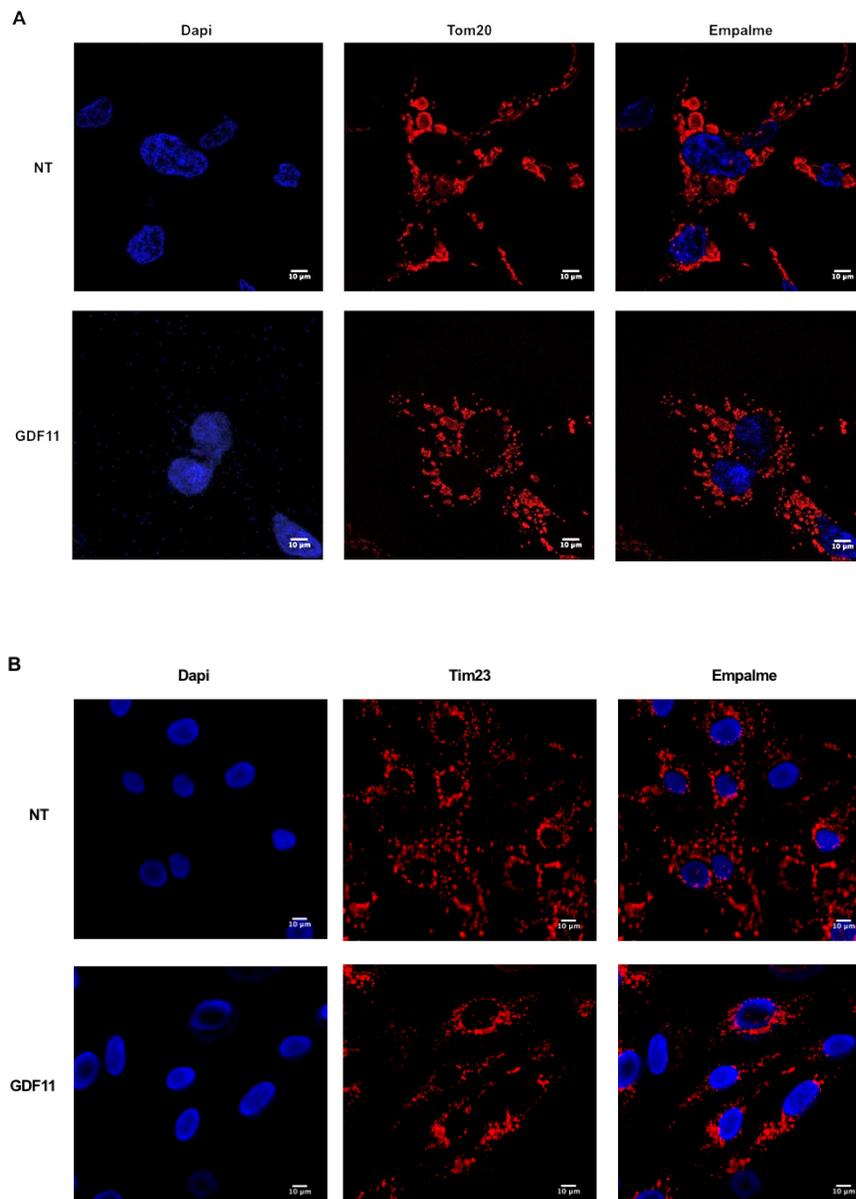


Figura 7. GDF11 disminuye el consumo de oxígeno mitocondrial. (A) Análisis en tiempo real de OCR en células Hep3B tratadas con o sin GDF11. (B) Análisis en tiempo real de OCR en células Huh-7 tratadas con o sin GDF11. Determinación de respiración basal (C), producción de ATP (D) y respiración máxima (E) en células Hep3B tratadas o no con GDF11. Determinación de respiración basal (F), producción de ATP (G) y respiración máxima (H) en células Huh-7 tratadas o no con GDF11. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm EEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.007$ vs. NT.

Para determinar si los cambios en el metabolismo eran dependientes o independientes de la morfología de la red mitocondrial se marcaron las mitocondrias con Tom20/Dapi en células Hep3B (Figura 8A), Tim23/Dapi para Huh-7 (Figura 8B) y se examinaron

por microscopía confocal y de epifluorescencia respectivamente. La red mitocondrial se vio alterada con el tratamiento de GDF11 lo cual se vio reflejado por la presencia de mitocondrias más pequeñas y redondeadas 72 h después del tratamiento en Hep3B (Figura 8C). Se corroboró el impacto del tratamiento con GDF11 en la red mitocondrial en células Huh-7 (Figura 8B).



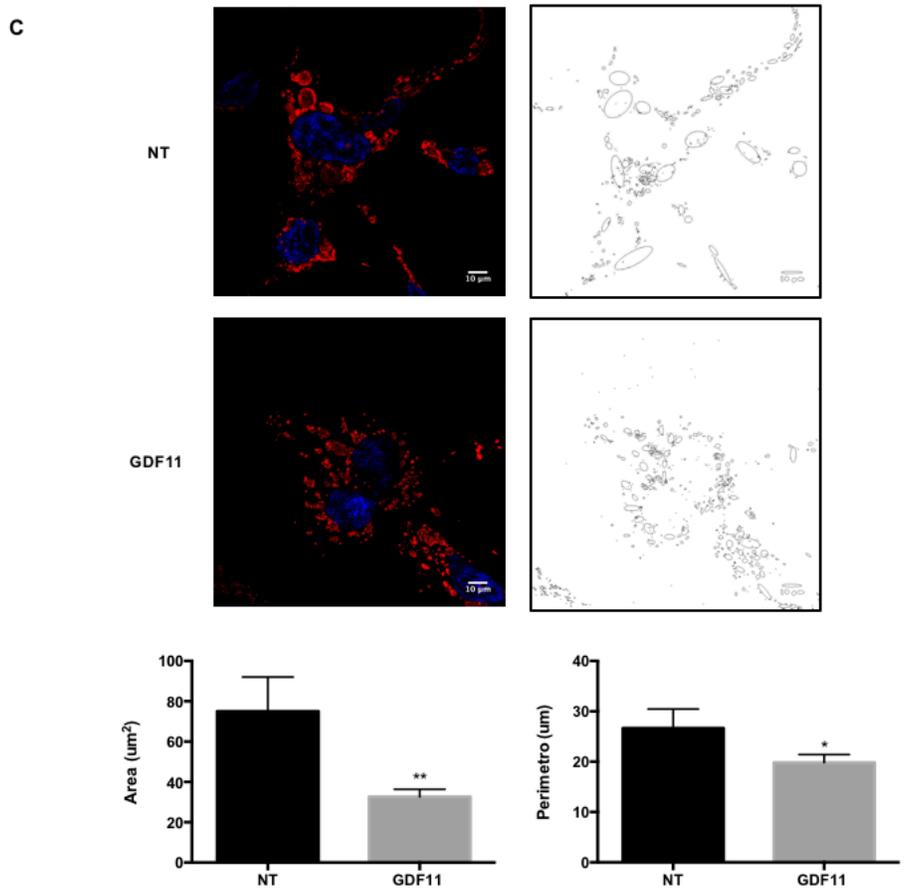


Figura 8. GDF11 induce cambios en la red mitocondrial en HCC. El tratamiento con GDF11 altera la red mitocondrial respecto al NT. Las mitocondrias fueron marcadas con **(A)** Tom20 en Hep3B y **(B)** Tim23 para Huh-7. **(C)** Análisis morfométrico de la red mitocondrial, de células Hep3B, examinado por microscopía confocal, el área, perímetro, redondez (NT: 0.7705 ± 0.009723 N=705, GDF11: 0.7929 ± 0.007886 N=957, $*p \leq 0.05$) y relación de aspecto (NT: 1.525 ± 0.02828 N=705, GDF11: 1.446 ± 0.02086 N=957, $*p \leq 0.05$) se determinaron con el software ImageJ. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EEM. $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.002$ vs. NT.

Efecto del GDF11 en la expresión diferencial de genes en HCC

Con la finalidad de corroborar los efectos observados en ambas líneas celulares, se realizó el análisis de secuenciación masiva. Se seleccionaron los genes expresados diferencialmente respecto al grupo NT, que presentaran cambios, 1.5 veces respecto al control, al alza y a la baja con una $p= 0.001$. Este análisis arrojó 139 genes expresados de manera diferencial, de los cuales 107 se encuentran sobre-expresados y 32 genes reprimidos (Figura 9A). Para determinar a qué proceso se encontraban asociados los genes, se desarrolló el análisis ontológico asociado a procesos biológicos, indicando que los procesos metabólicos son uno de los principales que se altera con el tratamiento con GDF11 (Figura 9B). El mapa de calor o “heatmap” es la representación natural de las matrices de expresión, ya que emula las fluorescencias estimuladas para detectar el nivel de transcripción. Un heatmap es una representación 2D de la matriz, donde las filas representan genes y las columnas condiciones. Cada nivel de expresión se representa como un cuadrado de color en la posición correspondiente a su gen y su condición. En la Figura 9C se observa la agrupación de los datos, las células que no se trataron con GDF11 se encuentran en el mismo grupo y se presentan con el color verde. Las células tratadas con GDF11 se representan en el dendograma con el color rojo, estos cambios tan separados en el patrón de color indican que, la expresión de genes entre las células NT y tratadas con GDF11 son claramente diferentes. Se realizó un segundo análisis ontológico, respecto a los genes asociados a la síntesis de colesterol, indicando que las células tratadas con GDF11 presentan cambios importantes en el metabolismo de este lípido (Figura 9D). Lo que corrobora los datos obtenidos en la Figura 5.

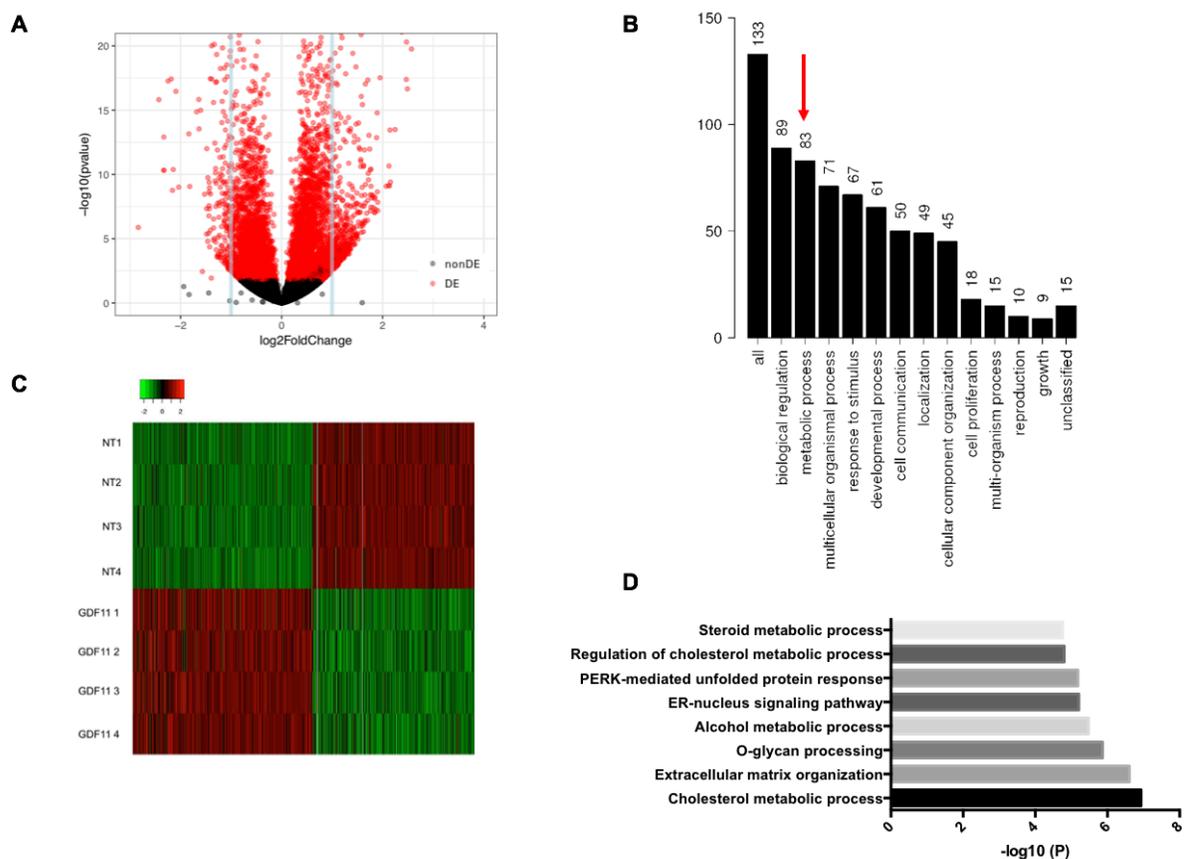


Figura 9. GDF11 induce la expresión diferencial de genes en células Huh7. El tratamiento con GDF11 tiene un efecto en la expresión génica respecto al NT. **(A)** Gráfica de volcán, los genes que están regulados hacia arriba y hacia abajo aparecen en forma simétrica respecto de la recta vertical ($M = 0$). Los genes con diferencia estadísticamente significativa y “fold change” tienden a encontrarse en los extremos derecho e izquierdo superiores del gráfico. **(B)** Análisis ontológico asociado a procesos biológicos. **(C)** Matriz de expresión génica en células tratadas o no con GDF11. **(D)** Análisis ontológico de expresión diferencial asociado al metabolismo del colesterol. Las imágenes representan de 4 experimentos independientes. Análisis de enriquecimiento, fold change= 1.5, $p=0.001$.

Discusión

Es bien sabido que las células cancerosas presentan una proliferación celular descontrolada y para ello requieren generar eficientemente energía y componentes de su biomasa, con la finalidad de expandirse y diseminarse (Boroughs & DeBerardinis, 2015). Existen pocos reportes de GDF11 y cáncer (Bajikar et al., 2017; Yokoe et al., 2007), sin embargo, Williams et al., en el 2013 reportó que el GDF11 tiene un efecto supresor en cuanto a proliferación y migración en células que mantienen características poco diferenciadas.

En el presente trabajo se investigó el papel de GDF11 en células provenientes de un HCC, los resultados indican que el tratamiento con GDF11 disminuye la proliferación y migración celular a las 72h de tratamiento con el factor cada 24 h, sin afectar la viabilidad celular en células Hep3B (Figura 1 y 2), corroborándose el mismo efecto en la línea celular Huh-7, es decir, ejerce un efecto antiproliferativo.

Se ha reportado la expresión de GDF11 en biopsias de pacientes con HCC, indicando que los niveles de expresión de GDF11 son significativamente menores en tejido tumoral de hígado en comparación con el tejido normal (Y. H. Zhang et al., 2018). Los niveles de expresión y contenido de proteína de GDF11 son significativamente menores en las líneas celulares provenientes de cáncer de hígado en comparación con las líneas celulares provenientes de hígado normal (Y. H. Zhang et al., 2018).

Se ha reportado que en HCC con un fenotipo agresivo, los niveles de proteínas lipogénicas son altos (Menendez & Lupu, 2007; Swinnen et al., 2006). Calvisi et. al

(2011) reportan un incremento en la lipogénesis *de novo* en muestras de pacientes que promueve el desarrollo del HCC y se correlaciona con la agresividad del tumor. Por esta razón se determinó el contenido de lípidos neutros en la línea celular Hep3B. Los datos sugieren que el GDF11 disminuye el contenido de lípidos neutros, así como el contenido en proteínas asociadas a la lipogénesis p-mTOR (Ser2448), mTOR, p-SREBP1c (Ser372), FASN, HMGCR, MVD y MVK a las 72h de tratamiento. También se evaluó el contenido de colesterol total, el cual disminuye significativamente en las células tratadas con GDF11 en comparación con el grupo control. La regulación a la baja en estas proteínas sugiere, que, la disminución en la lipogénesis tiene un impacto en la síntesis de lípidos y precursores lipídicos asociados con una proliferación elevada (Kuhajda, 2000).

Es bien conocido y múltiples reportes soportan que las células tumorales presentan un metabolismo energético mitocondrial ineficiente, utilizan una glucólisis aerobia, también conocida como efecto Warburg (Warburg, 1956).

La glucólisis y la fosforilación oxidativa son las principales vías para la producción de energía en las células. La glucosa en la célula es convertida a piruvato, el cual puede seguir dos rutas, una vía aerobia y producir lactato en el citoplasma o bien puede sufrir una descarboxilación oxidativa y producir acetil-CoA y CO₂. La acetil-CoA después se incorporará al ciclo de los ácidos tricarbónicos o bien a otras vías metabólicas. La conversión de glucosa a lactato resulta en la acidificación del medio extracelular debido a la producción de protones (Lunt & Vander Heiden, 2011).

Un análisis en tiempo real empleando la tecnología del Seahorse brindó información sobre los parámetros de flujo glucolítico, la adición de glucosa permite que la célula la

pueda catabolizar a través del proceso de glucólisis causando un incremento rápido en ECAR (Figura 6A, grupo NT). Las células Hep3B tratadas con GDF11 presentan una respuesta inducida por la glucosa significativamente menor respecto al NT. Se corroboró el efecto del GDF11 en células Huh-7 (Figura 6B) mostrando resultados semejantes. La adición de oligomicina inhibe la producción de ATP mitocondrial dirigiendo la producción de energía hacia glucólisis incrementando en ECAR (Figura 6 A y B, grupo NT) llevando a la célula a usar la glucólisis a su máxima capacidad. Las células tratadas con GDF11 presentaron un mínimo incremento en ECAR después de la adición de oligomicina (Figura 6 A y B, grupo GDF11). Estos datos muestran que las células tratadas con GDF11 llevan el proceso de glucólisis a su máxima capacidad después de la adición de glucosa y que tienen una capacidad limitada para responder al incremento en la demanda energética, lo cual implica que la disminución en la glucólisis se asocia con un fenotipo menos tumoral. Finalmente, la adición de 2-Deoxy-D-Glucosa (2-DG), un análogo de la glucosa, inhibe la glucólisis por unión competitiva a la glucosa hexocinasa, la primer enzima en la vía de la glucólisis, lo cual resulta en la disminución en ECAR, confirmando que el ECAR producido en el experimento es debido a la glucólisis.

Adicional a la dependencia de la glucólisis, las células de cáncer mantienen tasas elevadas de la fosforilación oxidativa permitiendo que las células sobrevivan y sigan generando ATP (Hsu & Sabatini, 2008). La mitocondria además de tener un papel importante en la producción de energía, se encarga de coordinar los procesos anabólicos y catabólicos de la célula, permitiendo un balance en las demandas energéticas en respuesta a estímulos internos y externos. Cambios en la actividad

mitocondrial es una característica en varias enfermedades, incluyendo al cáncer (Mello et al., 2016). Por tal motivo se analizaron los parámetros asociados a la función mitocondrial en las células Hep3B y Huh-7, a través de la medición directa del OCR. Se emplearon moduladores de la respiración que tienen como blanco la cadena de transporte de electrones (ETC). La oligomicina es un inhibidor de la ATP sintasa (complejo V), por lo que induce la disminución del OCR y representa la porción de la respiración basal que fue usada para la producción de ATP. Este dato sugiere que las necesidades energéticas de las células que fueron tratadas con GDF11 son significativamente menores respecto al control, se observó el mismo comportamiento en células Hep3B (Figura 7D) y Huh-7 (Figura 7G). El FCCP es un desacoplante que colapsa el gradiente de protones y altera el potencial de membrana de la mitocondria. Como resultado, el flujo de electrones a través de la ETC no se inhibe y el oxígeno es consumido al máximo por el complejo IV. El FCCP mimetiza la demanda energética fisiológica al estimular que la cadena respiratoria trabaje a su máxima capacidad, causando la rápida oxidación de sustratos (azúcares, lípidos). Como muestran los resultados, la respiración máxima que pueden llevar a cabo las células que fueron tratadas con GDF11 es significativamente menor, en comparación con las células NT. Se observaron resultados similares para la línea celular Hep3B (Figura 7E) y Huh-7 (Figura 7H). Estos datos indican que el GDF11 afecta la función mitocondrial induciendo que las células tratadas con este factor tengan necesidades energéticas menores, lo cual se asocia a la disminución en la producción de ATP y en su capacidad de estimular la cadena respiratoria.

La mitocondria es el conector central del metabolismo y su remodelación está mecánicamente regulada por cambios en la demanda de energía y otros tipos de estrés celular (Detmer & Chan, 2007). La participación de la mitocondria resalta por los cambios dramáticos de su morfología en respuesta a sus necesidades metabólicas (Youle & van der Bliek, 2012). Mientras cambios ultraestructurales han sido observados en respuesta de alteraciones en el metabolismo oxidativo, los cambios en la forma de las mitocondrias pueden tener también efectos dramáticos en el metabolismo celular (Hackenbrock, 1966). Para determinar si el GDF11 se encontraba modulando la morfología mitocondrial, se realizó la tinción con Tom20 (Hep3B) y Tim23 (Huh-7), se analizaron las muestras por microscopia confocal y se determinó el área, perímetro, redondez y la relación de aspecto de las mitocondrias como se ha reportado previamente (Baulies et al., 2018; Valente et al., 2017; Westrate et al., 2014). El área, perímetro y relación del aspecto permite tener información acerca de la longitud mitocondrial. Las células tratadas con GDF11, presentan una longitud mitocondrial significativamente menor respecto al grupo control, encontrando que la redondez está significativamente incrementada en las células tratadas con GDF11 respecto al NT. Análisis de los datos sugieren que el tratamiento con GDF11 a las 72h provoca una disminución en el tamaño de las mitocondrias además de presentar un aspecto más redondeado.

Recientemente, los estudios del genoma del cáncer sugieren que, distintos tipos de alteraciones en diferentes genes tienden a acumularse en vías centrales para el control del crecimiento celular y la determinación del destino celular (Cerami et al., 2010). La tecnología RNA-seq tiene algunas ventajas sobre los microarreglos de cDNA, tales

como el alto nivel de reproducibilidad de datos a través de carriles y celdas de flujo, lo que reduce el número de réplicas técnicas para los experimentos. Además, RNA-seq permite identificar y cuantificar la expresión de isoformas y transcripciones desconocidas (Agarwal et al., 2010). La tecnología RNA-Seq es muy útil para el análisis de expresión diferencial que involucra algunas condiciones específicas (Z. H. Zhang et al., 2014). Primero, las muestras de ARN se fragmentan en pequeñas secuencias de ADN complementarias (cDNA) y luego se secuencian desde una plataforma de alto rendimiento. En segundo lugar, las pequeñas secuencias generadas se asignan a un genoma o transcriptoma. En tercer lugar, se estiman los niveles de expresión para cada gen o isoforma. En cuarto lugar, los datos mapeados están normalizados y, utilizando métodos estadísticos y de aprendizaje automático, se identifican los genes expresados diferencialmente (DEG). Finalmente, la relevancia de los datos producidos se evalúa desde un contexto biológico (Li et al., 2015). El contexto en el que se manejó la secuenciación masiva fue, en vía de determinar el panorama global del efecto que induce el GDF11 en células Huh7 (Figura 9). Entre los principales procesos que se encontraron alterados se asociaron a cambios en el metabolismo (Figura 9 B). Lo que soporta los resultados obtenidos en glucólisis (Figura 6) y respiración celular (Figura 7) en ambas líneas celulares. De acuerdo a la importancia que se le ha otorgado, recientemente, al proceso de lipogénesis aberrante se analizaron genes como *FASN* y *HMGCS1* indicando que se encontraban significativamente disminuidos en las células tratadas con GDF11, lo que se asocia con la disminución en el contenido proteico de estas enzimas y el contenido de colesterol (Figura 5).

La disminución en la proliferación y migración celular en células derivadas de HCC, se encuentra estrechamente asociado a la disminución en glucólisis y capacidad glucolítica de las células tratadas con GDF11. A su vez, cambios en el consumo de oxígeno y producción de ATP indican que las células que fueron tratadas con este factor presentan perfiles metabólicos distintos, lo que se asocia en la disminución energética y limitación para generar componentes de biomasa. Estos cambios metabólicos fueron acompañados de la disminución en proteínas asociadas en la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Por lo que los datos sugieren que el GDF11 se encuentra limitando las vías de obtención de energía en las células cancerosas disminuyendo sus características tumorales.

Conclusión

La respuesta en la proliferación y migración observada por GDF11 en células de HCC indica estar asociada con cambios metabólicos principalmente en glucólisis, funcionalidad mitocondrial, lipogénesis y síntesis de colesterol. Estos resultados sugieren que, los cambios inducidos por el GDF11 en el perfil metabólico de las células de HCC se asocian con el efecto antitumoral reflejado en la pérdida de la capacidad proliferativa en células de carcinoma hepatocelular.

Bibliografia

- Agarwal, A., Koppstein, D., Rozowsky, J., et al. (2010). Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *BMC Genomics*, *11*, 383.
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., et al. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, *63*(7), 895-902.
- Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A. H., et al. (2002). Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res*, *43*(8), 1220-1235.
- Bajikar, S. S., Wang, C. C., Borten, M. A., et al. (2017). Tumor-Suppressor Inactivation of GDF11 Occurs by Precursor Sequestration in Triple-Negative Breast Cancer. *Dev Cell*, *43*(4), 418-435 e413.
- Baulies, A., Montero, J., Matias, N., et al. (2018). The 2-oxoglutarate carrier promotes liver cancer by sustaining mitochondrial GSH despite cholesterol loading. *Redox Biol*, *14*, 164-177.
- Bensinger, S. J., Bradley, M. N., Joseph, S. B., et al. (2008). LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell*, *134*(1), 97-111.
- Borena, W., Strohmaier, S., Lukanova, A., et al. (2012). Metabolic risk factors and primary liver cancer in a prospective study of 578,700 adults. *Int J Cancer*, *131*(1), 193-200.
- Boroughs, L. K., & DeBerardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*, *17*(4), 351-359.
- Bressac, B., Galvin, K. M., Liang, T. J., et al. (1990). Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(5), 1973-1977.
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, *11*(2), 85-95.
- Calvisi, D. F., Wang, C., Ho, C., et al. (2011). Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *140*(3), 1071-1083.
- Cerami, E., Demir, E., Schultz, N., et al. (2010). Automated network analysis identifies core pathways in glioblastoma. *PLoS One*, *5*(2), e8918.
- Che, L., Pilo, M. G., Cigliano, A., et al. (2017). Oncogene dependent requirement of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. *Cell Cycle*, *16*(6), 499-507.
- Chen, H., Chomyn, A., & Chan, D. C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, *280*(28), 26185-26192.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., et al. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, *160*(2), 189-200.
- Clendening, J. W., Pandya, A., Boutros, P. C., et al. (2010). Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(34), 15051-15056.
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., et al. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*, *18*(2), 153-161.

- Dang, C. V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev*, 26(9), 877-890.
- Daskalow, K., Pfander, D., Weichert, W., et al. (2009). Distinct temporospatial expression patterns of glycolysis-related proteins in human hepatocellular carcinoma. *Histochem Cell Biol*, 132(1), 21-31.
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11), 870-879.
- Egerman, M. A., Cadena, S. M., Gilbert, J. A., et al. (2015). GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab*, 22(1), 164-174.
- Enriquez-Cortina, C., Bello-Monroy, O., Rosales-Cruz, P., et al. (2017). Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, 8(61), 104136-104148.
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257), 425-430.
- Hackenbrock, C. R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol*, 30(2), 269-297.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 25(18), 1895-1908.
- Hardie, D. G. (2015). Molecular Pathways: Is AMPK a Friend or a Foe in Cancer? *Clin Cancer Res*, 21(17), 3836-3840.
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4), 251-262.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18(16), 1926-1945.
- Hernandez, I., Dominguez-Perez, M., Bucio, L., et al. (2015). Free fatty acids enhance the oxidative damage induced by ethanol metabolism in an in vitro model. *Food Chem Toxicol*, 76, 109-115.
- Hinken, A. C., Powers, J. M., Luo, G., et al. (2016). Lack of evidence for GDF11 as a rejuvenator of aged skeletal muscle satellite cells. *Aging Cell*, 15(3), 582-584.
- Horton, J. D. (2002). Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans*, 30(Pt 6), 1091-1095.
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703-707.
- Huang, Q., Zhan, L., Cao, H., et al. (2016). Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NFKB and TP53 pathways. *Autophagy*, 12(6), 999-1014.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., et al. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2), 69-90.

- Jiang, C., Zhou, B., Fan, K., et al. (2007). A sequential treatment of depsipeptide followed by 5-azacytidine enhances Gadd45beta expression in hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Res*, 27(6B), 3783-3789.
- Katsimpardi, L., Litterman, N. K., Schein, P. A., et al. (2014). Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science*, 344(6184), 630-634.
- Kuhajda, F. P. (2000). Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*, 16(3), 202-208.
- Li, P., Piao, Y., Shon, H. S., et al. (2015). Comparing the normalization methods for the differential analysis of Illumina high-throughput RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, 16, 347.
- Lo Sasso, G., Celli, N., Caboni, M., et al. (2010). Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes. *Hepatology*, 51(4), 1334-1344.
- Loffredo, F. S., Steinhauser, M. L., Jay, S. M., et al. (2013). Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell*, 153(4), 828-839.
- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 441-464.
- Macheda, M. L., Rogers, S., & Best, J. D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*, 202(3), 654-662.
- Mello, T., Materozzi, M., & Galli, A. (2016). PPARs and Mitochondrial Metabolism: From NAFLD to HCC. *PPAR Res*, 2016, 7403230.
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(10), 763-777.
- Mersch-Sundermann, V., Knasmuller, S., Wu, X. J., et al. (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 198(1-3), 329-340.
- Nakashima, M., Toyono, T., Akamine, A., et al. (1999). Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 80(2), 185-189.
- Nuno-Lambarri, N., Dominguez-Perez, M., Baulies-Domenech, A., et al. (2016). Liver Cholesterol Overload Aggravates Obstructive Cholestasis by Inducing Oxidative Stress and Premature Death in Mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 9895176.
- Paudyal, B., Paudyal, P., Oriuchi, N., et al. (2008). Clinical implication of glucose transport and metabolism evaluated by 18F-FDG PET in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 33(5), 1047-1054.
- Praefcke, G. J., & McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 133-147.
- Qiu, G. H., Xie, X., Xu, F., et al. (2015). Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*, 67(1), 1-12.

- Rodgers, B. D., & Eldridge, J. A. (2015). Reduced Circulating GDF11 Is Unlikely Responsible for Age-Dependent Changes in Mouse Heart, Muscle, and Brain. *Endocrinology*, *156*(11), 3885-3888.
- Rohrig, F., & Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer*, *16*(11), 732-749.
- Sinha, M., Jang, Y. C., Oh, J., et al. (2014). Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science*, *344*(6184), 649-652.
- Slany, A., Haudek, V. J., Zwickl, H., et al. (2010). Cell characterization by proteome profiling applied to primary hepatocytes and hepatocyte cell lines Hep-G2 and Hep-3B. *J Proteome Res*, *9*(1), 6-21.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L., et al. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, *12*(8), 2245-2256.
- Smith, S. C., Zhang, X., Zhang, X., et al. (2015). GDF11 does not rescue aging-related pathological hypertrophy. *Circ Res*, *117*(11), 926-932.
- Suen, D. F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev*, *22*(12), 1577-1590.
- Swinnen, J. V., Brusselmans, K., & Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *9*(4), 358-365.
- Szablewski, L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta*, *1835*(2), 164-169.
- Tahmasebi Birgani, M., & Carloni, V. (2017). Tumor Microenvironment, a Paradigm in Hepatocellular Carcinoma Progression and Therapy. *Int J Mol Sci*, *18*(2).
- Tsuchida, K., Nakatani, M., Uezumi, A., et al. (2008). Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr J*, *55*(1), 11-21.
- Twig, G., Hyde, B., & Shirihai, O. S. (2008). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta*, *1777*(9), 1092-1097.
- Valente, A. J., Maddalena, L. A., Robb, E. L., et al. (2017). A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta Histochem*, *119*(3), 315-326.
- Wai, T., & Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*, *27*(2), 105-117.
- Walker, R. G., Czepnik, M., Goebel, E. J., et al. (2017). Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11. *BMC Biol*, *15*(1), 19.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, *124*(3215), 269-270.
- Westrate, L. M., Drocco, J. A., Martin, K. R., et al. (2014). Mitochondrial morphological features are associated with fission and fusion events. *PLoS One*, *9*(4), e95265.
- Williams, G., Zentar, M. P., Gajendra, S., et al. (2013). Transcriptional basis for the inhibition of neural stem cell proliferation and migration by the TGFbeta-family member GDF11. *PLoS One*, *8*(11), e78478.
- Yokoe, T., Ohmachi, T., Inoue, H., et al. (2007). Clinical significance of growth differentiation factor 11 in colorectal cancer. *Int J Oncol*, *31*(5), 1097-1101.

- Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065.
- Zhan, L., Cao, H., Wang, G., et al. (2016). Drp1-mediated mitochondrial fission promotes cell proliferation through crosstalk of p53 and NF-kappaB pathways in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(40), 65001-65011.
- Zhang, Y. H., Cheng, F., Du, X. T., et al. (2016). GDF11/BMP11 activates both smad1/5/8 and smad2/3 signals but shows no significant effect on proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells. *Oncotarget*, 7(11), 12063-12074.
- Zhang, Y. H., Pan, L. H., Pang, Y., et al. (2018). GDF11/BMP11 as a novel tumor marker for liver cancer. *Exp Ther Med*, 15(4), 3495-3500.
- Zhang, Z. H., Jhaveri, D. J., Marshall, V. M., et al. (2014). A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data. *PLoS One*, 9(8), e103207.