

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EL EFECTO DE 3-HIDROXIBAKUCHIOL Y SUS  
DERIVADOS SOBRE EL SISTEMA DE FOSFORILACIÓN  
OXIDATIVA: ¿POTENCIALES AGENTES  
ANTINEOPLÁSICOS?**

TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE

PARA OPTAR AL GRADO DE

**DOCTOR EN FARMACOLOGÍA**

POR

**Fabián Esteban Jaña Prado**

Directores de Tesis

**Prof. Dr. Jorge Ferreira Parker**

**Prof. Dra. Francesca Faini Di Castri**

2012

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioenergética y Cáncer, dirigido por el Dr. Jorge Ferreira, el cual pertenece al Centro Avanzado para la Formación e Investigación en el Diseño de Estrategias Inmunológicas y Farmacológicas para el Control de Agresiones Parasitarias y Neoplásicas, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El aislamiento químico se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales, dirigido por la Dra. Francesca Faini, el cual pertenece al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT 21080116 (FJ)
- Proyecto FONDECYT 1090075 (JF)
- Proyecto Anillos ACT 112 (JF)

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis, o las metodologías desarrolladas para su realización, han sido publicadas y presentadas en diversos congresos nacionales e internacionales. Las presentaciones y publicaciones se citan a continuación.

- Tumor cell death induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain: Effect of 3-hydroxybakuchiol. Jaña F, Faini F, Lapier M, Jara J, Pavani M, Kemmerling U, Morello A, Mara JD, Ferreira J. *Manuscrito enviado a Molecular Cancer Therapeutics, actualmente en revisión.*

### **Congresos Nacionales**

-“Citotoxicidad de bakuchiol y 3-hidroxibakuchiol sobre el adenocarcinoma mamario de ratón TA3 y su sublínea multirresistente TA3-MTX-R” **Jaña, F.**, Faini, F., Pavani, M., Morello, A., Maya, J.D., Kemmerling, U., y Ferreira, J. XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología. Coquimbo, Chile, 2008.-“3-hidroxibakuchiol aislado de *Psoralea glandulosa* (culén) inhibe la respiración e induce citotoxicidad en células tumorales”. **Jaña F.**, Faini F., Pavani M., Kemmerling U., Morello A., Maya J.D., y Ferreira J. XXXII Congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Valdivia, Chile, 2010.

-“Muerte celular inducida por la inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial de células tumorales: Efecto de 3-hidroxibakuchiol”. **Jaña F.**, Faini F., Jara J., Pavani M., Kemmerling U., Morello A., Maya J.D., y Ferreira J. Congreso Ciencia Joven 2011, Santiago, Chile, 2011.

-“Resveratrol and Nordihidroguayaretic Acid synergically block cell viability of human HL60 and U937 leukemic cell lines”. Parada D., Ojeda M.L., **Jaña F.**, Ferreira J., Reyes A.M. and Salas M.R. XXXIII Annual Meeting of the Society of Pharmacology of Chile. Olmué, Chile. 2011.

### **Congresos internacionales**

-“Chemosensitizing effect of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its tetraacetylated derivative (NDGATA) on parental and multiresistant TA3 mouse mammary adenocarcinoma cell lines”. Ferreira J., Pavani M., **Jaña F.**, Burgos P., Morello A., Maya J.D., Faundez M., Lopez A., De Ioannes A., Becker M.I. 8th International Conference of Anticancer Research, Kos, Greece, 2008.

-“Alkyl-gallate triphenylphosphonium lipophilic cations exhibit anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against mouse mammary adenocarcinoma TA3 cell line and its multiresistant variant TA3-MTX-R”. Ferreira J., Jara J., Reyes D., Castro V., Pavani M., Saavedra-Olavarria J., **Jaña F.**, Parra E., Morello A. Maya JD., Kemmerling U. 3rd International Conference on Drug Discovery and Therapy. Dubai, UAE 2011,

-“Tumor cell death induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain: Effect of 3-hydroxybakuchiol”. **Jaña F.**, Faini F., Jara J., Pavani M., Kemmerling U., Morello A., Maya J.D., y Ferreira J. Metabolism & Cancer, Baltimore MD, Estados Unidos, 2011

-“Resveratrol affects: glucose transport, proliferation and glycolytic enzyme activities in human leukemic HL60 and U937 cell lines”. Salas M.R., Ojeda M.L., Ulloa S., Parada D., Ferreira J., **Jaña F.**, Cea A. E., Vega E., Pérez A. and Reyes A.M., Cell Signaling Networks 2011 Mérida, Yucatán, México. 2011.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1.1. Generalidades del cáncer .....	15
1.2. Generalidades del metabolismo mitocondrial .....	16
1.3. Transformación del metabolismo energético en el cáncer .....	17
1.4. Cambios en las enzimas del metabolismo energético del cáncer .....	20
1.5. Polifenoles como antitumorales. ....	22
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	25
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	25
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
5.1. Reactivos.....	26
5.2. Aislamiento e identificación de compuestos .....	26
5.3. Modelo experimental celular .....	27
5.4. Aislamiento de mitocondrias .....	28
5.5. Determinación del efecto antiproliferativo de los compuestos sobre las células tumorales de ratón y células leucémicas humanas. ....	28
5.6. Determinación del consumo de oxígeno en células intactas y mitocondrias aisladas de células TA3.....	29
5.7. Determinación de la actividad NADH/duroquinona oxidorreductasa (complejo I) .....	30
5.8. Determinación de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial.....	31
5.9. Determinación del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo .....	31
5.10. Medición de los niveles intracelulares de ATP por luminometría .....	32
5.11. Determinación de la fragmentación de DNA nuclear por TUNEL .....	32
5.12. Medición de muerte celular por citometría de flujo. ....	33
5.13. Determinación de la actividad de caspasa 3 .....	33
5.14. Cuantificación de ROS por fluorometría.....	34
5.15. Análisis estadístico. ....	35

<b>6. RESULTADOS</b> .....	36
<b>6.1.1. Obtención de 3-OHbk y bk</b> .....	36
<b>6.1.2. Acetilación de los grupos hidroxilos de 3-OHbk</b> .....	37
<b>6.2. Efecto de 3-OHbk, bk y 3-OHbk-DA sobre la viabilidad de las células cancerosas de ratón y humanas</b> .....	39
<b>6.3. Efecto de los 3-OHbk y 3-OHbk-DA sobre la respiración de células TA3</b> .....	44
<b>6.3.1. Determinación del segmento de ETC inhibido</b> .....	47
<b>6.4. Efecto de 3-OHbk sobre la función mitocondrial</b> .....	50
<b>6.5. Efecto de 3-OHbk sobre la muerte celular en células TA3</b> .....	53
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	61
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	67
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	68
<b>ANEXO</b> .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cadena transportadora de electrones mitocondrial. ....	18
<b>Figura 2.</b> Estructuras de bakuchiol y 3-hidroxi bakuchiol.....	24
<b>Figura 3.</b> Esquema de purificación de bk y 3-OHbk. ....	36
<b>Figura 4.</b> Esquema de reacción de acetilación de 3-OHbk. ....	38
<b>Figura 5.</b> Efecto de bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA sobre la reducción de MTT en células TA3 y TA3-MTX-R.....	40
<b>Figura 6.</b> Efecto de bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA sobre la reducción de MTT en células CCRF-CEM y CEM/C2.....	41
<b>Figura 7.</b> Efecto de bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA sobre la incorporación de rojo neutro en células TA3 y TA3-MTX-R. ....	43
<b>Figura 8.</b> Efecto de 3.OHbk y 3-OHbk-DA sobre la respiración desacoplada de células TA3.....	45
<b>Figura 9.</b> Efecto de 3-OHbk sobre la respiración desacoplada de células TA3 y TA3-MTX-R.....	46
<b>Figura 10.</b> Efecto de 3-OHbk en la respiración de mitocondrias aisladas de células TA3.....	48
<b>Figura 11.</b> Efecto de 3-OHbk sobre la actividad del complejo I sensible a rotenona... ..	49
<b>Figura 12.</b> Efecto de 3-OHbk sobre el $\Psi_{mt}$ y la concentración intracelular de ATP en células TA3.....	51
<b>Figura 13.</b> Efecto de 3-OHbk sobre MPTP en mitocondrias aisladas de células TA3. ....	52
<b>Figura 14.</b> Efecto de 3-OHbk en la muerte de células TA3. ....	54
<b>Figura 15.</b> Efecto de 3-OHbk sobre la muerte celular de células tumorales y normales. ....	55
<b>Figura 16.</b> Efecto de 3-OHbk sobre el ciclo celular de células TA3.....	57
<b>Figura 17.</b> Efecto de 3-OHbk sobre marcadores de apoptosis en células TA3. ....	58
<b>Figura 18.</b> Efecto de 3-OHbk en la generación de ROS en células TA3. ....	59
<b>Figura 19.</b> Efecto del restablecimiento del flujo de electrones mitocondrial en la viabilidad de células TA3. ....	60
<b>Figura 20.</b> Modelo de acción de 3-OHbk.....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Efecto de bakuchiol, 3-hidroxi bakuchiol y 3-hidroxi bakuchiol diacetilado sobre 4 líneas neoplásicas. Ensayo con MTT.</i> .....	42
<b>Tabla 2.</b> <i>Efecto de bakuchiol, 3-hidroxi bakuchiol y 3-hidroxi bakuchiol diacetilado sobre 2 líneas neoplásicas (TA3 y TA3MTXR). Ensayo con rojo neutro.</i> .....	44





## RESUMEN

Los cambios en la síntesis de ATP mitocondrial pueden afectar el desempeño de células tumorales, debido a que el primer paso de la glicólisis es dependiente del ATP mitocondrial que proviene de la fosforilación oxidativa. En células normales, la cadena transportadora de electrones es responsable del 90% de la síntesis de ATP, y en células tumorales, a pesar de estar disminuida, es responsable de al menos el 50% de los niveles totales de ATP, incluyendo los cánceres más glicolíticos; por lo tanto, la inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial se presenta como un importante blanco terapéutico para el cáncer.

Bakuchiol (bk) es el componente mayoritario del extracto metanólico de *Psoralea glandulosa* y de *Psoralea corylifolia*. Es un meroterpeno liposoluble con propiedades antidiabéticas, bactericidas, hepatoprotectoras y antitumorales, entre otras.

De *Psoralea glandulosa* o Culén (nombre común), se aisló también un derivado catecólico, 3-hidroxibakuchiol (3-OHbk). Hasta el momento, este último ha sido encontrado solamente en *Psoralea glandulosa*, planta nativa chilena. Este hecho y sus características estructurales lo convierten en un interesante candidato capaz de interferir con el flujo de electrones mitocondrial. 3-OHbk se encuentra descrita solo en *Psoralea glandulosa*, lo que explicaría la ausencia de trabajos con este compuesto.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la citotoxicidad *in vitro* de 3-OHbk en dos modelos de células tumorales, adenocarcinoma mamario de ratón (TA3) y leucemia linfoblástica aguda humana (CCRF-CEM), y además, relacionar el efecto citotóxico

con la efecto inhibitorio de esta molécula sobre la cadena transportadora de electrones mitocondrial de células cancerosas.

Para ello se evaluó la actividad citotóxica de 3-OHbk, bk y un derivado acetilado de 3-OHbk (3-OHbk-DA). Se determinó el efecto de estas tres moléculas sobre la proliferación de cuatro líneas celulares cancerosas: la línea TA3, su derivada multirresistente a fármacos antineoplásicos (TA3-MTX-R) células CCRF-CEM y su línea derivada resistente a camptotecina y derivados (CEM/C2). De las 3 moléculas evaluadas, 3-OHbk y 3-OHbk-DA presentaron la mayor actividad antiproliferativa en las cuatro líneas tumorales. Para determinar si este efecto antiproliferativo estaba relacionado con algún efecto sobre la cadena transportadora de electrones mitocondrial, se determinó el efecto de las dos moléculas seleccionadas sobre el consumo de oxígeno de células TA3. Solo 3-OHbk fue capaz de inhibir el consumo de oxígeno, mientras que su derivado di-acetilado no presentó actividad en este sistema.

Se determinó el sitio de la cadena transportadora de electrones sobre el cual 3-OHbk ejerció su acción inhibitoria, y el efecto de esta molécula sobre la función mitocondrial de células TA3. 3-OHbk actúa en el complejo I de la cadena transportadora de electrones, disminuyendo la velocidad de oxidación de NADH, provocando una disminución del potencial de transmembrana mitocondrial, la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) y una disminución de la concentración de ATP intracelular total. Además indujo muerte celular, induciendo la activación de caspasa 3 y la fragmentación del DNA nuclear, fenómenos característicos de una muerte celular del tipo apoptótico. La inhibición de la proliferación y la muerte celular se observó sólo en las células cancerosas humanas y

de ratón, y fue significativamente menor en dos modelos celulares considerados normales (la línea celular murina MM3MG y las células mononucleares de sangre periférica humana PBMC)

Es sabido que diversos inhibidores del complejo I de la cadena transportadora de electrones inducen la muerte celular debido a la generación de ROS, por este motivo, debido a que es capaz de inhibir el complejo I, se estudió la capacidad de 3-OHbk para generar especies reactivas del oxígeno a través de la medición de la oxidación de DCFDA. Sin embargo, no se observó este fenómeno.

Cuando se utilizó un sustrato sintético que revierte la inhibición del consumo de oxígeno, entregando electrones directamente al complejo III de la cadena transportadora de electrones, la muerte celular de las células TA3 fue casi completamente prevenida. Este resultado sugiere que la muerte celular está provocada directamente por la disminución del consumo de oxígeno por la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, que es un sistema deficiente pero esencial en células tumorales, y no por la generación de ROS, lo cual podría presentar una serie de ventajas para el tratamiento de esta enfermedad.

## SUMMARY

Changes in mitochondrial ATP synthesis can affect the performance of tumor cells due to the dependence of the first step of glycolysis on mitochondrial ATP. The mitochondrial electron transport chain (ETC) is responsible for the synthesis of approximately 90% of ATP in normal cells and up to 50% in most glycolytic cancers; therefore, the inhibition of ETC emerges as an interesting therapeutic target. Here, we studied the effect of a lipophilic isoprenylated catechol, 3-hydroxybakuchiol (3-OHbk) and bakuchiol (bk) isolated from *Psoralea glandulosa*, and an di-acetylated 3-OHbk (3-OHbk-DA) on several tumor cell mitochondrial functions. We expect 3-OHbk and its analogues to kill tumor cells by inhibiting the electron transport chain and decreasing the intracellular concentration of ATP.

The effect of these three molecules on the proliferation of four cell lines: mouse mammary adenocarcinoma cell line TA3 and its derivative multi-drug resistant cell line TA3-MTX-R, and human acute lymphoblastic leukemia cell line CCRF-CEM and camptothecin-resistant derivative and derivatives CEM/C2 was evaluated. 3-OHbk and 3-OHbk-DA showed the highest antiproliferative activity on all four cell lines, and were selected as potential inhibitors of mitochondrial electron transport chain in TA3 cells. However, 3-OHbk showed inhibitory activity of the electron transport chain, while its di-acetylated derivative showed no activity in this system, therefore, the site of the electron transport chain which 3-OHbk on exerts its inhibitory action was determined, with other mitochondrial metabolism and cell death parameters. We found that this molecule acts on complex I of the electron transport chain, decreasing the mitochondrial transmembrane potential, opening the mitochondrial permeability

transition pore (MPTP), decreasing the intracellular ATP concentration and cell death, inducing the activation of caspase 3 and nuclear DNA fragmentation, a characteristic phenomenon of apoptotic cell death.

In addition, the capability of 3-OHbk to generate reactive oxygen species was assessed by measuring the oxidation of DCFDA. This, however, was not observed. When a synthetic substrate, which reverses inhibition of oxygen consumption delivering electrons directly to complex III of the electron transport chain, was added to TA3 cells, cell death was almost completely prevented. This might indicate that cell death is caused directly by the decrease in oxygen consumption by the inhibition of complex I of mitochondrial electron transport chain, an essential system in tumor cells, suggesting a new mechanism to attack cancer cells.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Generalidades del cáncer**

El cáncer no es una sola enfermedad, sino más bien un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células anormales. Estas células no responden a los procesos normales que regulan el crecimiento, proliferación y supervivencia celular, y no pueden llevar a cabo los procesos fisiológicos del tejido diferenciado del que provienen. En general, las células cancerosas se definen como poco diferenciadas o inmaduras. Otras características de las células cancerosas son su habilidad para invadir el tejido adyacente normal y separarse del tumor primario, moverse por la sangre o linfa y formar nuevos tumores en un lugar distanciado del sitio de donde provienen (metástasis). Además, la capacidad para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización), el potencial de proliferación ilimitado, y la reprogramación de su metabolismo energético contribuyen a su supervivencia (Hanahan y Weinberg 2011).

Se estima que en el año 2008 hubo 12,7 millones de casos nuevos y 7,6 millones de muertes producidas por los diversos tipos de cáncer a nivel mundial, de los cuales, el 56% de los casos nuevos y el 64% de las muertes corresponden a países en vías de desarrollo. El cáncer de mama en mujeres y el de pulmón en hombres se encuentran entre los que son diagnosticados con mayor frecuencia, y están entre los mayores causantes de muertes tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Sin embargo, en los hombres de países desarrollados, el cáncer de pulmón es desplazado por el cáncer de próstata.

Mientras que la incidencia de todos los tipos de cáncer combinados en los países desarrollados es casi el doble que en los países en vías de desarrollo, la tasa de mortalidad es sólo un 21% mayor en hombres y un 2% mayor en mujeres. Estas diferencias en los patrones de incidencia y mortalidad entre los países desarrollados y en vías de desarrollo, son el reflejo, para un tipo de cáncer dado, de diferencias regionales en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo, protocolos de detección, y/o de la disponibilidad y uso de los centros de tratamiento.

El flagelo del cáncer continúa incrementándose por varias causas, entre ellas, el envejecimiento, el aumento de la población mundial y el aumento de comportamientos asociados a factores de riesgo, en especial, la mayor exposición a contaminantes ambientales sin tomar las medidas precautorias adecuadas y, de manera particular en los países en vías de desarrollo, el tabaquismo. El cáncer de mama, pulmón y colon están aumentando su frecuencia en muchos países desarrollados y también los cánceres asociados a infecciones (Jemal, Bray et al. 2011).

## **1.2. Generalidades del metabolismo mitocondrial**

En 1948, Eugene Kennedy y Albert Lehninger descubrieron que la mitocondria es el sitio donde ocurre la fosforilación oxidativa en eucariontes (Kennedy y Lehninger 1948), lo que marcó el inicio de una nueva fase en el estudio de las reacciones de transducción de energía. La mitocondria tiene dos membranas; la externa es permeable a moléculas pequeñas ( $PM < 5000$ ) e iones, los cuales se mueven libremente a través de canales de transmembrana formados por una familia de proteínas integrales de membrana llamadas porinas. La membrana interna es impermeable a la gran mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluyendo los protones ( $H^+$ ); las únicas especies que la cruzan sólo lo hacen a través de transportadores específicos. La membrana interna contiene los componentes de la cadena respiratoria y la ATP sintasa.

La matriz mitocondrial, encerrada por la membrana interna, contiene el complejo piruvato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo del ácido cítrico, la vía de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y las vías de oxidación de aminoácidos, que son todas las vías de oxidación de “combustible” exceptuando la glicólisis, que ocurre en el citosol. La membrana interna segrega a los intermediarios y a las enzimas de las vías metabólicas que ocurren en el citosol y aquellas que ocurren en la matriz mitocondrial.

La cadena transportadora de electrones consiste en cuatro complejos proteicos embebidos en la membrana interna mitocondrial, que transportan electrones secuencialmente, desde el NADH que entrega dos electrones al complejo I, hasta el complejo IV, que reduce al oxígeno molecular, el último aceptor de electrones. Este



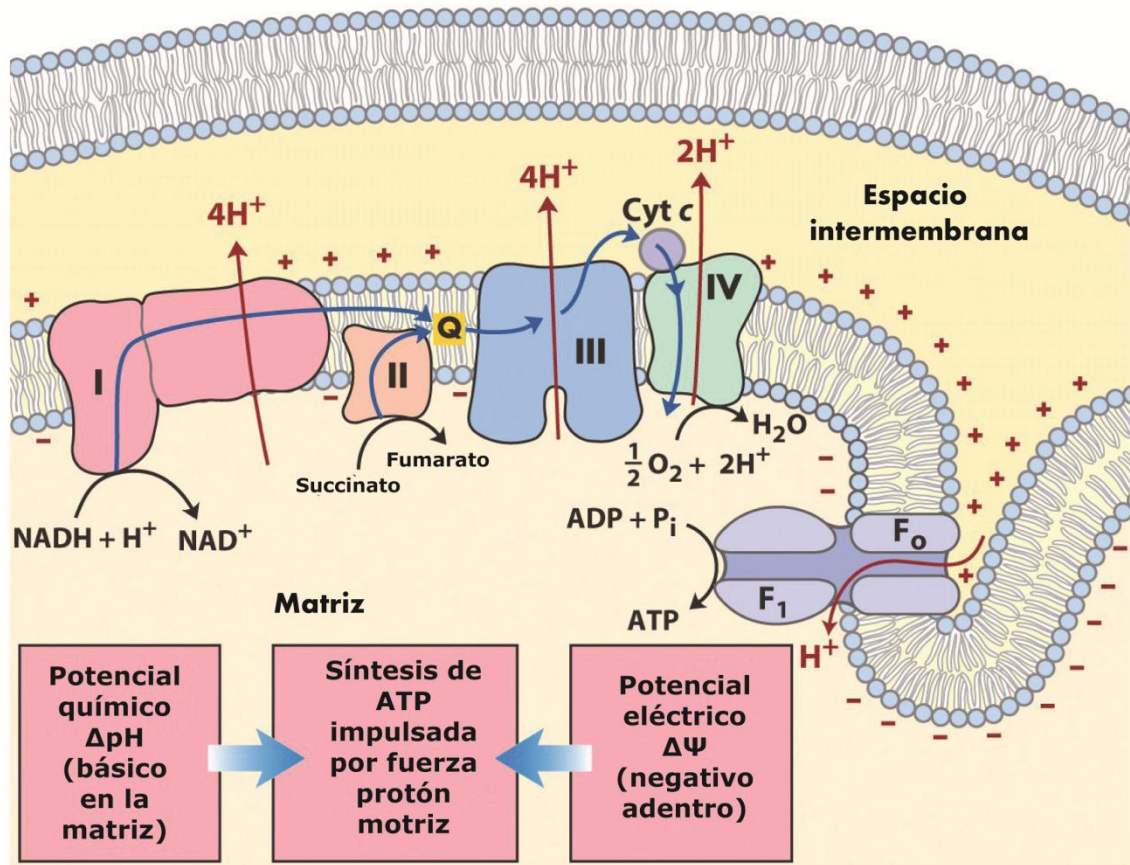
proceso de transporte de electrones va acoplado el bombeo de protones (por los complejos I, III y IV) desde la matriz al espacio intermembrana mitocondrial, el cual forma una gradiente electroquímica que es utilizada por la ATP sintasa para sintetizar ATP desde ADP y Pi (**Figura 1**).

### **1.3. Transformación del metabolismo energético en el cáncer**

Las células cancerosas exhiben profundos cambios genéticos, bioenergéticos e histológicos comparados con su contraparte no-transformada. Todas estas modificaciones están asociadas con la proliferación descontrolada, con la inhibición de la apoptosis y un anabolismo extremadamente activo. La transformación desde una célula normal a una cancerosa es un proceso patogénico complejo, el cual incluye una interacción permanente entre la activación de genes de cáncer (oncogenes y/o genes supresores de tumores), reprogramación metabólica y cambios en el entorno inducidos por el tumor. En el contexto del mapeo genético individual de tumores humanos, la caracterización metabólica ha evidenciado una “firma” metabólica específica para cada tipo de tumor, la cual depende de su historia, que es la secuencia de activación de oncogenes y la confrontación a cambios intermitentes en la concentración de oxígeno, glucosa, y aminoácidos (Jose, Bellance et al. 2011).

En la última década, los estudios en bioenergética han demostrado que existe una alta variabilidad entre tipos de cáncer, e incluso dentro de un mismo tipo de cáncer en cuanto a los mecanismos y a los sustratos usados preferencialmente para obtener energía. El remodelamiento metabólico más popular descrito en las células tumorales es un aumento en la incorporación de glucosa, el aumento de la capacidad glicolítica y una alta producción de lactato, incluso en presencia de altas concentraciones de oxígeno (efecto Warburg) (Warburg 1956). Para explicar este fenotipo bioenergético, se sugirió como hipótesis la existencia de una disfunción mitocondrial en células que proliferan rápidamente (Pedersen 1978).

Aunque la alta tasa de incorporación de glucosa en células tumorales fue confirmada por el uso de la tomografía de emisión de positrones (PET) con el análogo 2-(<sup>18</sup>F)-fluoro-2-deoxi-D-glucosa (FDG), actualmente la utilización de la glicólisis o la fosforilación oxidativa (OXPHOS) por un tumor no puede ser evaluada con esta



**Figura 1. Cadena transportadora de electrones mitocondrial.**

El movimiento de los electrones está representado por una flecha azul a través de la cadena transportadora de electrones (ETC), con la subsecuente generación de adenosin trifosfato (ATP). Sustratos reducidos entregan electrones al complejo I (NADH) o II (succinato) hacia la coenzima Q y el complejo III y IV, donde reducen el oxígeno ( $O_2$ ) y producen agua ( $H_2O$ ). A medida que los electrones pasan de un estado de mayor energía a otro de menor energía a través de los complejos, se bombean protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (flechas rojas), generando un gradiente a través de la membrana interna mitocondrial. Los protones reingresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa o (complejo V) generando una fuerza motriz que combina adenosin difosfato (ADP) con fosfato inorgánico ( $P_i$ ) para producir ATP. Q = coenzima Q; Cyt c = citocromo c. *Adaptado de Lehninger Principles of Biochemistry, 4ta edición.*

técnica. Actualmente, la hipótesis de “glicólisis aeróbica” de Warburg se ha puesto a prueba en un cada vez mayor número de estudios que muestran que la mitocondria en las células tumorales no están inactivas *per se* sino que operan a baja capacidad (Bellance, Benard et al. 2009) o, por el contrario, entregan la mayoría del ATP necesario a la célula tumoral (Rodríguez-Enriquez, Carreno-Fuentes et al. 2010). La alta glicólisis no se ve en todos los tipos de tumores. De hecho no todas las células cancerosas proliferan rápido, y en ese caso un anabolismo aumentado no es mandatorio, ya que las células con alta tasa de proliferación dependen más de la glicólisis que las de baja proliferación. Esta es la razón de por qué el tratamiento con bromopiruvato, por ejemplo, es muy eficiente en células con alta velocidad de proliferación, pero muy poco efectivo en células con baja proliferación (Jose, Bellance et al. 2011). Ya en 1979 se demostró que en células de carcinoma cervical, la vía preferencial para producir ATP era OXPHOS (Reitzer, Wice et al. 1979). Además, se identificaron varias líneas celulares derivadas de gliomas que son altamente dependientes de la generación mitocondrial de ATP (Griguer, Oliva et al. 2005), y también fue demostrado que en una subclase de células de glioma que ocupan preferencialmente la glicólisis, también se puede cambiar a la utilización de OXPHOS en condiciones limitantes de glucosa (Bouzier, Voisin et al. 1998; Beckner, Gobbel et al. 2005), como también se observó en células de carcinoma mamario, cervical, hepatomas, y cáncer de páncreas (Rossignol, Gilkerson et al. 2004; Plecita-Hlavata, Lessard et al. 2008; Smolkova, Bellance et al. 2010).

Esta flexibilidad es una muestra de la compleja relación que existe entre la glicólisis y OXPHOS para adaptar la generación de energía a los cambios del entorno, así como las diferencias en las necesidades energéticas o biosintéticas del tumor. También se demostró que una variedad de líneas celulares tumorales y de leucemia humana y de ratón (HL60, HeLa, 143B y U937) utilizan la respiración mitocondrial para sostener su proliferación (Herst y Berridge 2007). Recientemente, la medición de la contribución de OXPHOS a la generación de ATP en células HeLa demostró que la mitocondria genera el 79% del ATP celular, y que en condiciones de hipoxia esta contribución se reduce a un 30% (Rodríguez-Enriquez, Carreno-Fuentes et al. 2010). Una vez más, la flexibilidad metabólica es utilizada para sobrevivir en condiciones de

hipoxia. Todos estos estudios demuestran que la mitocondria es un sistema eficiente para sintetizar ATP en una gran variedad de células cancerosas (Moreno-Sanchez, Rodriguez-Enriquez et al. 2007). A pesar de que se ha observado una reducción del contenido mitocondrial en algunos tumores (Cuezva, Ostronoff et al. 1997; Isidoro, Martinez et al. 2004; Hervouet, Demont et al. 2005; Hervouet, Cizkova et al. 2008; Bellance, Benard et al. 2009; Formentini, Martinez-Reyes et al. 2010; Sanchez-Arago, Chamorro et al. 2010), las células cancerosas mantienen la capacidad de utilizar OXPHOS en lugar de la glicolisis durante la carcinogénesis. Este cambio es observado también a nivel de la oxidación de la glutamina, la cual ocurre de dos formas, unida a OXPHOS o anóxica, permitiendo el direccionamiento de la energía desde la glutamina o la serina a pesar de la hipoxia o la actividad reducida de ETC (Smolkova, Plecita-Hlavata et al. 2011).

#### **1.4. Cambios en las enzimas del metabolismo energético del cáncer**

En general, los tumores están caracterizados por una glicólisis modificada, en donde los niveles de algunas enzimas están aumentados, y las reacciones reversas están fuertemente disminuidas (Marin-Hernandez, Gallardo-Perez et al. 2009). El marcador de glicólisis, GAPDH, está aumentado en el cáncer gástrico, pulmón, mama, riñón y colon, y la expresión del transportador de glucosa GLUT1 está aumentada en la mayoría de los cánceres. Recientemente se mostró que la subunidad beta de  $F_1F_0$ -ATP sintasa está disminuida en varios tipos de tumores, contribuyendo al efecto Warburg (Sanchez-Cenizo, Formentini et al. 2010; Willers, Isidoro et al. 2010). También se demostró que los niveles de expresión de IF1 están aumentados en carcinomas hepatocelulares, probablemente para evitar la hidrólisis de ATP (Capuano, Guerrieri et al. 1997). Se han descrito numerosos cambios a nivel de OXPHOS y de la biogénesis de mitocondrias en tumores humanos (Nadege, Patrick et al. 2009). Otra característica importante en las células cancerosas es el alto nivel de la hexoquinasa II (HKII) unida a la membrana mitocondrial. Se ha estimado que en gliomas humanos la fracción de hexoquinasa mitocondrial (mHK) es el 69% del total, comparado con el 9% en células normales (Oudard, Boitier et al. 1997). Se ha descrito que la HKII contribuye a (i) la alta velocidad de glicólisis, utilizando el ATP mitocondrial en lugar del citosólico, y (ii) disminuyendo la capacidad de OXPHOS limitando la entrega de Pi y ADP a la

mitocondria (Pedersen, Mathupala et al. 2002; Pedersen 2007). Recientemente, se propuso como una nueva estrategia terapéutica el bloqueo de la glicólisis sostenida por la HKII con bromopiruvato (Mathupala, Ko et al. 2010), sin embargo, falta clarificar con mayor precisión el sitio de acción de este bloqueador, ya que hay un estudio que indica que OXPHOS también es un blanco de 3-bromopiruvato (da Silva, El-Bacha et al. 2009).

Todas estas observaciones son consistentes con el aumento en la velocidad de incorporación de FDG observado en tumores por PET, lo cual podría resultar de un aumento en el transporte de glucosa, y/o un aumento en la actividad de la hexoquinasa (Jose, Bellance et al. 2011), sin embargo, FDG no es un sustrato de la glicólisis completa (solo se transforma en FDG-6P por HK antes de ser eliminado) por lo que no puede ser usado como evidencia de un aumento general del flujo glicolítico. Es más, FDG-PET también da falsos positivos y falsos negativos, indicando que algunos tumores no dependen de, o no tienen una capacidad glicolítica aumentada. El rápido sistema de glicólisis descrito en células cancerosas además se complementa con un aumento en los niveles de expresión de la isoforma A de lactato deshidrogenasa (LDH-A). Esta isoforma presenta una alta  $V_{max}$  que es útil para prevenir la inhibición de la glicólisis por la acumulación de su propio producto (piruvato). Recientemente se describió que la inhibición de LDH-A en tumores disminuye la tumorigenicidad y que además está correlacionada con un aumento en la respiración mitocondrial (Fantin, St-Pierre et al. 2006). La expresión preferencial de la isoenzima glicolítica piruvato quinasa M2 (PKM2) en células tumorales determina si la glucosa se convierte a lactato para la regeneración de energía (forma tetramérica activa) o es usada para la síntesis de los bloques de construcción para la proliferación celular (forma dimérica casi inactiva) (Mazurek 2011).

En los últimos años, se han descrito mutaciones en proteínas de la maquinaria respiratoria (SDH, FH) y del ciclo de los TCA (IDH1,2), provocando una acumulación de metabolitos y una subsecuente activación de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), siendo este fenómeno observado en varios tumores humanos (Niemann y Muller 2000; Pollard, Briere et al. 2005; Dang, White et al. 2010).

Recientemente se han descrito nuevos mecanismos que relacionan la bioenergética y la epigenética. Entre estos están la fosforilación de la histona H2B por AMPK (Bungard, Fuerth et al. 2010), y la regulación por citrato de genes de vías de generación energética mediante la acetilación de histonas (Wellen, Hatzivassiliou et al. 2009). Además es destacable la influencia de los cambios de la actividad mitocondrial en la regulación de la expresión génica por la metilación del ADN nuclear (Smiraglia, Kulawiec et al. 2008). Todos estos mecanismos describen nuevas relaciones entre la regulación del metabolismo energético y la expresión génica.

Debido a las modificaciones del metabolismo energético en células tumorales, su utilización como blanco terapéutico es una buena opción. Los tipos de alteración varían entre tumores, pero el perfil metabólico está bien caracterizado, lo que indicaría que atacar la principal vía de generación energética alterada, podría mejorar significativamente el pronóstico de los pacientes. La combinación de estrategias que involucren la modulación de la glicólisis y de la OXPHOS son necesarias para una eliminación más eficiente de células malignas (Gogvadze, Zhivotovsky et al. 2010). Idealmente, las estrategias terapéuticas que interfirieran específicamente en las vías bioenergéticas podrían reducir el crecimiento tumoral (Galluzzi, Larochette et al. 2006; Rodriguez-Enriquez, Marin-Hernandez et al. 2009). Como las células cancerosas presentan una variedad de modificaciones del metabolismo energético, intentos farmacológicos que ataquen vías de producción de energía podrían mostrar una gran especificidad.

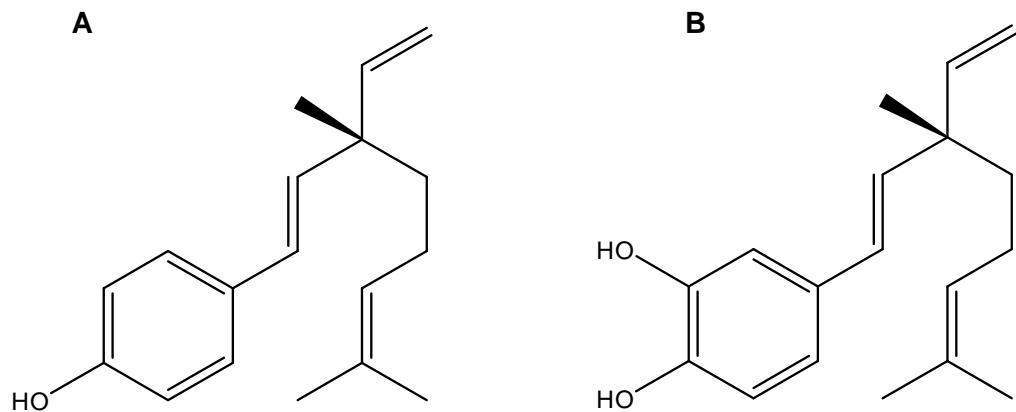
### **1.5. Polifenoles como antitumorales.**

En nuestro laboratorio se han estudiado galatos de alquilo que inhiben marcadamente el flujo de electrones mitocondrial de células tumorales en el segmento NADH-CoQ, disminuyendo la síntesis de ATP y causando la muerte celular. Además, los hepatocitos fueron significativamente menos sensibles que todas las líneas tumorales evaluadas. Estos ésteres también inhibieron la proliferación del sarcoma 786A, del adenocarcinoma mamario TA3 y de su variante multirresistente a fármacos antineoplásicos TA3-MTX-R en cultivo. Además, el galato de isobutilo inhibió la proliferación de células TA3 y TA3-MTX-R implantadas intramuscularmente en ratones, y además aumentó la sobrevivencia de los animales administrando galato de

isobutilo sólo, o en combinación con doxorubicina. Esto indica que los galatos de alquilo estudiados presentan citotoxicidad selectiva para las células tumorales y además sensibilizan a las células que presentan multirresistencia a múltiples drogas (MDR). Este efecto es debido a la disfunción mitocondrial de las células tumorales (Frey, Pavani et al. 2007). También se comprobó que un catecol, el ácido nordihydroguaiaretico (NDGA) y su derivado tetraacetilado (NDGATA) con los cuatro hidroxilos (-OH) esterificados con el grupo acetilo, inhibieron la proliferación y también el transporte de electrones mitocondrial en células TA3 y TA3-MTX-R en algún punto antes de la ubiquinona, y NDGATA inhibió el flujo de electrones en mitocondrias tumorales, y no en mitocondrias aisladas de hepatocitos de ratón. Además, NDGA y NDGATA inhibieron la proliferación de células tumorales implantadas intramuscularmente en ratones, indicando que son también antineoplásicos *in vivo* (Plaza, Pavani et al. 2008).

En nuestro laboratorio se ha estudiado también el bk, que es el componente mayoritario del extracto metanólico de *Psoralea glandulosa* y de *Psoralea corylifolia* (Labbe, Faini et al. 1996). Es un meroterpeno liposoluble [1-(4-hydroxyphenyl)-3,7-dimethyl-3-vinyl-1,6-octadieno] con propiedades antidiabéticas, bactericidas, hepatoprotectoras y antitumorales, entre otras (Katsura, Tsukiyama et al. 2001; Bapat, Chintalwar et al. 2005; Kim, Oh et al. 2005; Park, Zhao et al. 2007; Chen, Jin et al. 2010; Majeed, Reddy et al. 2012).

De *Psoralea glandulosa* o Culén (nombre común), se aisló también el derivado catecólico 3-OHbk (**Figura 2**). Hasta el momento, este último ha sido descrito exclusivamente en *Psoralea glandulosa* (Labbe, Faini et al. 1996), planta nativa chilena. Este hecho y sus características estructurales lo convierten en un interesante candidato antitumoral capaz de inhibir OXPHOS. Es posible que los hidroxilos catecólicos del 3-OHbk interaccionen con los residuos de cisteína y/o lisinas presentes en alta cantidad en algunas subunidades de los Complejos respiratorios I y II de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Imlay y Fridovich 1992). 3-OHbk se puede sintetizar por olefinación (Perales, Makino et al. 2002) y se encuentra descrita solo en *Psoralea glandulosa*, lo que explicaría la ausencia de trabajos con este compuesto.



**Figura 2. Estructuras de (A) bakuchiol y (B) 3-hidroxibakuchiol.**

3-OHbk tiene la misma estructura principal de bk, pero tiene un hidroxilo (OH) adicional en el carbono 3 del anillo aromático.

Todos estos antecedentes, más el hecho de que es imperativo proponer nuevas moléculas antitumorales, hacen que el estudio de compuestos que regulan la función mitocondrial a través de la interacción con ETC sean de vital importancia. Bajo este contexto se plantearon las siguientes preguntas:

- ¿3-OHbk, por ser también un catecol lipofílico, interactúa con ETC?
- ¿La acetilación de los hidroxilos aumentarían la actividad de la molécula?
- ¿Qué efectos en el sistema de OXPHOS podría tener esta interacción?
- ¿Podría esta interacción inducir la muerte de líneas celulares tumorales?

De esta forma, se trataron de responder las preguntas previamente descritas, así como establecer la relación entre 3-OHbk, OXPHOS y muerte celular, planteando la siguiente hipótesis y objetivos.



## **2. HIPÓTESIS**

3-OHbk y sus análogos causan la muerte de células tumorales inhibiendo la cadena transportadora de electrones y disminuyendo la concentración intracelular de ATP.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad citotóxica de 3-OHbk, bk y 3-OHbk-DA y su relación con la inhibición de la cadena transportadora de electrones en células tumorales.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener de 3-OHbk y bk. Acetilación de los dos grupos hidroxilos de 3-OHbk.
- Determinar la citotoxicidad de 3-OHbk y sus análogos sobre las líneas celulares tumorales de ratón TA3 y TA3-MTX-R, y humanas CCRF-CEM y CEM/C2.
- Estudiar el efecto de los compuestos más citotóxicos sobre la respiración de células tumorales de ratón TA3.
- Determinar el tipo de muerte celular que induce la molécula más citotóxica en células TA3.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Reactivos**

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio de cultivo DMEM, tritón X-100, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), glutamina, glutamato (GLU), malato (MAL), succinato, yoduro de propidio (PI), azul tripán 0,4%, seroalbúmina bovina (BSA), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), rojo neutro (NR), diclorofluoresceina diacetato (DCFDA), ciclosporina A (CsA). Trolox<sup>®</sup> fue obtenido en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). En Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se adquirió el medio de cultivo RPMI 1640, suero fetal bovino (FBS), tetrametilrodamina metil éster perclorato (TMRM). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a no ser que se especifique lo contrario.

### **5.2. Aislamiento e identificación de compuestos**

La extracción del material vegetal (parte aérea de la planta) limpio y debidamente seleccionado, se realizó por maceración en DCM a temperatura ambiente durante una hora.

El extracto líquido obtenido se filtró y concentró en un evaporador rotatorio (baja temperatura y presión reducida) hasta obtener un residuo oscuro de carácter oleoso.

El extracto oleoso total, se fraccionó por sucesivas cromatografías en columna de diversa índole (de exclusión, en Sephadex LH20 y Adsorción, en gel de sílice) hasta lograr el aislamiento de los compuestos bk y 3-OHbk puros.

La identificación de los compuestos aislados, se realizó por co-cromatografía con patrones en placa fina, en diversos sistemas de solventes y por comparación de sus espectros de <sup>1</sup>H- RMN con aquellos descritos en la literatura (Labbe, Faini et al. 1996).

### 5.3. Modelo experimental celular

Como modelo experimental de células neoplásicas se utilizaron dos líneas celulares humanas de leucemia linfoblástica aguda, CCRF-CEM (número ATCC<sup>®</sup> CCL-119<sup>™</sup>) y la sub-línea multirresistente a camptotecina y derivados CEM/C2 (número ATCC<sup>®</sup> CRL-2264<sup>™</sup>). Las células fueron obtenidas de la ATCC<sup>®</sup> (ATCC, Manassas, VA, EEUU) y criopreservadas en nitrógeno líquido. Al momento de su utilización fueron descongeladas y propagadas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10%. Además se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma mamario de ratón TA3 y la sub-línea multirresistente a fármacos antineoplásicos TA3-MTX-R (Institute of Cancer Research, Philadelphia, USA), las cuales fueron propagadas intraperitonealmente en ratones de la cepa CAF-1/Jax. Para los experimentos celulares con estas dos líneas, se extrajo líquido peritoneal (1,0 mL) y se contaron las células con azul tripán, excluyendo del conteo las células muertas que incorporan este colorante, y luego se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de  $10^5$  células/mL para ser utilizadas en los experimentos.

Como modelo celular no tumoral, se utilizaron células de epitelio mamario de ratón MM3MG (número ATCC<sup>®</sup> CRL-6376<sup>™</sup>) cultivadas en las mismas condiciones que las células TA3. Como control de célula normal de humanos, como contraparte de las células de leucemia linfoblástica aguda, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC), obtenida del banco de sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se utilizaron 20 mL de sangre con EDTA como anticoagulante, y se diluyó en PBS 1X a una relación 1:1. Se preparó un gradiente agregando 3 mL de Histopaque<sup>®</sup>-1119 en un tubo cónico de 15 mL y se agregó encima 3 mL de Lymphocyte Separation medium (Cellgro, Manassas, VA, EEUU). Luego se agregaron cuidadosamente 6 mL de la solución sangre/PBS en la superficie del gradiente, y se centrifugó a 600 g por 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar, se observa una fase de plasma en la parte superior, bajo la cual se encuentra la capa de PBMCs, la cual fue extraída cuidadosamente con una pipeta estéril, y transferida a un tubo tipo eppendorff donde se centrifugó a 150 g por 5 min, el pellet obtenido se lavó dos veces con PBS y luego transferido a una placa de 100 mm con RPMI 1640.

#### **5.4. Aislamiento de mitocondrias**

Las suspensiones mitocondriales de 20 mg de proteínas/mL se prepararon de acuerdo a lo descrito previamente (Moreadith y Fiskum 1984), con las siguientes modificaciones menores: la fracción mitocondrial se lavó dos veces a 12.000 g por 10 minutos y re-suspendida en un volumen mínimo de medio que contenía sacarosa 0,07 M, D-manitol 0,21 M, HEPES 0,005 M y EGTA 0,001 M, a pH 7,4, en ausencia de BSA para eliminar la adsorción hidrofóbica de los compuestos. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

Se obtuvieron partículas submitocondriales mediante el congelamiento y descongelamiento de las mitocondrias obtenidas previamente, según lo descrito (Naranmandura, Xu et al. 2011).

#### **5.5. Determinación del efecto antiproliferativo de los compuestos sobre las células tumorales de ratón y células leucémicas humanas.**

Para determinar el efecto antiproliferativo de las moléculas, se realizó el ensayo MTT. Este ensayo consiste en la medición del producto (azul) de la reducción del MTT mediada por reductasas celulares (Berridge y Tan 1993; Liu, Peterson et al. 1997; Bernas y Dobrucki 2002). Por lo tanto, la cantidad de producto de reacción es proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas. Este ensayo no distingue entre células que se dividen activamente o que están quiescentes (Galluzzi, Aaronson et al. 2009), por esta razón se ocupa como un ensayo preliminar para detectar las moléculas con mayor efecto antiproliferativo, que detecta la cantidad de células metabólicamente activas de una condición experimental contra el control de solvente. Se sembraron  $10^4$  células por pocillo en placas de 96 pocillos, en 100  $\mu$ L de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% para TA3 y TA3MTX-R y RPMI 1640 con FBS 10% para las líneas CCRF-CEM y CEM/C2. Luego de 24 horas, se centrifugaron a 1400 g por 10 minutos y el medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo con los compuestos a las concentraciones indicadas. El volumen de vehículo no superó en ningún caso el

0,1% del volumen total, incluyendo al control que incluyó DMSO solo. Luego de 48 horas de incubación con los compuestos a 37°C, las células se lavaron 3 veces con PBS y se les agregó MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml en medio de cultivo sin FBS y sin rojo fenol y se incubaron por 1 hora para las células TA3 y TA3MTX-R y 4 horas para las células CCRF-CEM y CEM/C2. Se agregó 10 µL de Tritón X-100 al 10% en HCl 0,1N (triton al 1% en HCl 0,01N como concentración final) para solubilizar los cristales de formazán. Una vez solubilizados se leyó la absorbancia en un lector de placas de 96 pocillos a 570 nm. El porcentaje de citotoxicidad se calculó comparando porcentualmente la absorbancia de cada pocillo con la absorbancia del control.

Como técnica suplementaria, se utilizó la cuantificación de la incorporación de rojo neutro, un colorante que se incorpora sólo a los lisosomas de las células viables. Las células fueron cultivadas en las mismas condiciones indicadas en el experimento de MTT, pero una vez finalizado el tiempo de incubación con los compuestos (48 horas) se reemplazó el medio de cultivo por una solución de rojo neutro 0,1 mg/mL en medio de cultivo sin FBS, y se incubó por 1 hora a 37°C. Luego las placas se centrifugaron a 800 g por 5 minutos y se descartó el medio con rojo neutro no incorporado, se lavaron las células 3 veces con PBS para remover el exceso de rojo neutro, y se agregaron 100 µL de etanol ácido (etanol al 50% y ácido acético al 0,1%) para solubilizar el rojo neutro incorporado. La absorbancia de los pocillos se midió en un lector de placas a 540 nm.

#### **5.6. Determinación del consumo de oxígeno en células intactas y mitocondrias aisladas de células TA3**

Se determinó el consumo de oxígeno en dos modelos experimentales, tanto en células intactas como en mitocondrias aisladas. Para la medición de consumo de oxígeno en células intactas, se usaron  $3 \times 10^6$  células TA3 o TA3-MTX-R, las cuales fueron concentradas a un volumen de 100 µL, y se traspasaron a una cámara (volumen final de 600 µL) acoplada al sistema de electrodos. La velocidad de consumo de oxígeno se registró en un electrodo de Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EEUU), acoplado a un sistema de registro digital,

mediante la utilización del programa WinDag Data Acquisition (Akron, OH, EEUU) a 25°C. Los datos fueron guardados en formato .csv y se analizaron utilizando el programa Origin Pro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU). Una vez que se extrajeron las pendientes de las curvas en cada condición, los resultados se expresaron como promedio de las mediciones normalizadas con respecto a las células control o sin tratamiento (Araya-Maturana, Delgado-Castro et al. 2002; Araya-Maturana, Cardona et al. 2006).

En el modelo de mitocondrias aisladas, el medio de respiración se preparó con sacarosa 200 mM, KCl 50 mM, HEPES 3 mM (pH 7,4), EGTA 0,5 mM, fosfato de potasio 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, y 0,5 mg/mL de proteína mitocondrial, en un volumen final de 0,6 mL. El sistema fue equilibrado con mitocondrias a 25°C por 2 minutos y se agregó glutamato 2,5 mM + malato 2,5 mM como sustrato del complejo I, succinato 5 mM como sustrato del complejo II, y duroquinol 1 mM como sustrato del complejo III. Después de la incubación por 1 minuto a 25°C, se agregó el compuesto a las concentraciones indicadas, y luego de 1 minuto se agregó ADP 175 µM y se midió la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 3 con respecto a la velocidad de respiración del estado 3 del control. Los datos corresponden al promedio del porcentaje de inhibición de la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia de compuesto, con respecto al promedio de la velocidad de consumo de oxígeno del control de solvente, de al menos tres experimentos independientes.

#### **5.7. Determinación de la actividad NADH/duroquinona oxidoreductasa (complejo I)**

La actividad de NADH/duroquinona reductasa se determinó con la cuantificación en el tiempo de la oxidación del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro Jasco V-560 UV/VIS. Se agregaron 2 mg de proteína mitocondrial a un volumen de reacción fue de 2 mL, en buffer Tris-HCl (pH 7,4) en presencia de antimicina (0,5 µg/mL), KCN (0,1 mM), NADH (0,17 mM) y 2 µL de 3-OHbk o DMSO, en las concentraciones indicadas. La reacción se inició con la adición de duroquinona (25 µM) como aceptor de electrones según lo descrito previamente

(Ferreira, Wilkinson et al. 1986). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la velocidad de oxidación de NADH (abs/min) con respecto al control de solvente. Como control positivo se usó rotenona.

### **5.8. Determinación de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial**

Para determinar la apertura de MPTP, se determinó la disminución de la dispersión lateral de luz (540 nm) en una suspensión de mitocondrias aisladas de células TA3. Esta disminución se debe al hinchamiento de las mitocondrias debido a la entrada masiva de agua a la matriz mitocondrial (Hallak, Win et al. 2009), fenómeno que, de ser inhibido por CsA 1  $\mu$ M, es indicativo de la apertura de MPTP. El experimento comienza al agregar mitocondrias intactas (0,5 mg de proteína mitocondrial/mL) a una cubeta con 2 mL de buffer experimental (KCl 125 mM, CaCl<sub>2</sub> 30  $\mu$ M, Tris-HCl 10 mM pH 7,4, fosfato inorgánico (Pi) 1 mM, glutamato 2,5 mM, malato 2,5 mM y EGTA-Tris pH 7,4 10  $\mu$ M) en agitación constante a 25°C. Se determino la dispersión de la solución durante 10 min con un espectrofotómetro Jasco V-560 UV/VIS. A los 5 min de medición se agregó con una jeringa tipo Hamilton el estímulo experimental, o solo el solvente. Se cuantificó la diferencia de la dispersión antes y después del estímulo, y se graficó en función de la concentración de compuesto. Para confirmar que la entrada de agua a las mitocondrias se debe a la apertura de MPTP, se realizó el experimento en presencia de CsA 1  $\mu$ M. Se muestran los datos de 3 experimentos independientes.

### **5.9. Determinación del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo**

Para estos experimentos, se utilizaron placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo. La sonda TMRM (excitación: 543 nm, emisión: sobre los 560 nm) se utilizó como marcador del potencial de membrana mitocondrial. La sonda se cargó 30 min antes de la realización de las mediciones, a una concentración de 200 nM. Una vez finalizados los estímulos con compuesto y la

carga de la sonda, la suspensión de de células cargadas con sonda se traspasó a tubos BD para citometría y su fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo FACS-Canto (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU). La disminución de la intensidad de la fluorescencia de TMRM es proporcional a la caída del potencial mitocondrial. Como control positivo se utilizó CCCP 50  $\mu$ M durante 30 min. Los resultados se expresaron como la media de la fluorescencia de cada muestra (Munoz, Chiong et al. 2010).

#### **5.10. Medición de los niveles intracelulares de ATP por luminometría**

Para el caso de los ensayos que permiten estudiar los niveles relativos de ATP intracelular, se utilizaron placas de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen de 1 mL de medio con estímulo. Al final del estímulo, se extrajo una alícuota de 20  $\mu$ L de suspensión celular y se traspasó a una placa opaca de 96 pocillos y se agregó el tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo<sup>®</sup> (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) en una relación 1:1. La placa se agitó durante 2 min con el fin de completar la reacción. Posteriormente se analizaron en un luminómetro Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siendo la luminiscencia estable por un periodo de hasta 4 horas. Al mismo tiempo, se extrajeron 500  $\mu$ L de cada pocillo de la placa original y se traspasaron a tubos BD para citometría, y se les agregó PI (concentración final 50  $\mu$ g/mL), para ser analizados inmediatamente por citometría de flujo para descartar la ruptura de la membrana plasmática. Finalmente los resultados se expresaron como los promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento o control (Parra, Eisner et al. 2008).

#### **5.11. Determinación de la fragmentación de DNA nuclear por TUNEL**

La fragmentación de DNA nuclear se determinó mediante TUNEL (terminal deoxyuridinetriphosphate nick end labeling). Para determinar la fragmentación de DNA se utilizó el kit DeadEnd<sup>™</sup> Fluorometric TUNEL System (Promega, EEUU). Se utilizaron placas de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen de 1 mL de medio con estímulo. Al final del estímulo, se extrajo una alícuota de 500  $\mu$ L de suspensión celular y se centrifugó a 400 g por 5 min. El pellet



se resuspendió en 100  $\mu$ L de PBS y se traspasó a un portaobjetos, donde se realizó un extendido, y se secó bajo el flujo de aire en un gabinete de flujo laminar. Una vez secas, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% por 10 min. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y las muestras se equilibraron con el buffer de reacción por 10 min. Se agregaron 50  $\mu$ L de mezcla de reacción con nucleótidos marcados provista por el fabricante, y se incubaron por 60 min a 37°C. Se incubaron con buffer de citrato (SSC 2X) por 15 min, se lavaron dos veces con PBS frío y se agregó DAPI (0,1  $\mu$ g/mL) a todas las muestras. Luego se agregó medio de montaje y las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara digital Nikon DS-Ri1. Los datos se expresaron como porcentaje de células positivas a TUNEL con respecto al total de células.

#### **5.12. Medición de muerte celular por citometría de flujo.**

La muerte celular de todas las líneas celulares se analizó con el kit Apoptosis/Necrosis Detection Kit (Abcam, Reino Unido), basado en la unión específica de Annexina V-FITC a la fosfatidilserina expuesta en la cara externa de la membrana plasmática durante la apoptosis, y en la incorporación de PI a células con la membrana plasmática permeable. Se utilizaron placas de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen de 1 mL de medio con estímulo. Al final del estímulo, las células se lavaron 2 veces con PBS y luego fueron resuspendidas en 0,5 mL de buffer de unión a Annexina V-FITC, y se agregó 5  $\mu$ L de solución de Annexina V-FITC y 5  $\mu$ L de solución de PI entregadas por el fabricante. Luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se traspasaron a tubos BD para citometría para detectar tanto la unión de Annexina V como la incorporación de PI.

#### **5.13. Determinación de la actividad de caspasa 3**

Para medir la activación de caspasa 3 se usó el Caspase 3 Assay kit colorimetric (Sigma Chemical Co., EEUU), el cual mide el corte específico de un péptido sintético (DEVD-pNA) unido a p-nitroanilina (pNA) mediado por caspasa 3 en su forma activa. El corte del péptido libera el segmento pNA y puede

cuantificarse mediante la absorbancia a 405 nm. Se utilizaron placas de 100 mm con  $2 \times 10^6$  células/placa en un volumen de 10 mL, tratadas con el compuesto a los tiempos indicados. Al finalizar el estímulo, las células fueron lavadas dos veces con PBS y luego se lisaron con 100  $\mu$ L de buffer de lisis (HEPES 50 mM, CHAPS 5 mM, DTT 5 mM) en hielo por 20 min. Se traspasaron 10  $\mu$ L de lisado celular a una placa de 96 pocillos de fondo plano, y se agregaron 80  $\mu$ L de buffer de reacción (20 mM HEPES pH 7,4, CHAPS 0,1%, DTT 5 mM, EDTA 2 mM). La mezcla se incubó por 1 hora a 37°C y la absorbancia a 405 nm fue cuantificada en un lector de placas. Cada condición fue estudiada también en presencia de un inhibidor específico para caspasa 3 (DEVD-CHO) para descartar la proteólisis inespecífica, la absorbancia de estos pocillos es considerada como blanco (Park, Zhao et al. 2007). Los resultados son expresados como el promedio del porcentaje del control de 3 experimentos independientes.

#### **5.14. Cuantificación de ROS por fluorimetría.**

Para cuantificar ROS, se utilizó la sonda DCFDA. Se utilizaron placas de 96 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo en un volumen de 0,1 mL de medio, se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con una solución de DCFDA 20  $\mu$ M por 15 min a 37°C, luego se centrifugaron y lavaron 2 veces con PBS para extraer la DCFDA que no fue incorporada a las células, y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS pH 7,4. Las células cargadas con DCFDA se traspasaron a una placa de 96 pocillos opaca, donde se agregó el estímulo correspondiente. Se midió la fluorescencia (excitación: 488 nm, emisión: 528 nm) durante 40 minutos, y se determinó la pendiente de las curvas de aumento de fluorescencia en el tiempo. Mientras mayor sea la pendiente, mayor es la producción de ROS en el sistema. Como control se usó rotenona 50  $\mu$ M y Trolox<sup>®</sup> 500  $\mu$ M. Los estímulos se agregaron justo antes de la medición. Los resultados se expresaron como el promedio de las pendientes (RFU/min) de al menos 3 experimentos independientes.

### **5.15. Análisis estadístico.**

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía y la prueba de Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1.1. Obtención de 3-OHbk y bk.

En nuestro laboratorio, se ha observado que bk y 3-OHbk inhiben el consumo de oxígeno de células tumorales. Para probar su citotoxicidad en las líneas celulares tumorales y normales deben obtenerse de su fuente natural, ya que no se ha descrito hasta el momento una síntesis viable. En Chile, estos metabolitos sólo se encuentran presentes en cantidades apreciables en la especie vegetal nativa chilena llamada *Psoralea glandulosa* L. (Papilionácea) que constituye la fuente de extracción (Labbe, Faini et al. 1996).

*Psoralea glandulosa* L., se recolectó en el sector Las Lajas del Cajón del Maipo (Región Metropolitana) en el mes de marzo (otoño) de los años 2008 y 2009.

1,8 kg de hojas frescas de *Psoralea glandulosa* se maceraron en diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de filtración, el extracto obtenido se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio, quedando un residuo de carácter oleoso de 19,2 g. Para aislar los compuestos de interés, este extracto orgánico total se sometió sucesivamente a cromatografías en columna (de exclusión en *Sephadex* HL-20 y adsorción en columnas rápidas de gel de sílice) hasta la obtención en forma pura de los compuestos requeridos (**Figura 3**).

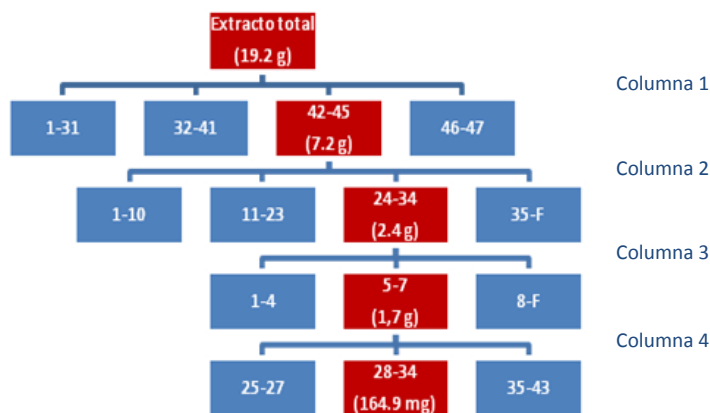


Figura 3. Esquema de purificación de bk y 3-OHbk.

Cada nivel representa las fracciones obtenidas en cada columna y cada cuadro representa una fracción de la misma composición química. Los cuadros rojos indican el grupo de fracciones que contienen 3-OHbk.

El proceso de aislamiento y sus resultados, es detallado a continuación.

**Columna 1.** El extracto obtenido con DCM (19,2 g), se sometió a una columna rápida de gel de sílice, eluída con hexano y hexano-acetato de etilo en proporciones crecientes y fue monitoreada mediante cromatografía en capa fina (CCF) en gel de sílice y desarrollada con hexano/acetato de etilo al 30% (7:3). En esta columna se obtuvo bk entre la fracción 1 a la 31 mientras que 3-OHbk eluyó junto a otros compuestos en la fracciones 42-45.

**Columna 2.** El conjunto de fracciones 42-45 de la columna 1 se juntaron y se sometió a cromatografía en una columna con matriz de *Sephadex* LH-20 utilizando como eluyente una mezcla de hexano/diclorometano/metanol en una proporción de 3:2:1, obteniéndose 10 fracciones que contenían 3-OHbk.

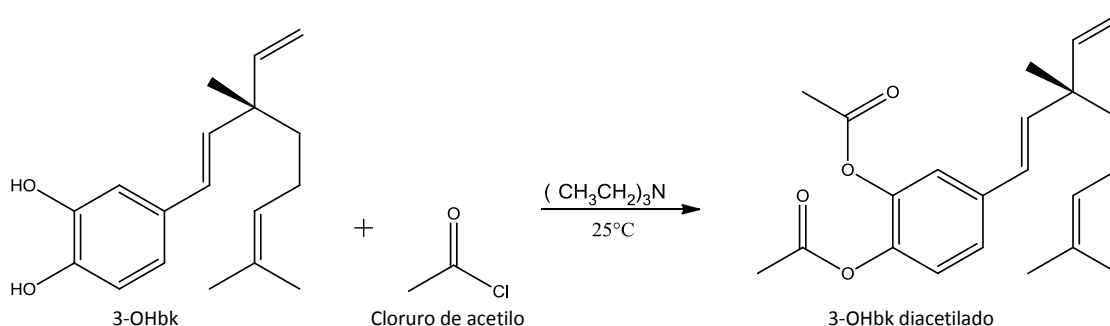
**Columna 3.** Las 10 fracciones de la Columna 2 que contenían 3-OHbk se juntaron y se procedió a realizar una nueva separación por cromatografía en una columna de *Sephadex* LH-20 utilizando metanol como eluyente obteniéndose 3 fracciones de 3-OHbk aún impuro.

**Columna 4.** El 3-OHbk impuro se sometió a una columna rápida de Gel de sílice, eluída con un sistema de H/AE al 10%. (9:1), lográndose 195,1 mg del compuesto puro (**Figura 3**). La identidad y pureza del compuesto aislado, se confirmaron por co-cromatografía con el compuesto patrón y por su espectro de  $^1\text{H}$ - RMN.

#### **6.1.2. Acetilación de los grupos hidroxilos de 3-OHbk.**

La solubilidad en lípidos de un fármaco puede influir fuertemente en su actividad en un tejido. Un compuesto más lipofílico presenta mayor disolución gastrointestinal, absorción y biodisponibilidad que uno más hidrofílico siempre que sea en una serie homóloga de compuestos que tengan similitudes estructurales o variaciones menores. Con el derivado diacetilado de menor polaridad, se pretende aumentar la solubilidad del 3-OHbk en membranas biológicas (Plaza, Pavani et al. 2008) con lo cual se espera lograr una mayor acción inhibitoria sobre el potencial de

transmembrana mitocondrial, una mayor especificidad y por consiguiente un mejor efecto antineoplásico. Como ejemplo, tenemos el 3-OHbk y su derivado diacetilado propuesto, en el cual se mantiene la estructura básica central de la molécula. De acuerdo a lo anterior, se incrementó el carácter lipofílico del 3-OHbk por derivatización química de sus hidroxilos fenólicos. Se realizó una esterificación de ellos mediante la reacción con cloruro de acetilo en medio básico (**Figura 4**), obteniéndose el 3-OHbk-DA.



**Figura 4. Esquema de reacción de acetilación de 3-OHbk.**

164,9 mg (0,605 mmoles) de 3-OHbk disuelto en DCM, se calentaron a reflujo durante 5 minutos con 185  $\mu\text{L}$  de cloruro de acetilo y 362  $\mu\text{L}$  de trietilamina, obteniéndose una fase orgánica líquida y un precipitado blanco, correspondiente a la sal de trietilamina. Se separó el sólido por filtración y la fase orgánica líquida se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. Se obtuvieron 195,1 mg de producto crudo de la reacción con un 90% de rendimiento. En CCF, se observa la presencia de compuestos secundarios, minoritarios.

La CCF realizada con 3-OHbk antes de reaccionar con cloruro de acetilo y después de la reacción, muestra una desaparición completa de los reactantes, dando origen a tres productos de diferente polaridad (tanto de  $R_f$  mayor como menor) y que no reaccionan con  $\text{FeCl}_3$ , indicando la ausencia de grupos hidroxilo libres.

195,1 mg del producto de acetilación crudo, se purificaron mediante cromatografía en columna rápida de Gel de sílice, eluida con un sistema hexano/diclorometano con polaridad ascendente. Se recolectaron 28 fracciones, de

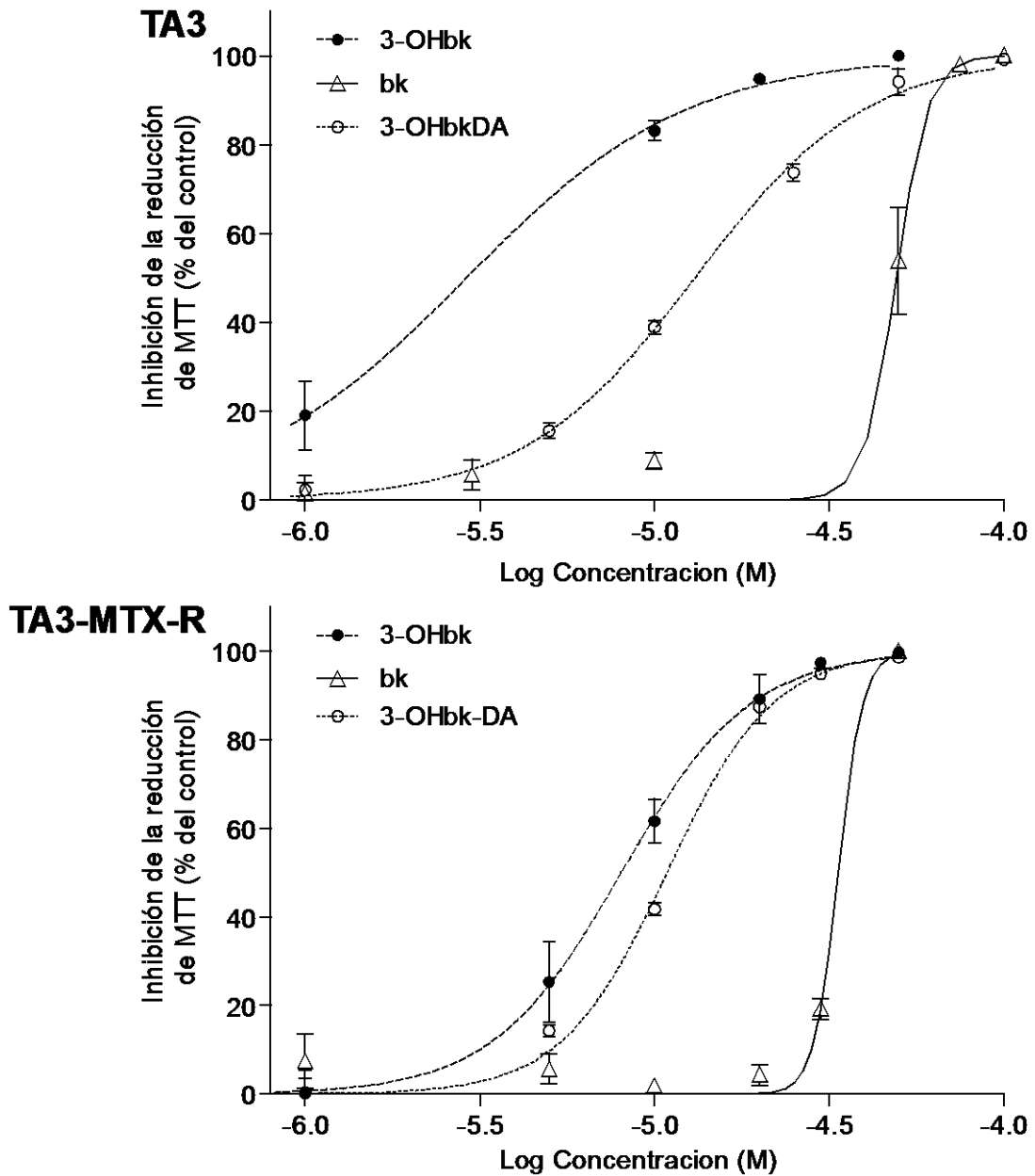
las cuales 4 de ellas, contenían 3-OHbk-DA puro. Se obtuvieron 79,9 mg de 3-OHbk-DA con un 99% de pureza, lo cual fue confirmado por 1H-RMN (Anexo) y la co-cromatografía realizada en diferentes sistemas de solventes.

## **6.2. Efecto de 3-OHbk, bk y 3-OHbk-DA sobre la viabilidad de las células cancerosas de ratón y humanas.**

En este objetivo, se evaluaron los cambios en la viabilidad celular inducidos por las moléculas estudiadas, bk, 3-OHbk, y 3-OHbk-DA. La viabilidad se determinó midiendo la inhibición de la reducción de MTT a formazán (570 nm), fenómeno mediado por reductasas intracelulares, y relacionado con la viabilidad celular. Se utilizó la línea celular TA3, y su sub-línea multirresistente a fármacos antineoplásicos TA3-MTX-R. 3-OHbk fue el compuesto más citotóxico para las células de carcinoma mamario TA3 y TA3-MTX-R. 3-OHbk fue más de 15 veces más potente que bk. Para la sub-línea multirresistente TA3MTXR, 3-OHbk fue 4 veces más potente que bk y éstas fueron sólo casi 3 veces más resistentes que su línea progenitora TA3 (**Figura 5, Tabla 1**).

Las líneas de leucemia linfoblástica humana fueron más sensibles a los 3 compuestos en comparación con las células de ratón, y sorprendentemente la sublínea CEM/C2 no presentó diferencias significativas con la línea sensible CCRF-CEM para 3-OHbk. Además, para 3-OHbk-DA la sub-línea multirresistente fue más sensible que su línea precursora CCRF-CEM. Bk fue 6 veces menos potente que 3-OHbk y 3-OHbk-DA en la línea CCRF-CEM mientras que para la sub-línea multirresistente CEM/C2 fue casi 10 veces menos potente. 3-OHbk y 3-OHbk-DA no presentaron diferencias significativas en la toxicidad sobre CCRF-CEM y CEM/C2 (**Figura 5, Tabla 1**).

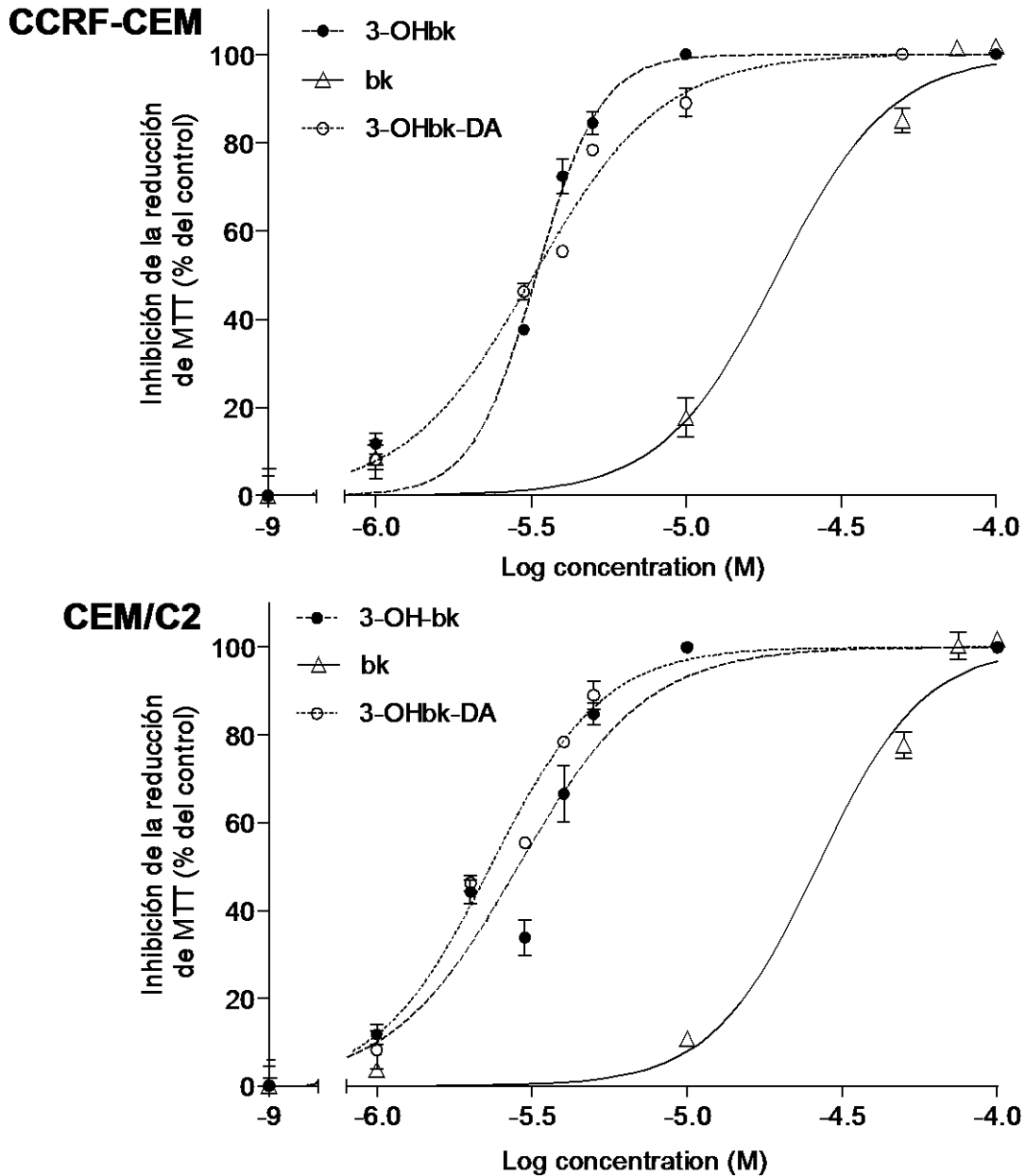
Los resultados obtenidos en las sub-líneas multirresistentes murinas y humanas muestran que la resistencia mostrada por estas células a fármacos antineoplásicos no es reflejada en la inhibición de la viabilidad provocada por estos compuestos.



**Figura 5. Efecto de bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA sobre la reducción de MTT en células TA3 y TA3-MTX-R**

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos ( $10^4$  células/pocillo) e incubadas por 48 horas con los compuestos a las concentraciones indicadas. Luego se sometieron al ensayo de MTT. Los resultados están expresados como el porcentaje de inhibición de la reducción de MTT de cada condición experimental (dada por el logaritmo de la concentración molar de cada compuesto) versus el control. Todos los pocillos tienen un 0,1% de DMSO, que es el vehículo de los compuestos. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SEM ( $n=3$  experimentos independientes).





**Figura 6. Efecto de bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA sobre la reducción de MTT en células CCRF-CEM y CEM/C2.**

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos ( $10^4$  células/pocillo) e incubadas por 48 horas con los compuestos a las concentraciones indicadas. Luego se sometieron al ensayo de MTT. Los resultados están expresados como el porcentaje de inhibición de la reducción de MTT de cada condición experimental (dada por el logaritmo de la concentración molar de cada compuesto) versus el control. Todos los pocillos tienen un 0,1% de DMSO, que es el vehículo de los compuestos. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SEM ( $n=3$  experimentos independientes).

Como resumen se muestran las concentraciones necesarias para inhibir el 50% de la reducción de MTT ( $IC_{50}$ ) de las cuatro líneas celulares estudiadas (**Tabla 1**).

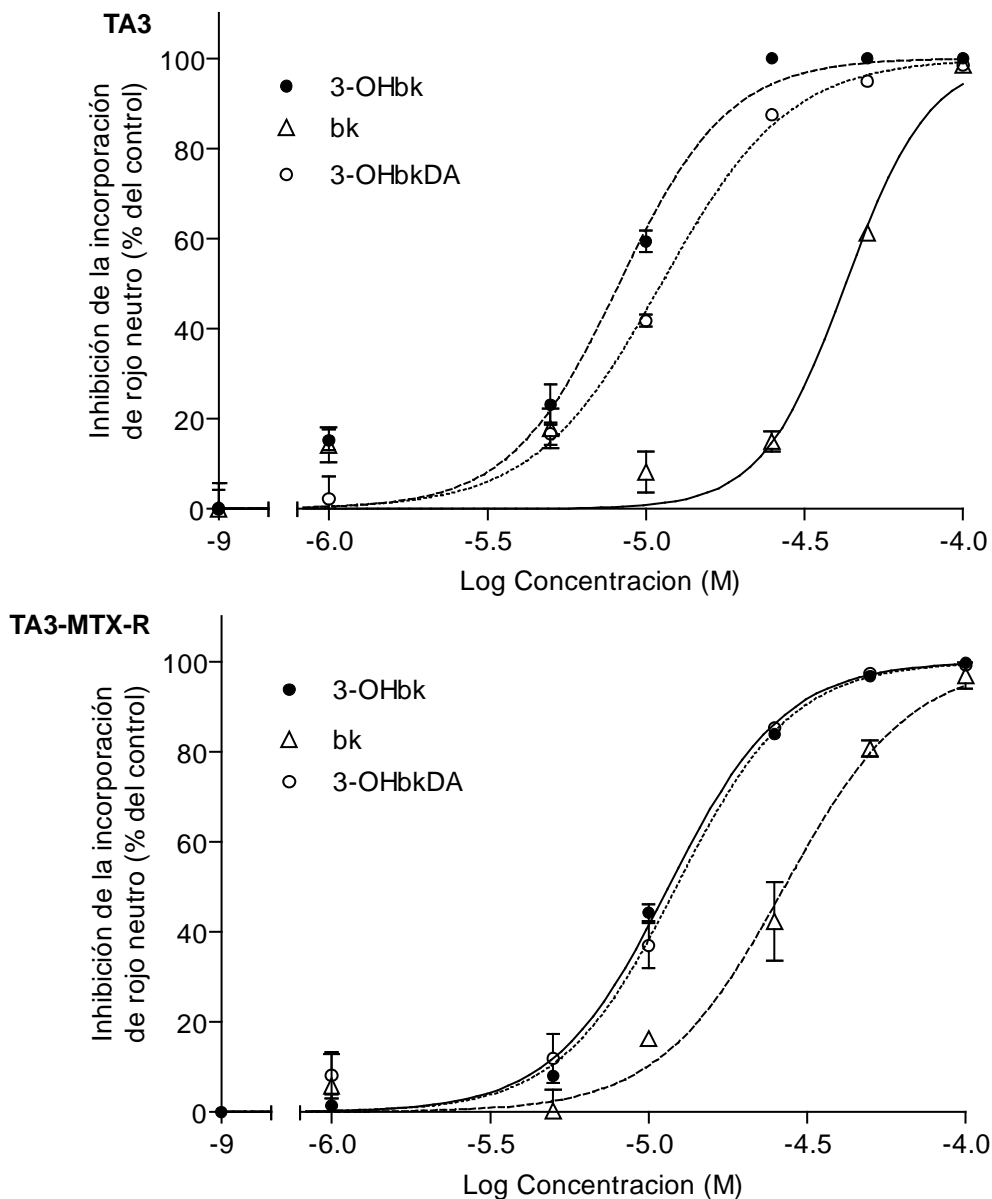
**Tabla 1. Efecto de bakuchiol, 3-hidroxi bakuchiol y 3-hidroxi bakuchiol diacetilado sobre cuatro líneas neoplásicas. Ensayo con MTT.**

	Bk		3-OHbk		3-OHbk-DA	
	$pIC_{50}$	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$pIC_{50}$	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$pIC_{50}$	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
<b>TA3</b>	4,31±0,01	<b>49,2</b>	5,54±0,05	<b>2,9<sup>c,z</sup></b>	4,88±0,02	<b>14,0</b>
<b>TA3MTX-R</b>	4,47±0,04	<b>33,7</b>	5,09±0,03	<b>8,1<sup>c,y</sup></b>	4,96±0,01	<b>10,9</b>
<b>CCRF-CEM</b>	4,71±0,04	<b>19,6</b>	5,48±0,02	<b>3,3<sup>c</sup></b>	5,49±0,02	<b>3,2</b>
<b>CEM/C2</b>	4,58±0,04	<b>26,3</b>	5,54±0,03	<b>2,9<sup>c</sup></b>	5,63±0,02	<b>2,3</b>

Valores obtenidos de las figuras 5 y 6.  $pIC_{50}$  ( $-\log IC_{50}(M)$ ) y  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) de bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA necesarios para inhibir un 50% de la reducción de MTT del control con DMSO. Los valores de  $pIC_{50}$  están expresados como  $pIC_{50} \pm SEM$ . Todas las comparaciones se hicieron usando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey. <sup>c</sup> $p < 0,001$  respecto a bk; <sup>y</sup> $p < 0,01$ ; <sup>z</sup> $p < 0,001$  respecto a 3-OHbk-DA.

Un segundo criterio utilizado para definir la actividad citotóxica de los compuestos estudiados fue la cuantificación de la incorporación del colorante rojo neutro, que solo ingresa a los lisosomas de las células viables. El ensayo se realizó en las líneas celulares TA3 y TA3-MTX-R (**Figura 7**), obteniéndose resultados similares a los obtenidos por la técnica de reducción del MTT. En la **Tabla 2** se resumen los resultados de los tres compuestos en las dos líneas celulares de adenocarcinoma mamario de ratón.

Bk siguió siendo el menos potente en términos de  $IC_{50}$ , sin embargo, a diferencia del resultado obtenido con la técnica de reducción de MTT, no hay diferencias significativas entre 3-OHbk y 3-OHbk-DA, por lo tanto, se estudiará el efecto de estas dos moléculas en su efecto inhibitorio del consumo de oxígeno de células tumorales.



**Figura 7. Efecto de bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA sobre la incorporación de rojo neutro en células TA3 y TA3-MTX-R.**

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos ( $10^4$  células/pocillo) e incubadas por 48 horas con los compuestos a las concentraciones indicadas. Luego se sometieron al ensayo de viabilidad con rojo neutro. Los resultados están expresados como el porcentaje de inhibición de la incorporación de rojo neutro de cada condición experimental (dada por el logaritmo de la concentración molar de cada compuesto) versus el control. Todos los pocillos tienen un 0,1% de DMSO, que es el disolvente de los compuestos. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independientes)

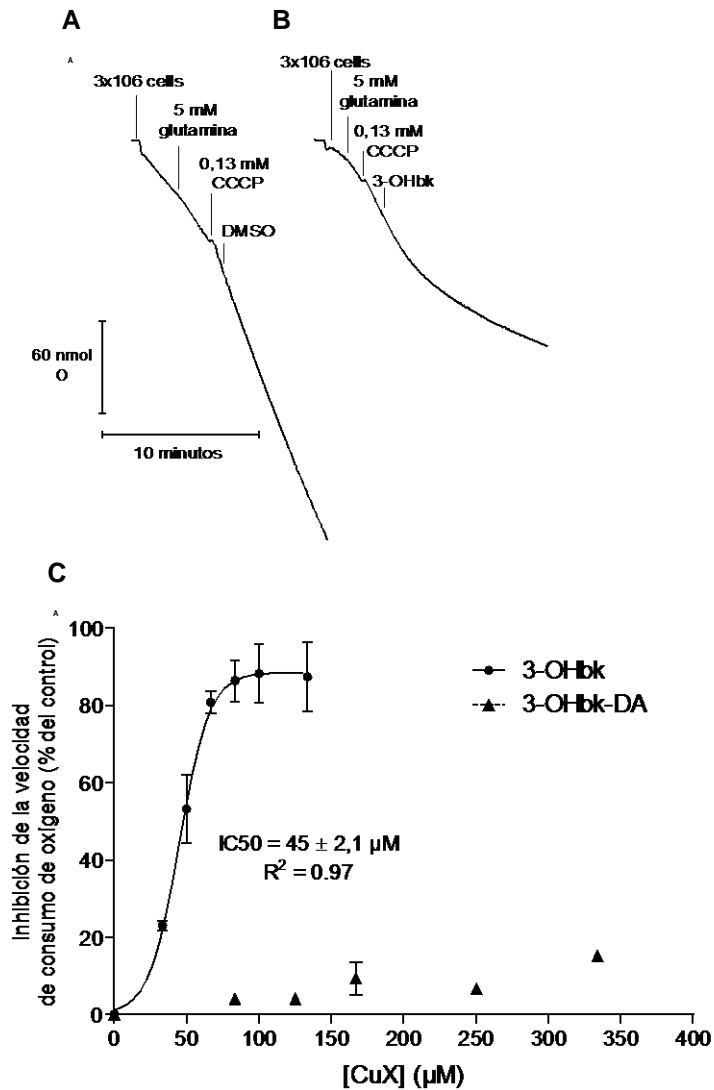
**Tabla 2. Efecto de bakuchiol, 3-hidroxi bakuchiol y 3-hidroxi bakuchiol diacetilado sobre dos líneas neoplásicas (TA3 y TA3MTXR). Ensayo con rojo neutro.**

	Bk		3-OHbk		3-OHbk-DA	
	pIC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)	pIC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)	pIC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>TA3</b>	4,37±0,03	<b>42,7</b>	5,08±0,03	<b>8,25<sup>c</sup></b>	4,95±0,02	<b>11,2</b>
<b>TA3MTX-R</b>	4,57±0,04	<b>26,9</b>	4,94±0,01	<b>11,6<sup>c</sup></b>	4,91±0,02	<b>12,3</b>

Valores obtenidos de la figura 7. pIC<sub>50</sub> (-logIC<sub>50</sub>) y IC<sub>50</sub> (μM) de bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA necesarios para inhibir un 50% la incorporación del rojo neutro con respecto al control con DMSO. Los valores de pIC<sub>50</sub> están expresados como pIC<sub>50</sub> ± SEM. Todas las comparaciones se hicieron usando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey. <sup>c</sup>p<0,001 respecto a bk.

### **6.3. Efecto de los 3-OHbk y 3-OHbk-DA sobre la respiración de células TA3.**

Dado que tanto 3-OHbk como 3-OHbk-DA tienen la mayor actividad citotóxica en células tumorales, se evaluó si tienen actividad inhibitoria sobre el flujo de electrones de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, para lo cual utilizamos un modelo experimental ampliamente establecido (Moreadith y Fiskum 1984) y usado en nuestro laboratorio por décadas (Fones, Amigo et al. 1989; Pavani, Fones et al. 1994; Cordano, Pezoa et al. 2002; Frey, Pavani et al. 2007; Plaza, Pavani et al. 2008) de células TA3 propagadas en peritoneo de ratón. Como una primera aproximación, a una suspensión de estas células se les midió la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de un sustrato respiratorio y el desacoplante CCCP, lo cual nos permite medir de forma específica la actividad de la cadena transportadora de electrones mitocondrial desacoplándola de la síntesis de ATP, y cuyo complejo IV es el principal consumidor de oxígeno en células eucariontes. Se observa que en presencia de diferentes concentraciones de 3-OHbk, la concentración de oxígeno en la cámara acoplada al electrodo tipo Clark disminuye a través del tiempo a menor velocidad que en ausencia de 3-OHbk (**Figura 8A y 8B**). Esta disminución de la pendiente se representó como inhibición con respecto al control de vehículo (porcentaje), con lo que se construyó una curva concentración-respuesta, en la que se observa que sólo 3-OHbk tiene un efecto inhibitorio (IC<sub>50</sub>= 45 μM) mientras que 3-OHbk-DA no presenta ningún efecto, incluso a concentraciones varias veces mayores que las de 3-OHbk (**Figura 8C**)

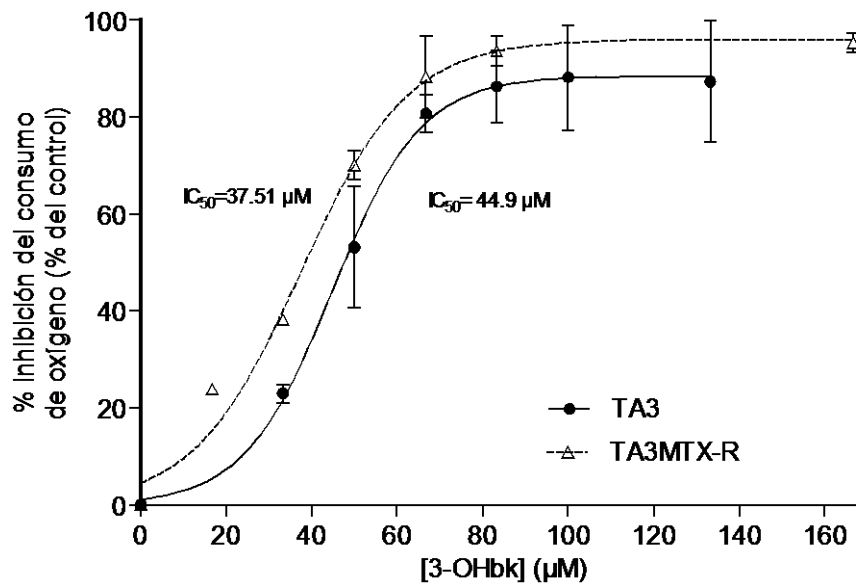


**Figura 8. Efecto de 3.OHbk y 3-OHbk-DA sobre la respiración desacoplada de células TA3.**

**(A)** Curva representativa de concentración de oxígeno en función del tiempo en una suspensión de células TA3. La pendiente de la curva luego de agregar cada compuesto corresponde a la velocidad de consumo de oxígeno (nmoles O<sub>2</sub>/minuto). La curva **A** corresponde al control sin droga, y en la curva **B** se indica el punto de aplicación de 3-OHbk (0,6 μl de un stock 50 mM). **(C)** Curva concentración-respuesta de la inhibición de la velocidad de consumo de oxígeno (de **A**) de células TA3 por 3-OHbk y 3-OHbk-DA. Se agregaron 3 x 10<sup>6</sup> células en una cámara hermética con 0,6 ml de PBS a 25°C, acoplada a un electrodo tipo Clark, el cual mide la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Se agregó glutamina como sustrato respiratorio a una concentración final de 5 mM, y CCCP para desacoplar el transporte de electrones de la síntesis de ATP. Luego se agregó cada compuesto disuelto en DMSO en las concentraciones indicadas, con una concentración final de DMSO de 0,1% en todas las condiciones. Los resultados se muestran como el promedio ± SEM (n=3 experimentos independientes).

Se comparó el efecto de 3-OHbk sobre el consumo de oxígeno de células TA3 y su línea derivada multirresistente a fármacos antineoplásicos TA3MTX-R (**Figura 9**), y de este modo examinar si la inhibición de la respiración es independiente de la multirresistencia a diversos agentes antineoplásicos que expresa la línea TA3-MTX-R.

En la **Figura 9** se observa que la respiración celular de la línea TA3 como la de su derivada multirresistente TA3-MTX-R es inhibida de manera concentración-dependiente por 3-OHbk. Las concentraciones de 3-OHbk necesarias para obtener el 50% de inhibición de la respiración son bastante similares. Por consiguiente, ambas líneas son igualmente sensibles al efecto inhibitorio de 3-OHbk; por lo cual, la inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial es independiente de los mecanismos de resistencia desarrollados por las células TA3-MTX-R.



**Figura 9.** Efecto de 3-OHbk sobre la respiración desacoplada de células TA3 y TA3-MTX-R.

Curva concentración-respuesta de la inhibición de la velocidad de consumo de oxígeno (de **A**) de células TA3 y TA3-MTX-R por 3-OHbk. Se agregaron  $3 \times 10^6$  células en una cámara hermética con 0,6 ml de PBS a 25°C, acoplada a un electrodo tipo Clark, el cual mide la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Se agregó glutamina como sustrato respiratorio a una concentración final de 5 mM, y CCCP para desacoplar el transporte de electrones de la síntesis de ATP. Luego se agregó 3-OHbk a las concentraciones indicadas, con una concentración final de DMSO de 0,1% en todas las condiciones. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independientes).

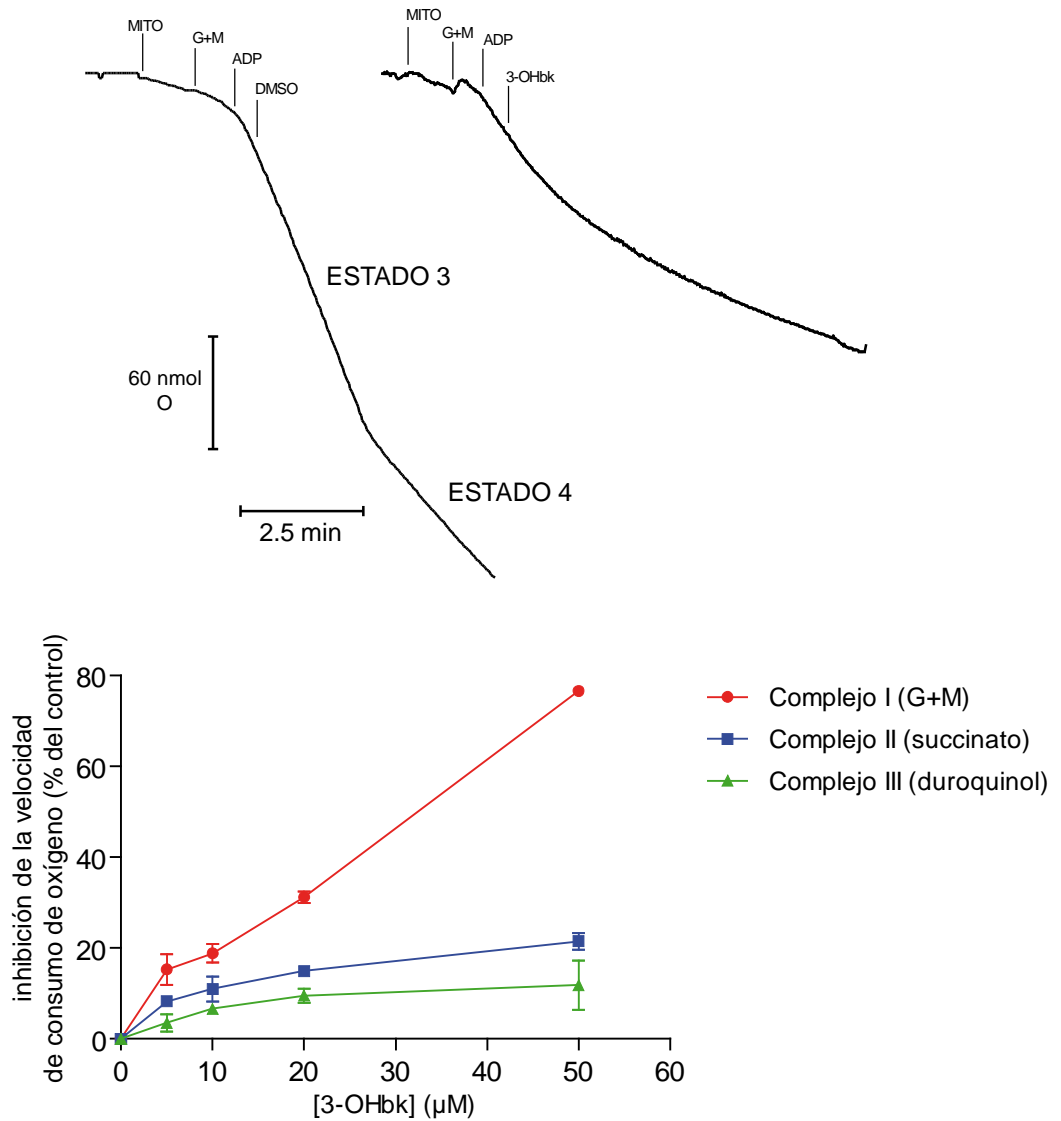
Como esta inhibición ocurre en presencia de CCCP, se pudo concluir que la inhibición ocurre en algún segmento de la ETC, ya que el gradiente de protones que acopla al flujo de electrones con la síntesis de ATP (mediante la ATP sintasa) está disipado.

### **6.3.1. Determinación del segmento de ETC inhibido.**

Para determinar qué segmento de la ETC está afectado por 3-OHbk, se utilizó como modelo experimental un modelo de mitocondrias aisladas de células TA3. Este modelo tiene ventajas sobre el modelo de células intactas, debido a que se pueden suministrar sustratos específicos para cada complejo de la ETC, lo cual nos permite controlar las condiciones experimentales (Dave, Byfield et al. 2008). Se realizaron mediciones de consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de células de adenocarcinoma mamario TA3 en presencia de diferentes sustratos que entregan electrones específicamente a cada complejo, de manera que, de no haber inhibición del consumo de oxígeno en presencia de algún sustrato, es indicativo de que la inhibición ocurre en un sitio anterior al complejo al cual el sustrato usado entrega electrones. Se realizaron mediciones con glutamato y malato que entrega electrones al complejo I en forma de NADH; con succinato, que entrega electrones al complejo II y duroquinol, que entrega electrones al complejo III.

En la **Figura 10** se puede observar que 3-OHbk inhibió fuertemente el consumo de oxígeno en estado 3 (en presencia de ADP) de mitocondrias aisladas en presencia de sustratos para el complejo I, sin embargo esta inhibición no ocurre cuando el sustrato es succinato, el cual entrega electrones en el complejo II; ni con duroquinol, que entrega electrones al complejo III. Esto sugiere que 3-OHbk interactúa principalmente al nivel del complejo I (Plaza, Pavani et al. 2008).

Sin embargo, para confirmar que la acción es directa sobre el complejo I de la cadena transportadora de electrones, se determinó el efecto de 3-OHbk sobre la actividad duroquinona reductasa sensible a rotenona, la cual se realiza en presencia de un sustrato sintético análogo a la coenzima Q oxidada, la cual actúa como el aceptor de electrones del complejo I, mientras que el complejo III

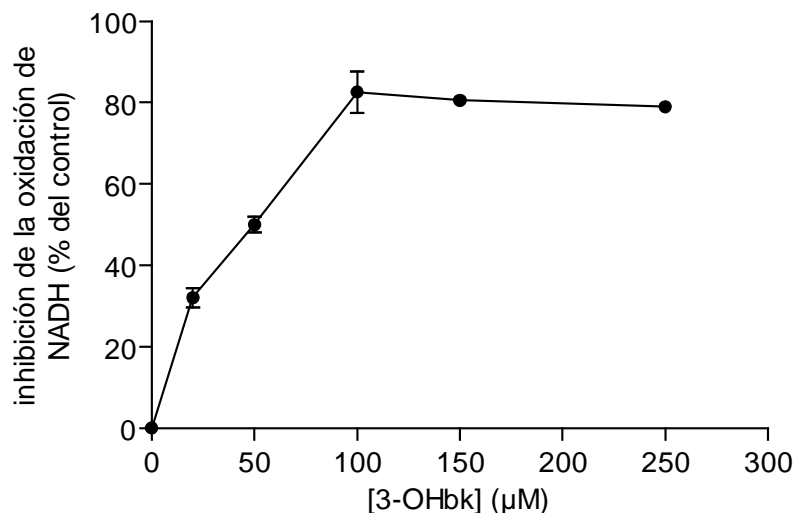


**Figura 10. Efecto de 3-OHbk en la respiración de mitocondrias aisladas de células TA3.**

**(A)** Curvas representativas de consumo de oxígeno en una suspensión mitocondrial. La velocidad de consumo de oxígeno fue determinada en una cámara de 0,6 mL acoplada a un electrodo tipo Clark, y se calculó la pendiente de la curva en estado 3 (luego de agregar ADP). **(B)** La suspensión mitocondrial (MITO = 0,3 mg de proteína mitocondrial) se incubó con glutamato 2,5 mM + malato 2,5 mM (G+M) o succinato 5 mM o duroquinol 1 mM y se agregaron las concentraciones indicadas de 3-OHbk. El porcentaje de la pendiente (estado 3) en presencia de 3-OHbk se comparó con la pendiente en estado 3 del control de vehículo (DMSO) y se calculó el porcentaje de inhibición. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n=3$  experimentos independientes).



y IV se encuentran bloqueados con antimicina A y cianuro, respectivamente. Este ensayo consiste en medir espectrofotométricamente en una suspensión de partículas sub-mitocondriales la velocidad de oxidación de NADH exógeno (340 nm), el cual es el sustrato que entrega electrones al complejo I. Si el complejo I no está inhibido, la velocidad de disminución de la absorbancia (oxidación) de NADH presenta valores mayores que cuando se ha inhibido (Ferreira, Wilkinson et al. 1986). En la **Figura 11** se observa que 3-OHbk inhibió la oxidación de NADH en una forma concentración-dependiente, de forma similar a la inhibición del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas, alcanzando un máximo de 80% de inhibición a 100  $\mu\text{M}$ , y a 20  $\mu\text{M}$  inhibe cerca de un 30%. Por lo tanto, se puede atribuir el efecto de la inhibición del consumo de oxígeno, tanto de células intactas como en mitocondrias, a la inhibición específica del complejo I. Cabe destacar que esta inhibición es de la actividad del complejo I sensible a rotenona, donde la inhibición causada por este inhibidor corresponde al 100% de la actividad inhibitoria.



**Figura 11. Efecto de 3-OHbk sobre la actividad del complejo I sensible a rotenona.**

Se determinó la absorbancia a 340 nm de una suspensión de partículas submitocondriales (0,5 mg/ml) en una cubeta de 2 ml con agitación constante, en buffer tris-HCl (pH 7,4) en presencia de antimicina (0,5  $\mu\text{M}$ ), KCN (0,1 mM), NADH (0,17 mM) y de las concentraciones indicadas de 3-OHbk. La reacción se inició con la adición de duroquinona, que es el aceptor de electrones. El porcentaje de inhibición corresponde al porcentaje de la velocidad de oxidación del NADH de la suspensión con 3-OHbk con respecto a la suspensión con DMSO. La inhibición máxima corresponde a la alcanzada con rotenona 0,5  $\mu\text{M}$  (n=3 experimentos independientes).

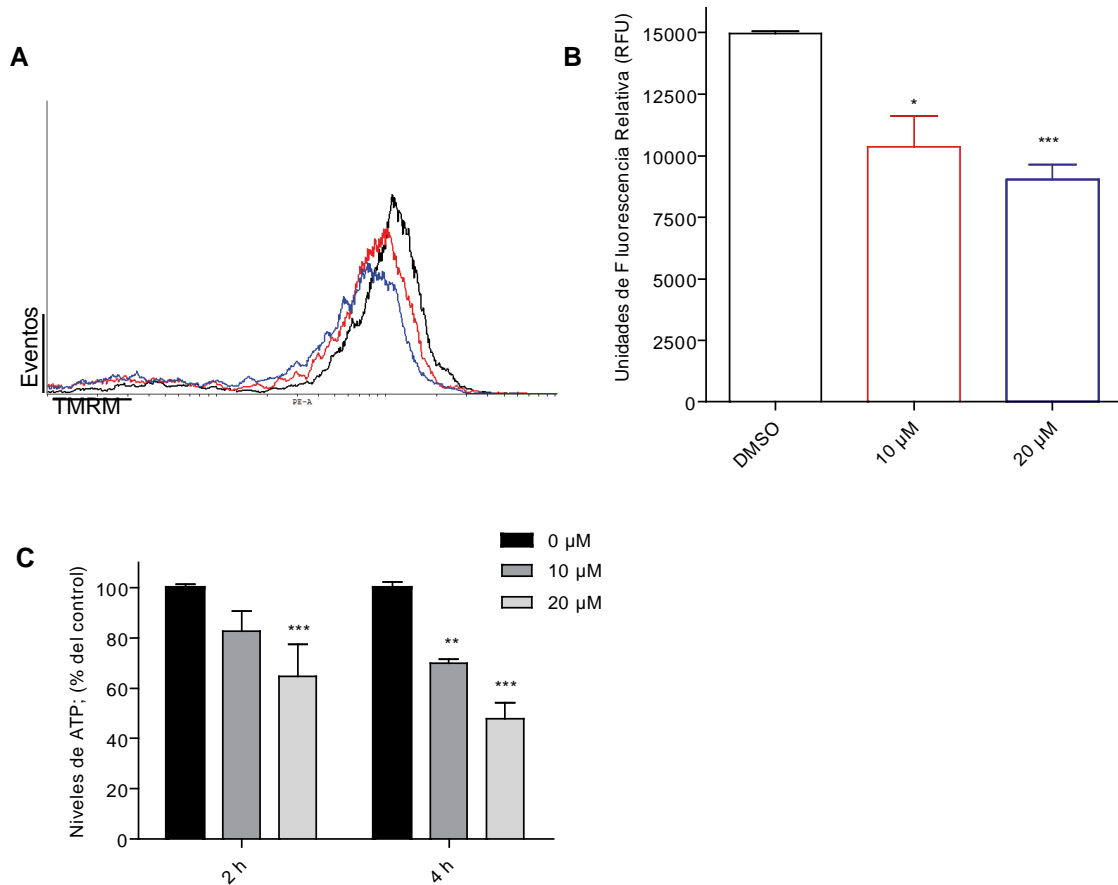
#### 6.4. Efecto de 3-OHbk sobre la función mitocondrial.

Dado que 3-OHbk modifica la actividad de la cadena transportadora mitocondrial mediante la inhibición del complejo I, anomalía que se ha relacionado en otros modelos con la disminución de las funciones mitocondriales globales, se evaluó si 3-OHbk podría alterar los diferentes parámetros del metabolismo mitocondrial, aparte del flujo de electrones a través la ETC. Para este fin, se estudiaron dos marcadores metabólicos en células tratadas con 3-OHbk (potencial de membrana mitocondrial,  $\Psi_{mt}$ , y contenido intracelular de ATP), los cuales, junto con el estudio de la actividad de la ETC, dan cuenta del metabolismo y funcionalidad de la mitocondria en nuestro modelo experimental. La **Figura 12** muestra que 3-OHbk indujo una disminución significativa en los dos parámetros señalados, luego de 4 horas de incubación, desde una concentración de 10  $\mu$ M. Además, se determinó el nivel de ATP intracelular total a las 2 horas, en ese caso la disminución fue solo efectiva a 20  $\mu$ M de 3-OHbk, lo que indica que es necesario que transcurra cierto tiempo para afectar la concentración de ATP intracelular.

La disminución de estos tres parámetros (**Figuras 10, 11 y 12**) metabólicos asociados a la función mitocondrial, dan cuenta en su conjunto, de una disminución en la fuerza protón motriz total de la cadena transportadora de electrones, lo que lleva finalmente a una disminución tanto de los niveles de ATP generados, como a un menor consumo de oxígeno.

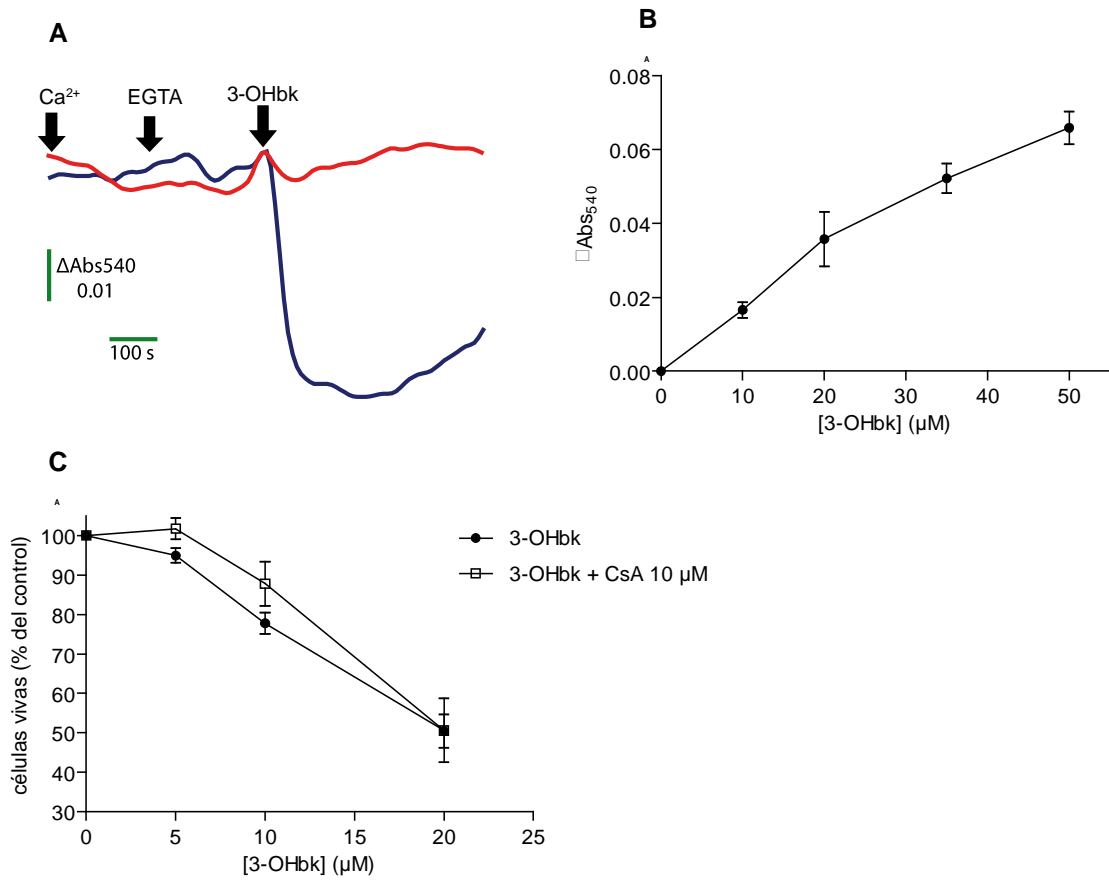
Un parámetro mitocondrial importante de disfunción mitocondrial, y que además induce de muerte celular, es la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP). Como cuarto parámetro de disfunción mitocondrial, se midió la apertura de MPTP en un modelo de mitocondrias aisladas de células TA3. En la **Figura 13** se observa que 3-OHbk induce una rápida disminución de la absorbancia a 540 nm, lo cual es un reflejo de la entrada de agua a la matriz mitocondrial, causando hinchamiento y disminución de la absorción de luz. Esta disminución de la absorbancia es inhibida completamente en presencia de ciclosporina A (CsA), que es un inhibidor específico de MPTP, lo cual indica que la

entrada masiva de agua a las mitocondrias se debe a la apertura de MPTP. Además, este fenómeno es dependiente de la concentración de 3-OHbk agregado. Sin embargo, CsA no inhibió la muerte celular inducida por 3-OHbk, por lo tanto, a pesar de que 3-OHbk induce la apertura de MPTP, este no es esencial para generar muerte celular.



**Figura 12. Efecto de 3-OHbk sobre el  $\Psi_{mt}$  y la concentración intracelular de ATP en células TA3.**

**(A)** Células TA3 fueron expuestas a DMSO, 3-OHbk 10  $\mu$ M y 3-OHbk 20  $\mu$ M por 4 horas (línea negra, roja y azul, respectivamente). Luego fueron incubadas con TMRM por 30 min y la fluorescencia roja fue analizada por citometría de flujo en el canal PE-A. Se muestra un histograma representativo del experimento. **(B)** Fluorescencias medias de cada condición (n=3 experimentos independientes). **(C)** niveles intracelulares de ATP ( $[ATP]_i$ ) medidos mediante ensayo de luminiscencia (n=4 experimentos independientes). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto al control.



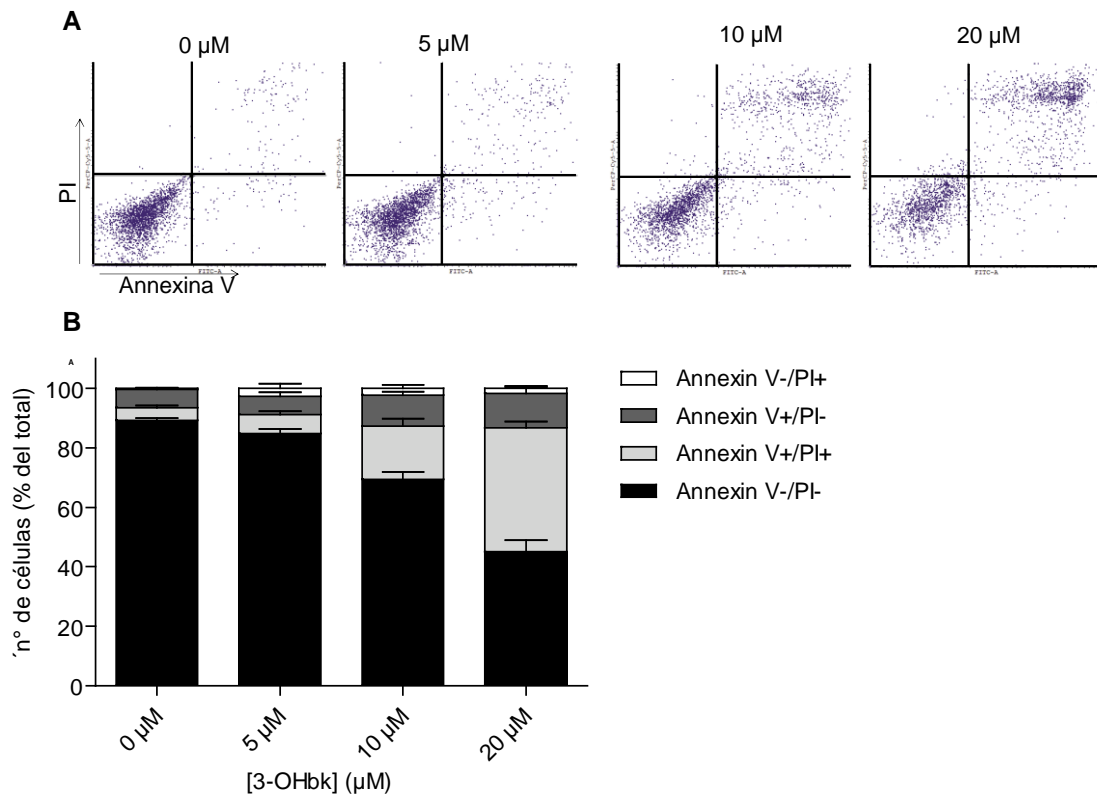
**Figura 13. Efecto de 3-OHbk sobre MPTP en mitocondrias aisladas de células TA3.**

**(A)** Mitocondrias aisladas (0,5 mg de proteína/ml) se preincubaron con Ca<sup>2+</sup>. Luego se agregó 3-OHbk 20 μM y se midió la absorbancia a 540 nm por 15 minutos. **(B)** Se calculó la diferencia entre la absorbancia antes y después de agregar las concentraciones indicadas de 3-OHbk (n=3 experimentos independientes). **(C)** Células incubadas con 3-OHbk y 3-OHbk + CsA 10 μM fueron incubadas por 24 h y se determinó el porcentaje de células vivas por la incorporación de PI y annexina V-FITC, y se analizaron por citometría de flujo. Las células vivas corresponden a las PI/annexina V (n=3 experimentos independientes).

### 6.5. Efecto de 3-OHbk sobre la muerte celular en células TA3.

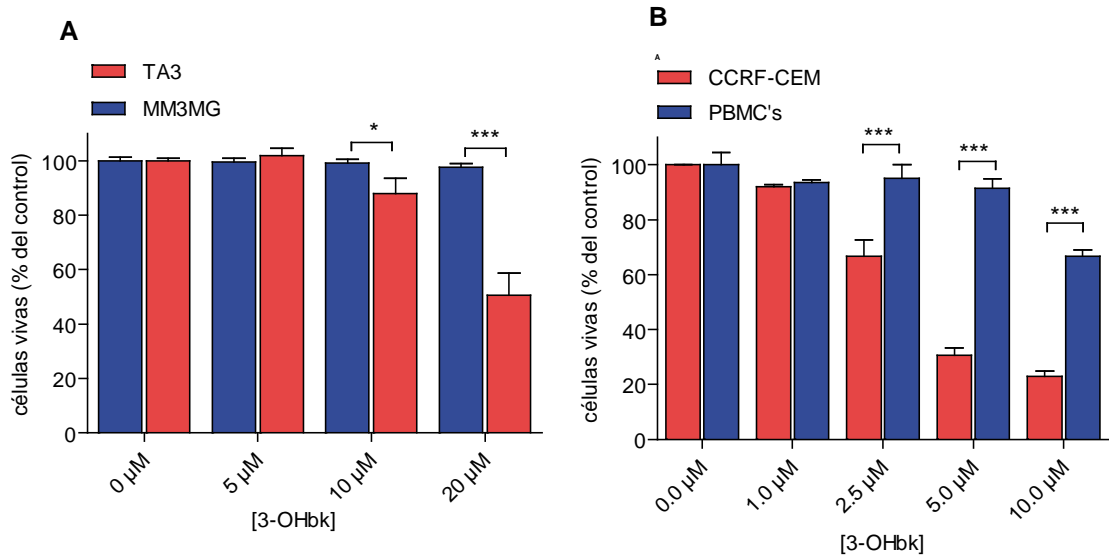
Está muy bien descrito que la inhibición de las funciones mitocondriales desencadenan muerte celular en una serie de modelos, ya sea por la generación de ROS o por la privación de ATP. Por lo tanto, estudiamos si 3-OHbk induce muerte celular en la línea celular TA3. En la **Figura 14** se observa que luego de 24 horas de incubación, de una forma dependiente de la concentración, 3-OHbk induce un aumento en la población PI+/annexina V+, lo cual indica que existe un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática (se incorpora PI) y una exposición de la fosfatidilserina, los cuales son los marcadores clásicos de muerte celular.

Además, como posible antineoplásico, 3-OHbk debería inducir muerte celular de manera específica en células malignas, y no normales, para lo cual evaluamos si 3-OHbk podría inducir la muerte en células cancerosas. Para responder esta interrogante, medimos la inducción de muerte celular mediante la incorporación de PI/annexina V en células TA3 y en células CCRF-CEM, y las comparamos con la muerte inducida en células normales de epitelio mamario de ratón (MM3MG), y con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs), respectivamente. En la **Figura 15** observamos que 3-OHbk incubado por 24 horas, al igual que lo indicado en la **Figura 14B**, induce muerte celular en células TA3, sin embargo este fenómeno no ocurre en su contraparte normal. Lo mismo se observa en la **Figura 15B**, donde se incubaron células CCRF-CEM y PBMCs con 3-OHbk por 24 horas, y solo se indujo muerte celular en las células de leucemia. Este resultado nos indica que 3-OHbk presenta, al menos en este modelo, especificidad por células cancerosas.



**Figura 14. Efecto de 3-OHbk en la muerte de células TA3.**

Células TA3 se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron con 3-OHbk a las concentraciones indicadas por 24 horas. Luego se analizó la incorporación de PI y annexina V por citometría de flujo. **(A)** gráficos de puntos de un experimento representativo ( $n=3$  experimentos independientes). **(B)** los porcentajes de cada cuadrante son presentados como el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  SEM.



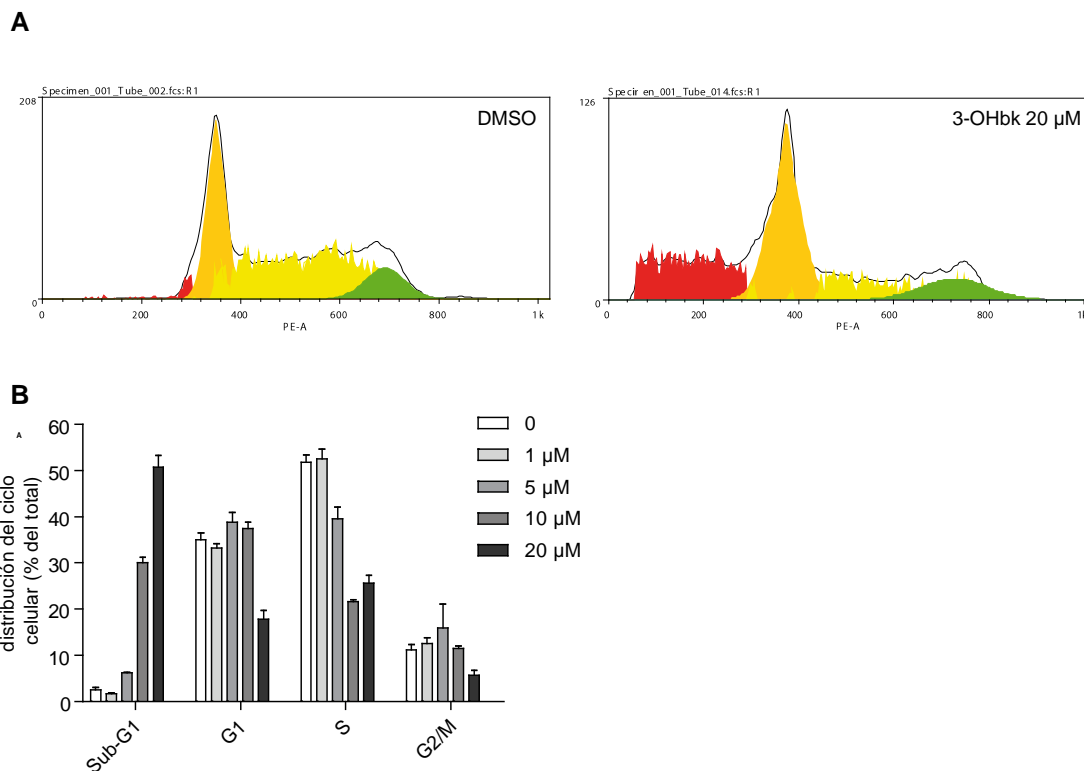
**Figura 15. Efecto de 3-OHbk sobre la muerte celular de células tumorales y normales.**

**(A)** Células TA3 (barras rojas) y MM3MG (barras azules) se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron con 3-OHbk por 24 horas a las concentraciones indicadas. Luego se analizó la incorporación de PI y annexina V por citometría de flujo (n=3 experimentos independientes). **(B)** Células CCRF-CEM (barras rojas) y PBMCs (barras azules) se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron con 3-OHbk por 24 horas a las concentraciones indicadas. Luego se analizó la incorporación de PI y annexina V por citometría de flujo (n=3 experimentos independientes). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Una serie de antineoplásicos ejercen su acción deteniendo el ciclo celular en alguna de sus etapas, por ejemplo, los derivados de camptotecina inhiben la topoisomerasa I, deteniendo el ciclo celular en la fase de replicación del DNA (fase S). Esto se ve reflejado en un aumento del número de células de una población en la fase S del ciclo, cuantificando el contenido de DNA de cada célula (Ulukan y Swaan 2002). Por esta razón, se analizó mediante citometría de flujo el efecto de 3-OHbk sobre el contenido de DNA de células TA3, para detectar si ocurre la acumulación de células en alguna fase del ciclo celular. Esta técnica además nos permite identificar la aparición de una población sub-G1 la cual indica la presencia de células con DNA fragmentado, que es un marcador de apoptosis, ya que cuando las células son permeabilizadas (por ejemplo con metanol), los fragmentos de 182bp de DNA difunden hacia el medio extracelular, resultando en la aparición de una población con el contenido de DNA reducido. Estas células permeabilizadas se pueden teñir con una sonda intercalante como yoduro de propidio (Chen, Lin et al. 2012).

Luego de 24 horas de incubación con 3-OHbk, no se observó acumulación de células TA3 en ninguna fase del ciclo celular, sin embargo, indujo la aparición de eventos sub-G1 de forma dependiente de la concentración, lo cual sugiere que hay una muerte del tipo apoptótico (**Figura 16**).





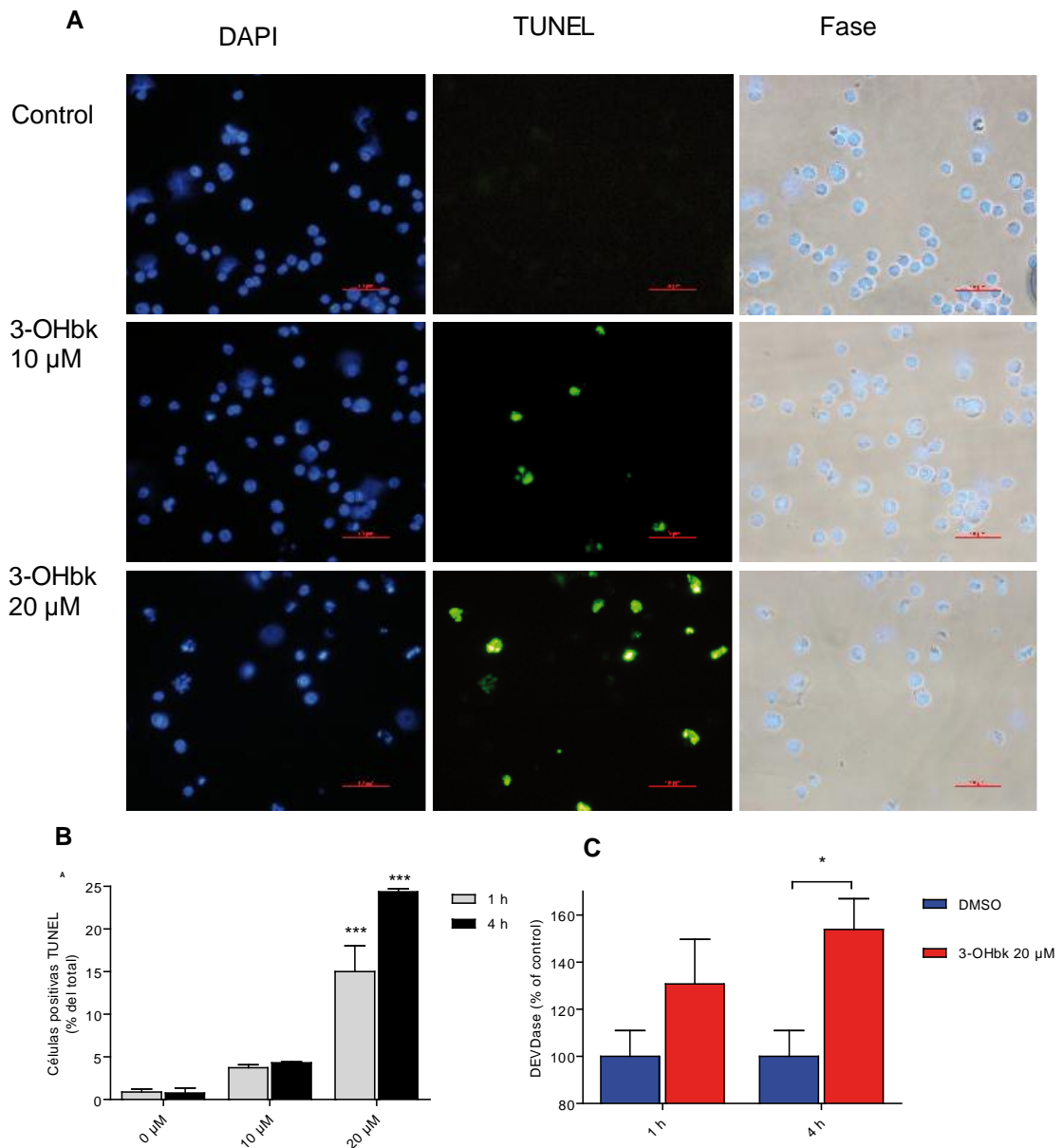
**Figura 16. Efecto de 3-OHbk sobre el ciclo celular de células TA3.**

Se incubaron células TA3 en placas de 24 pocillos, y se incubaron con las concentraciones indicadas de 3-OHbk por 24 horas. Luego se permeabilizaron con metanol y se les agregó PI para su posterior análisis por citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos de células incubadas con DMSO (izquierda) y 3-OHbk 20  $\mu$ M (derecha). La zona anaranjada corresponde a la fase G1, la amarilla a la fase S, la verde a la fase G2/M y la zona roja a la población sub-G1. **(B)** porcentaje de células de cada fase a las concentraciones indicadas de 3-OHbk (n=3 experimentos independientes).

El aumento de la población celular sub-G1 sugiere fuertemente que existe fragmentación de DNA nuclear. Para confirmar esto se realizó el ensayo de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) el cual detecta los extremos libres del DNA fragmentado en células apoptóticas.

3-OHbk indujo la aparición de células positivas a TUNEL luego de 1 hora de incubación con 3-OHbk 20  $\mu$ M, mientras que luego de 4 horas de incubación, esta cantidad aumentó **(Figura 17A, 17B)**.

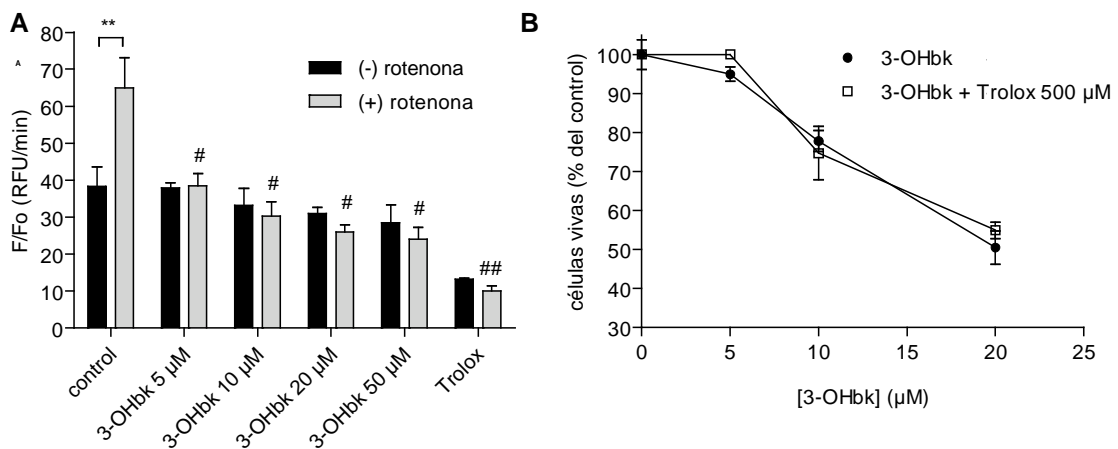
Además, se observó un aumento en la actividad de caspasa 3 luego de 4 horas de incubación con 3-OHbk, lo que sugiere que 3-OHbk induce apoptosis, la cual es responsable, al menos en parte, de la muerte celular inducida por el compuesto en células TA3 **(Figura 17C)**.



**Figura 17. Efecto de 3-OHbk sobre marcadores de apoptosis en células TA3.**

**(A)** Fotografías representativas de células TA3 incubadas con 3-OHbk por 4 horas a las concentraciones indicadas. Barra = 100 μm. **(B)** Los resultados de células incubadas por 1 y 4 horas están expresados como porcentaje de células positivas a TUNEL relativos al total de células teñidas con DAPI (n=4 experimentos independientes). **(C)** Se determinó la actividad del tipo caspasa 3 en lisados celulares totales mediante un ensayo colorimétrico que se basa en el corte de un sustrato sintético específico para caspasa 3 (DEVD) por 1 y 4 horas. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al control de solvente.

Varios inhibidores de la cadena transportadora de electrones mitocondrial inducen muerte celular a través de apoptosis por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para evaluar si 3-OHbk, al ser un inhibidor del flujo de electrones al nivel del complejo I, induce la generación de ROS, se midió la oxidación de DCFDA en células TA3, en presencia y ausencia de un generador de ROS que también inhibe el complejo I, rotenona. En la **Figura 18** se observó que rotenona si induce ROS, mientras que 3-OHbk no genera un aumento de estas especies, y además, en células incubadas con rotenona + 3-OHbk, los niveles de oxidación de DCFDA son similares al del control sin rotenona, lo que sugiere que 3-OHbk no induce ROS, y que además (o debido a) tiene efecto antioxidante sobre el ROS generado por un inhibidor del complejo I. Trolox<sup>®</sup>, un análogo hidrosoluble de la vitamina E, revirtió la formación de ROS en células TA3 inducidas por rotenona, sin embargo, no fue capaz de prevenir la muerte celular inducida por 3-OHbk; por lo tanto este resultado sugiere que ROS no está involucrado en la muerte celular inducida por 3-OHbk.

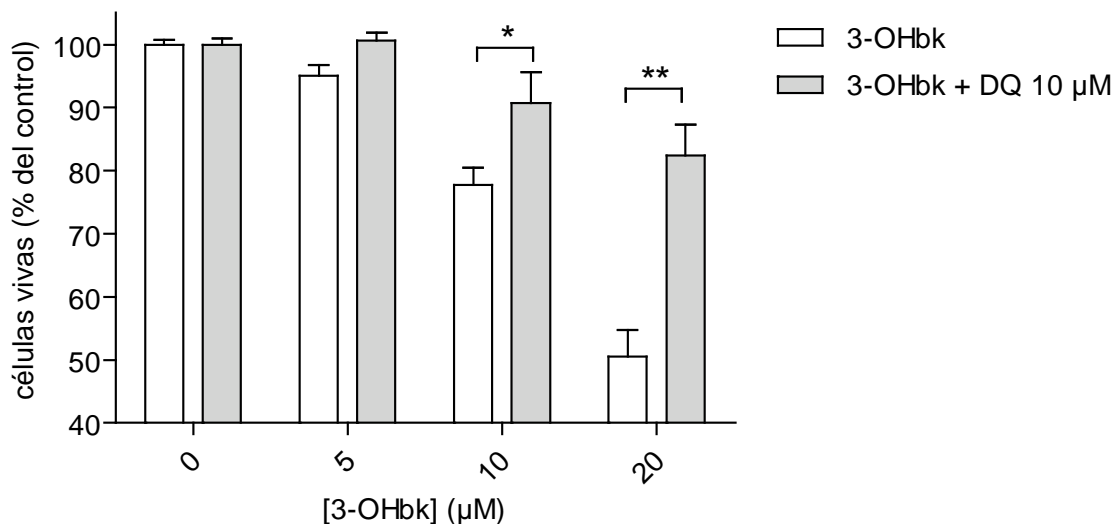


**Figura 18. Efecto de 3-OHbk en la generación de ROS en células TA3.**

(A) las células fueron incubadas con DCFDC (20 μM) por 15 minutos y se agregó a cada pocillo a las concentraciones indicadas de 3-OHbk, rotenona 50 μM y Trolox<sup>®</sup> 500 μM. El incremento en la fluorescencia se midió inmediatamente en un fluorómetro de placas (ex. 488 nm, em. 528 nm). Rotenona y Trolox<sup>®</sup> fueron usados como controles pro y anti oxidante, respectivamente. (B) Células incubadas con 3-OHbk y 3-OHbk + Trolox<sup>®</sup> 500 μM fueron incubadas por 24 horas y se determinó el porcentaje de células vivas por la incorporación de PI y unión de annexina V-FITC, y se analizaron por citometría de flujo. Las células vivas corresponden a las PI/annexina V<sup>-</sup> (n=3 experimentos independientes). \*\*p<0,01 con respecto al control de solvente; #p<0,01 con respecto a control con rotenona; ##p<0,001 con respecto a control con rotenona.

En las **Figuras 10 y 11** se observa que 3-OHbk inhibe el flujo de electrones mitocondrial, y que esta inhibición ocurre al nivel del complejo I. Si esta acción está involucrada en la muerte celular que 3-OHbk provoca, debería ser revertida si se restaura el flujo de electrones a través de la ETC. Para evaluar el papel de la inhibición de la ETC en la muerte celular inducida por 3-OHbk, se co-incubaron células TA3 con duroquinol, que es un sustrato sintético que entrega electrones directamente al complejo III y que restaura completamente el consumo de oxígeno acoplado a la síntesis de ATP en mitocondrias incubadas con 3-OHbk (**Figura 10**).

En la **Figura 19** se observa que la muerte celular inducida por 3-OHbk a las 24 horas de incubación es prevenida casi completamente cuando las células son incubadas con duroquinol, lo cual sugiere que la muerte celular es causada directamente por la inhibición de 3-OHbk sobre el complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial.



**Figura 19. Efecto del restablecimiento del flujo de electrones mitocondrial en la viabilidad de células TA3.**

Células incubadas con 3-OHbk y 3-OHbk + duroquinol 10 μM fueron incubadas por 24 horas y se determinó el porcentaje de células vivas por la incorporación de PI y annexina V-FITC, analizadas por citometría de flujo. Las células vivas corresponden a las PI<sup>-</sup>/annexina V<sup>-</sup> (n=3 experimentos independientes). \*p<0,05; \*\*p<0,01.

## 7. DISCUSIÓN

La mitocondria, es el principal organelo encargado del control del metabolismo celular, e integra el catabolismo de lípidos y carbohidratos para la mantención de los niveles energéticos celulares representados como moléculas de ATP. Esto es posible gracias al acoplamiento de las reacciones que se llevan a cabo durante el ciclo de Krebs (o ciclo del ácido tricarboxílico, TCA), la cadena transportadora de electrones, y ATP sintasa (Solaini, Sgarbi et al. 2011). El piruvato generado en la glicólisis entra desde el citoplasma a la mitocondria, y es transformado en acetil-CoA, el cual ingresa al ciclo TCA donde se oxida para formar CO<sub>2</sub>, NADH y FADH<sub>2</sub>. Los electrones de estas dos últimas moléculas ingresan al complejo I y II, respectivamente, para reducir la ubiquinona (Q), la cual entrega electrones al complejo III, el que los entrega al complejo IV por el citocromo c. El complejo IV entrega estos electrones al oxígeno molecular para formar agua. Este proceso de transporte de electrones bombea protones a través del complejo I, III y IV desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generando una gradiente electroquímica conocida como potencial de transmembrana mitocondrial, la que es utilizada por la ATP sintasa para generar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Brand y Nicholls 2011).

Una cantidad cada vez mayor de evidencia, sugiere que las células cancerosas tienen actividad mitocondrial disminuída (Penta, Johnson et al. 2001; Modica-Napolitano and Singh 2004; Rossignol, Gilkerson et al. 2004; Lopez-Rios, Sanchez-Arago et al. 2007; Putignani, Raffa et al. 2008; Solaini, Sgarbi et al. 2011). Esta disminución del metabolismo mitocondrial genera un aumento de la vía glicolítica, ya que ésta vía provee de los bloques de construcción y precursores necesarios para una proliferación descontrolada, que es característica de las células cancerosas (Jose, Bellance et al. 2011). Debido a esto, se han hecho varios esfuerzos para reducir la glicólisis de células tumorales en lugar de atacar a la fosforilación oxidativa. Sin embargo, debido a la dependencia de la hexoquinasa II al ATP mitocondrial, la ETC no tiene menos importancia, y aparece como un importante blanco terapéutico (Pedersen 2007; Mathupala, Ko et al. 2009; Solaini, Sgarbi et al. 2011). En esta tesis demostramos que un análogo estructural de bk, que es una

molécula ya conocida, tiene una actividad antiproliferativa varias veces superior sobre cuatro líneas celulares tumorales, induciendo una disminución en las funciones mitocondriales, e induciendo apoptosis, como se demostró por la fragmentación de DNA, activación de caspasa 3 y exposición de fosfatidilserina.

Se ha reportado que las quinonas y polifenoles inducen apoptosis en células cancerosas a través de la formación de ROS (Simamura, Hirai et al. 2006; Srinivas, Babykutty et al. 2007; Kumar, Aithal et al. 2009; Sagar y Green 2009; Bair, Palchaudhuri et al. 2010; Kovacic y Somanathan 2011), posiblemente a través de la activación de caspasas y otros blancos, disminuyendo los niveles de glutatión (GSH) y activando vías de señalización pro-apoptóticas (Curtin, Donovan et al. 2002; Higuchi 2004; Koka, Mondal et al. 2010), entre otros mecanismos. Por lo tanto, hay muchas explicaciones posibles para explicar las razones de la inducción de la muerte por 3-OHbk en células TA3. Por este motivo, esta tesis se centró en estudiar si la inhibición de la bioenergética tumoral, específicamente la cadena transportadora de electrones mitocondrial, podría ser responsable de este fenómeno.

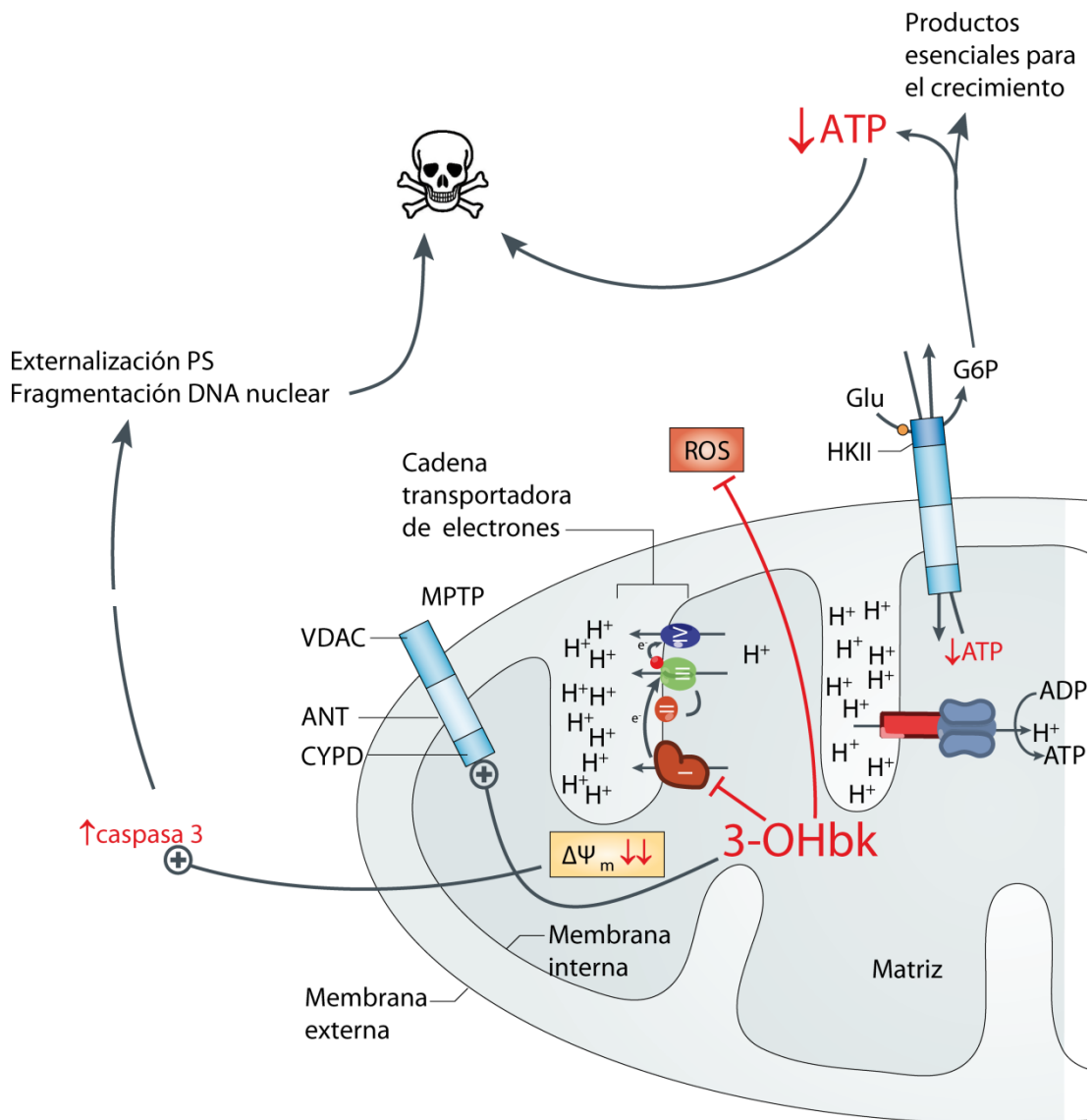
En mamíferos, el complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) es el principal punto de entrada de los electrones a la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Hirst 2010). Este oxida al NADH a  $\text{NAD}^+$ , reduce a la ubiquinona a ubiquinol, y usa la diferencia de potencial redox para mover protones a través de la membrana interna mitocondrial. Los protones transportados contribuyen a mantener la fuerza protón motriz ( $\Delta p$ ) que sostiene a la síntesis de ATP y a otros procesos de transporte. El complejo I es una fuente significativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Murphy 2009); por esto el complejo I está asociado con muchas patologías mitocondriales como resultado de una disminución de su actividad glicolítica y un aumento en la producción de ROS (Raha y Robinson 2000; Lin y Beal 2006).

En el complejo I aislado, hay suficiente evidencia de que ROS se produce solo por el mononucleótido de flavina reducido, el cofactor que oxida al NADH (Kusmaul y Hirst 2006). En un modelo *Bos taurus*, en la presencia de solamente

NADH, el complejo I aislado reduce  $O_2$  principalmente a superóxido, y menos del 10% es reducido directamente a  $H_2O_2$ . El superóxido producido dismuta rápidamente para producir  $H_2O_2$  (es un paso no-limitante) por lo tanto la producción de superóxido (y  $H_2O_2$ ) puede ser cuantificada adecuadamente midiendo la producción de  $H_2O_2$  (Kussmaul y Hirst 2006).

Hemos mostrado que en células TA3, 3-OHbk interrumpe el flujo de electrones actuando en el complejo I (**Figura 10, 11 y 20**), disminuyendo la velocidad de consumo de oxígeno y los niveles intracelulares de ATP (**Figura 12**). De hecho, en otros carcinomas metastásicos agresivos (HeLa, de páncreas CRL 1420, de mama MCF-7, de vejiga MB49) y células tumorales de osteosarcoma, algunos compuestos como casiopeína II-gly y rodaminas disminuyen el flujo de electrones a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, con la consecuente disminución de la proliferación celular (Moreno-Sanchez, Rodriguez-Enriquez et al. 2007). Por lo tanto, no es sorprendente que un polifenol como 3-OHbk, que inhibe el flujo de electrones, también induzca muerte celular en células de adenocarcinoma mamario TA3.

Al mismo tiempo, se observó la disminución del potencial de membrana mitocondrial,  $\Delta\Psi_m$ , lo cual se debe posiblemente a dos fenómenos: la inhibición del bombeo de protones hacia el espacio intermembrana a través de los complejos I, III y IV, y/o la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), fenómeno que también describimos en nuestro modelo de mitocondrias aisladas de células TA3. El hinchamiento mitocondrial observado experimentalmente (**Figura 13**) juega un rol muy importante en los procesos de necrosis y apoptosis (Green y Reed 1998; Jiang y Wang 2004), y puede ocurrir por la interacción cruzada de proteínas de las membranas mitocondriales y no por un poro constituido por proteínas específicas (Kim, He et al. 2003).



**Figura 20. Modelo de acción de 3-OHbk.**

3-OHbk inhibe el flujo de electrones mitocondrial a través de su interacción con el complejo I. Induce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) que está constituido por el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), el intercambiador de nucleótidos de adenina (ANT) y ciclofilina D (CYPD). La mitocondria posee un alto potencial de transmembrana ( $\Delta\Psi_m$ ), pero cuando 3-OHbk inhibe el flujo de electrones, el potencial de transmembrana también decae, disminuyendo la concentración de ATP intracelular total. Además se observó una activación de caspasa 3, la externalización de fosfatidilserina (PS) y la fragmentación del DNA nuclear, seguidos por la muerte celular.

Aunque han sido descritas diversas formas de permeabilización de la mitocondria en los últimos años, la naturaleza del ensamblaje de las proteínas que



forman el MPTP no está elucidada completamente. En el caso del MPTP dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y sensible a CsA, hay mucha evidencia de la participación de ANT (Adenine Nucleotide Exchanger), ciclofilina D, VDAC y posiblemente la hexoquinasa (Lequoc y Lequoc 1988; Galluzzi y Kroemer 2007; Kroemer, Galluzzi et al. 2007). La permeabilización mitocondrial inducida por 3-OHbk fue revertida completamente en presencia de CsA, indicando que este proceso está producido por MPTP y no por alguna permeabilización producida por otras proteínas.

Varios son los inhibidores de la OXPHOS que inducen ROS, un ejemplo es el fenetil isotiocianato, inhibidor del complejo III, que junto con el aumento de ROS, induce muerte celular (Xiao, Powolny et al. 2010); o el inhibidor del complejo I, rotenona (Moreno-Sanchez, Rodriguez-Enriquez et al. 2007), el cual aumenta la oxidación de DCFDA cuando se agrega a las células TA3. Sin embargo, al medir con esta misma técnica la formación de ROS por 3-OHbk, esta no pudo ser detectada (**Figura 18A**), lo que podría ser explicado por la naturaleza polifenólica de 3-OHbk, la cual le confiere propiedades antioxidantes; por lo tanto, sería capaz de prevenir la oxidación de la DCFDA por las ROS generadas por la inhibición del complejo I. Además, la co-incubación con Trolox<sup>®</sup>, un atrapador de ROS que disminuye la oxidación de DCFDA generada por rotenona, no es capaz de prevenir la muerte de células TA3 inducida por 3-OHbk. Por lo tanto, la muerte celular inducida por este compuesto se debe a otra causa (**Figura 18B**). Sin embargo no debemos perder de vista que la razón por la que 3-OHbk no induce ROS no está clara, y que existe una alta probabilidad de que efectivamente exista generación de ROS con un atrapamiento instantáneo, por lo que no sería posible detectarlo por medio de la oxidación de DCFDA, lo que deberá ser aclarado y/o confirmado en futuras investigaciones.

Si utilizamos un sustrato permeable a la membrana plasmática y a las membranas mitocondriales que sea capaz de entregar electrones a la ETC en un sitio posterior al sitio inhibido por 3-OHbk, deberíamos ser capaces de prevenir la muerte inducida por 3-OHbk en células TA3, sólo en el caso de que ésta inhibición sea la causante de esta muerte. Succinato es un sustrato que entrega electrones al complejo II, sin embargo no es capaz de atravesar la membrana plasmática intacta,

por lo tanto utilizamos duroquinol, que es un sustrato que entrega electrones al complejo III, saltándose la inhibición del complejo I provocada por 3-OHbk, restableciendo el transporte de electrones y el consumo de oxígeno. Esto demuestra que la inhibición del complejo I, con la consecuente inhibición del consumo de oxígeno, es la causa directa de la muerte celular inducida por 3-OHbk (**Figura 19**). Esta es una nueva explicación al fenómeno ampliamente descrito que ocurre al inhibir algún complejo de la ETC: en lugar de causar muerte por generación de ROS, la muerte está causada por una depleción de ATP; esto podría eliminar o prevenir los efectos no deseados que podría producir la generación de ROS como inductor de muerte celular.

En conclusión, la evidencia que entregan nuestros resultados muestra que 3-OHbk tiene una actividad antiproliferativa y antitumoral mayor que bk. Este efecto puede ser explicado por la inducción de la apoptosis como consecuencia de la inhibición del flujo de electrones mitocondrial al nivel del complejo I. Sin embargo, futuros estudios nos permitirán obtener la evidencia necesaria para conocer la capacidad antitumoral *in vivo* y su selectividad.

## 8. CONCLUSIONES

1. Las tres moléculas (bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA) son tóxicas para las líneas celulares murinas TA3, TA3-MTX-R y humanas CCRF-CEM Y CEM/C2, siendo 3-OHbk y 3-OHbk-DA las más potentes.
2. Las líneas celulares TA3-MTX-R y CEM/C2, que son resistentes a fármacos antineoplásicos, son similarmente sensibles que las líneas parentales que le dieron origen, a bk, 3-OHbk y 3-OHbk-DA.
3. En células TA3, 3-OHbk inhibe el flujo de electrones mitocondrial a nivel del complejo I, causando una alteración de la función mitocondrial. Sin embargo 3-OHbk-DA, en las condiciones experimentales utilizadas, no fue capaz de interactuar con este sistema.
4. La inhibición de la ETC mediada por 3-OHbk es capaz de inducir apoptosis, y este hecho no está mediado por la generación de ROS.
5. La muerte celular inducida por 3-OHbk es mucho mayor (>10 veces) en células cancerosas de ratón (TA3) y humanas (CCRF-CEM) que en células normales de ratón (MM3MG) y humanas (PBMC).

## 9. REFERENCIAS

- Araya-Maturana, R., W. Cardona, et al. (2006). "Effects of 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone derivatives on tumor cell respiration." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**(13): 4664-4669.
- Araya-Maturana, R., T. Delgado-Castro, et al. (2002). "Effects of 4,4-dimethyl-5,8-dihydroxynaphthalene-1-one and 4,4-dimethyl-5,8-dihydroxytetralone derivatives on tumor cell respiration." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**(9): 3057-3060.
- Bair, J. S., R. Palchoudhuri, et al. (2010). "Chemistry and biology of deoxyxyboquinone, a potent inducer of cancer cell death." *J Am Chem Soc* **132**(15): 5469-5478.
- Bapat, K., G. J. Chintalwar, et al. (2005). "Preparation and in vitro evaluation of radioiodinated bakuchiol as an anti tumor agent." *Applied Radiation and Isotopes* **62**(3): 389-393.
- Beckner, M. E., G. T. Gobbel, et al. (2005). "Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis." *Laboratory Investigation* **85**(12): 1457-1470.
- Bellance, N., G. Benard, et al. (2009). "Bioenergetics of lung tumors: Alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity." *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**(12): 2566-2577.
- Bernas, T. and J. Dobrucki (2002). "Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes." *Cytometry* **47**(4): 236-242.
- Berridge, M. V. and A. S. Tan (1993). "Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (Mtt) - Subcellular-Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron-Transport in Mtt Reduction." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303**(2): 474-482.
- Bouzier, A. K., P. Voisin, et al. (1998). "Glucose and lactate metabolism in C6 glioma cells: Evidence for the preferential utilization of lactate for cell oxidative metabolism." *Developmental Neuroscience* **20**(4-5): 331-338.
- Brand, M. D. and D. G. Nicholls (2011). "Assessing mitochondrial dysfunction in cells." *Biochemical Journal* **435**: 297-312.
- Bungard, D., B. J. Fuerth, et al. (2010). "Signaling Kinase AMPK Activates Stress-Promoted Transcription via Histone H2B Phosphorylation." *Science* **329**(5996): 1201-1205.
- Capuano, F., F. Guerrieri, et al. (1997). "Oxidative phosphorylation enzymes in normal and neoplastic cell growth." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **29**(4): 379-384.

- Cordano, G., J. Pezoa, et al. (2002). "Inhibitory effect of vanillin-like compounds on respiration and growth of adenocarcinoma TA3 and its multiresistant variant TA3-MTX-R." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **16**(4-5): 255-263.
- Cuezva, J. M., L. K. Ostronoff, et al. (1997). "Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **29**(4): 365-377.
- Curtin, J. F., M. Donovan, et al. (2002). "Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis." *J Immunol Methods* **265**(1-2): 49-72.
- Chen, K. F., J. P. Lin, et al. (2012). "Inhibition of Bcl-2 improves effect of LCL161, a SMAC mimetic, in hepatocellular carcinoma cells." *Biochemical Pharmacology* **84**(3): 268-277.
- Chen, Z., K. Jin, et al. (2010). "Anti-tumor effects of bakuchiol, an analogue of resveratrol, on human lung adenocarcinoma A549 cell line." *European Journal of Pharmacology* **643**(2-3): 170-179.
- da Silva, A. P. P., T. El-Bacha, et al. (2009). "Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate." *Biochemical Journal* **417**: 717-726.
- Dang, L., D. W. White, et al. (2010). "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate (vol 462, pg 739, 2010)." *Nature* **465**(7300): 966-966.
- Dave, Z., M. Byfield, et al. (2008). "Assessing mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis." *Methods* **46**(4): 319-323.
- Fantin, V. R., J. St-Pierre, et al. (2006). "Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance (vol 9, pg 425, 2006)." *Cancer Cell* **10**(2): 172-172.
- Ferreira, J., C. Wilkinson, et al. (1986). "The locus of inhibition of NADH oxidation by benzothiadiazoles in beef heart submitochondrial particles." *Biochemistry international* **12**(3): 447-459.
- Fones, E., H. Amigo, et al. (1989). "Tert-Butyl-4-Hydroxyanisole as an Inhibitor of Tumor-Cell Respiration." *Biochemical Pharmacology* **38**(20): 3443-3451.
- Formentini, L., I. Martinez-Reyes, et al. (2010). "The Mitochondrial Bioenergetic Capacity of Carcinomas." *Iubmb Life* **62**(7): 554-560.
- Frey, C., M. Pavani, et al. (2007). "Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes." *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **146**(4): 520-527.
- Galluzzi, L., S. A. Aaronson, et al. (2009). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes." *Cell Death and Differentiation* **16**(8): 1093-1107.
- Galluzzi, L. and G. Kroemer (2007). "Mitochondrial apoptosis without VDAC." *Nature Cell Biology* **9**(5): 487-489.

- Galluzzi, L., N. Larochette, et al. (2006). "Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy." *Oncogene* **25**(34): 4812-4830.
- Gogvadze, V., B. Zhivotovsky, et al. (2010). "The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells." *Molecular Aspects of Medicine* **31**(1): 60-74.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-1312.
- Griguer, C. E., C. R. Oliva, et al. (2005). "Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines." *Journal of Neuro-Oncology* **74**(2): 123-133.
- Hallak, M., T. Win, et al. (2009). "The anti-leukaemic activity of novel synthetic naphthoquinones against acute myeloid leukaemia: induction of cell death via the triggering of multiple signalling pathways." *British Journal of Haematology* **147**(4): 459-470.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Herst, P. M. and M. V. Berridge (2007). "Cell surface oxygen consumption: A major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1767**(2): 170-177.
- Hervouet, E., A. Cizkova, et al. (2008). "HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer." *Carcinogenesis* **29**(8): 1528-1537.
- Hervouet, E., J. Demont, et al. (2005). "A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis." *Carcinogenesis* **26**(3): 531-539.
- Higuchi, Y. (2004). "Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis." *J Cell Mol Med* **8**(4): 455-464.
- Hirst, J. (2010). "Towards the molecular mechanism of respiratory complex I." *Biochemical Journal* **425**: 327-339.
- Imlay, J. and I. Fridovich (1992). "Exogenous Quinones Directly Inhibit the Respiratory Nadh Dehydrogenase in Escherichia-Coli." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **296**(1): 337-346.
- Isidoro, A., M. Martinez, et al. (2004). "Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer." *Biochemical Journal* **378**: 17-20.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global Cancer Statistics." *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* **61**(2): 69-90.
- Jiang, X. J. and X. D. Wang (2004). "Cytochrome C-mediated apoptosis." *Annual Review of Biochemistry* **73**: 87-106.

- Jose, C., N. Bellance, et al. (2011). "Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma?" *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1807**(6): 552-561.
- Katsura, H., R. I. Tsukiyama, et al. (2001). "In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(11): 3009-3013.
- Kennedy, E. P. and A. L. Lehninger (1948). "Intracellular structures and the fatty acid oxidase system of rat liver." *J Biol Chem* **172**(2): 847.
- Kim, J. S., L. H. He, et al. (2003). "Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**(3): 463-470.
- Kim, Y. C., H. Oh, et al. (2005). "In vitro protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory phenols from the seeds of *Psoralea corylifolia*." *Planta Medica* **71**(1): 87-89.
- Koka, P. S., D. Mondal, et al. (2010). "Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species." *Exp Biol Med (Maywood)* **235**(6): 751-760.
- Kovacic, P. and R. Somanathan (2011). "Recent developments in the mechanism of anticancer agents based on electron transfer, reactive oxygen species and oxidative stress." *Anticancer Agents Med Chem* **11**(7): 658-668.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiological Reviews* **87**(1): 99-163.
- Kumar, M. R., K. Aithal, et al. (2009). "Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells." *Toxicol In Vitro* **23**(2): 242-250.
- Kusmaul, L. and J. Hirst (2006). "The mechanism of superoxide production by NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(20): 7607-7612.
- Labbe, C., F. Faini, et al. (1996). "Bakuchiol derivatives from the leaves of *Psoralea glandulosa*." *Phytochemistry* **42**(5): 1299-1303.
- Lequoc, K. and D. Lequoc (1988). "Involvement of the Adp/Atp Carrier in Calcium-Induced Perturbations of the Mitochondrial Inner Membrane-Permeability - Importance of the Orientation of the Nucleotide Binding-Site." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **265**(2): 249-257.
- Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Nature* **443**(7113): 787-795.
- Liu, Y. B., D. A. Peterson, et al. (1997). "Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction." *Journal of Neurochemistry* **69**(2): 581-593.

- Lopez-Rios, F., M. Sanchez-Arago, et al. (2007). "Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas." *Cancer Research* **67**(19): 9013-9017.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT." *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-275.
- Majeed, R., M. V. Reddy, et al. (2012). "Bakuchiol derivatives as novel and potent cytotoxic agents: A report." *European Journal of Medicinal Chemistry* **49**: 55-67.
- Marin-Hernandez, A., J. C. Gallardo-Perez, et al. (2009). "HIF-1 alpha Modulates Energy Metabolism in Cancer Cells by Inducing Over-Expression of Specific Glycolytic Isoforms." *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **9**(9): 1084-1101.
- Mathupala, S. P., Y. H. Ko, et al. (2009). "Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy." *Seminars in Cancer Biology* **19**(1): 17-24.
- Mathupala, S. P., Y. H. Ko, et al. (2010). "The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1797**(6-7): 1225-1230.
- Mazurek, S. (2011). "Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells." *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**(7): 969-980.
- Modica-Napolitano, J. S. and K. K. Singh (2004). "Mitochondrial dysfunction in cancer." *Mitochondrion* **4**(5-6): 755-762.
- Moreadith, R. W. and G. Fiskum (1984). "Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin." *Anal Biochem* **137**(2): 360-367.
- Moreno-Sanchez, R., S. Rodriguez-Enriquez, et al. (2007). "Energy metabolism in tumor cells." *Febs Journal* **274**(6): 1393-1418.
- Munoz, J. P., M. Chiong, et al. (2010). "Iron induces protection and necrosis in cultured cardiomyocytes: Role of reactive oxygen species and nitric oxide." *Free Radical Biology and Medicine* **48**(4): 526-534.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochemical Journal* **417**: 1-13.
- Nadege, B., L. Patrick, et al. (2009). "Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis." *Frontiers in Bioscience* **14**: 4015-4034.
- Naranmandura, H., S. Xu, et al. (2011). "Mitochondria Are the Main Target Organelle for Trivalent Monomethylarsonous Add (MMA(III))-Induced Cytotoxicity." *Chemical Research in Toxicology* **24**(7): 1094-1103.
- Niemann, S. and U. Muller (2000). "Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3." *Nature Genetics* **26**(3): 268-270.



- Oudard, S., E. Boitier, et al. (1997). "Gliomas are driven by glycolysis: Putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure." *Anticancer Research* **17**(3C): 1903-1911.
- Park, E. J., Y. Z. Zhao, et al. (2007). "Bakuchiol-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through c-Jun NH2-terminal kinase-mediated mitochondrial translocation of Bax in rat liver myofibroblasts." *European Journal of Pharmacology* **559**(2-3): 115-123.
- Parra, V., V. Eisner, et al. (2008). "Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis." *Cardiovasc Res* **77**(2): 387-397.
- Pavani, M., E. Fones, et al. (1994). "Inhibition of Tumoral Cell Respiration and Growth by Nordihydroguaiaretic Acid." *Biochemical Pharmacology* **48**(10): 1935-1942.
- Pedersen, P. L. (1978). "Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells." *Progress in experimental tumor research* **22**: 190-274.
- Pedersen, P. L. (2007). "The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: An overview." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**(1): 1-12.
- Pedersen, P. L. (2007). "Warburg, me and hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**(3): 211-222.
- Pedersen, P. L., S. Mathupala, et al. (2002). "Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1555**(1-3): 14-20.
- Penta, J. S., F. M. Johnson, et al. (2001). "Mitochondrial DNA in human malignancy." *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* **488**(2): 119-133.
- Perales, J. B., N. F. Makino, et al. (2002). "Convergent stereocontrol in Peterson olefinations. Application to the synthesis of (+/-)-3-hydroxybakuchiol and corylifolin." *Journal of Organic Chemistry* **67**(19): 6711-6717.
- Plaza, C., M. Pavani, et al. (2008). "Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid and its tetra-acetylated derivative on respiration and growth of adenocarcinoma TA3 and its multiresistant variant TA3MTX-R." *In Vivo* **22**(3): 353-361.
- Plecita-Hlavata, L., M. Lessard, et al. (2008). "Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1777**(7-8): 834-846.
- Pollard, P. J., J. J. Briere, et al. (2005). "Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations." *Human Molecular Genetics* **14**(15): 2231-2239.

- Putignani, L., S. Raffa, et al. (2008). "Alteration of expression levels of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) in breast cancer cell mitochondria." *Breast Cancer Research and Treatment* **110**(3): 439-452.
- Raha, S. and B. H. Robinson (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing." *TRENDS in Biochemical Sciences* **25**(10): 502-508.
- Reitzer, L. J., B. M. Wice, et al. (1979). "Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells." *J Biol Chem* **254**(8): 2669-2676.
- Rodriguez-Enriquez, S., L. Carreno-Fuentes, et al. (2010). "Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma." *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**(10): 1744-1751.
- Rodriguez-Enriquez, S., A. Marin-Hernandez, et al. (2009). "Targeting of cancer energy metabolism." *Molecular Nutrition & Food Research* **53**(1): 29-48.
- Rossignol, R., R. Gilkerson, et al. (2004). "Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells." *Cancer Research* **64**(3): 985-993.
- Sagar, S. and I. R. Green (2009). "Pro-apoptotic activities of novel synthetic quinones in human cancer cell lines." *Cancer Lett* **285**(1): 23-27.
- Sanchez-Arago, M., M. Chamorro, et al. (2010). "Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression." *Carcinogenesis* **31**(4): 567-576.
- Sanchez-Cenizo, L., L. Formentini, et al. (2010). "Up-regulation of the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) of the Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP Synthase in Human Tumors Mediates the Metabolic Shift of Cancer Cells to a Warburg Phenotype." *Journal of Biological Chemistry* **285**(33): 25308-25313.
- Simamura, E., K. Hirai, et al. (2006). "Furanonaphthoquinones cause apoptosis of cancer cells by inducing the production of reactive oxygen species by the mitochondrial voltage-dependent anion channel." *Cancer Biol Ther* **5**(11): 1523-1529.
- Smiraglia, D. J., M. Kulawiec, et al. (2008). "A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus." *Cancer Biology & Therapy* **7**(8): 1182-1190.
- Smolkova, K., N. Bellance, et al. (2010). "Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **42**(1): 55-67.
- Smolkova, K., L. Plecita-Hlavata, et al. (2011). "Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells." *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**(7): 950-968.
- Solaini, G., G. Sgarbi, et al. (2011). "Oxidative phosphorylation in cancer cells." *Biochim Biophys Acta* **1807**(6): 534-542.
- Srinivas, G., S. Babykutty, et al. (2007). "Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent." *Med Res Rev* **27**(5): 591-608.

- Ulukan, H. and P. W. Swaan (2002). "Camptothecins - A review of their chemotherapeutic potential." *Drugs* **62**(14): 2039-2057.
- Warburg, O. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." *Science* **124**(3215): 269-270.
- Wellen, K. E., G. Hatzivassiliou, et al. (2009). "ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation." *Science* **324**(5930): 1076-1080.
- Willers, I. M., A. Isidoro, et al. (2010). "Selective inhibition of beta-F1-ATPase mRNA translation in human tumours." *Biochemical Journal* **426**: 319-326.
- Xiao, D., A. A. Powolny, et al. (2010). "Phenethyl isothiocyanate inhibits oxidative phosphorylation to trigger reactive oxygen species-mediated death of human prostate cancer cells." *J Biol Chem* **285**(34): 26558-26569.

**ANEXO**

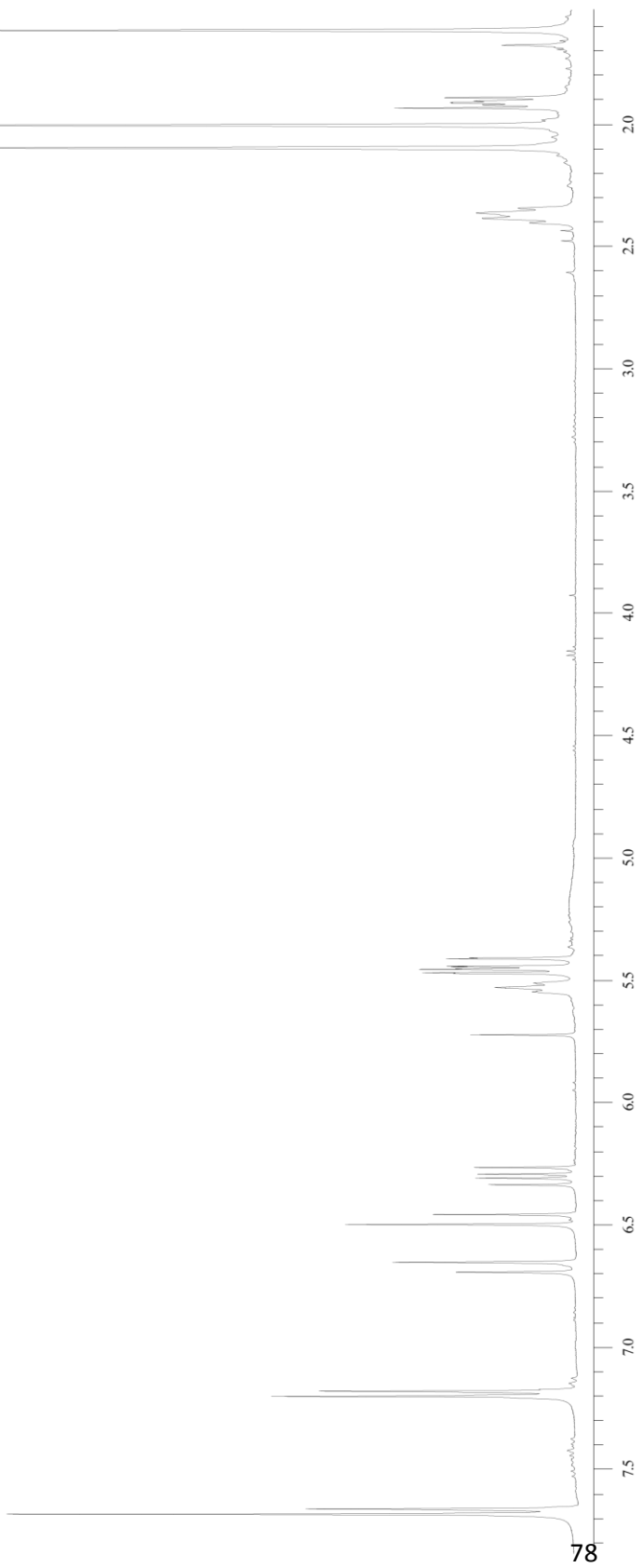
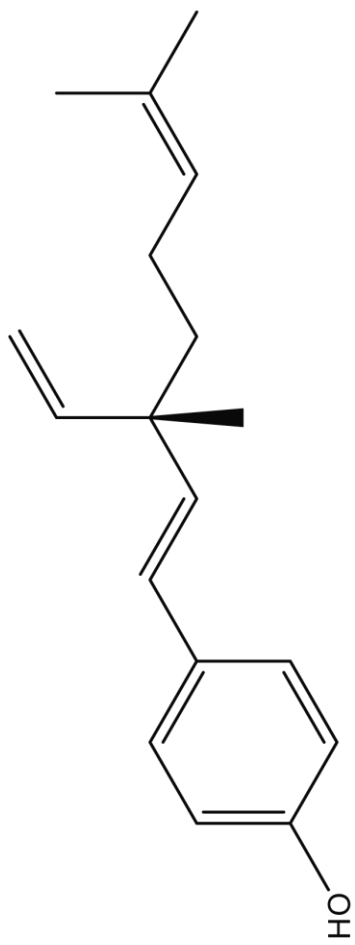
<sup>1</sup>H- RMN

BAKUCHIOL

3-HIDROXIBAKUCHIOL

3-HIDROXIBAKUCHIOL DIACETILADO





Current Data Parameters  
 NAME 1H\_0107  
 EXPNO 80  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20070130  
 Time 12.42  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Multinucl  
 PULPROG zg30  
 TD 16384  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 32  
 DS 2  
 SH 5411.255 Hz  
 FIDRES 0.330277 Hz  
 AQ 1.5139316 sec  
 RG 161.3  
 DH 92.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 300.0 K  
 D1 1.00000000 sec

\*\*\*\*\* CHANNEL f1 \*\*\*\*\*  
 NUC1 1H  
 P1 11.00 usec  
 PL1 10.00 dB  
 SFO1 300.1321009 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 300.1300071 MHz  
 EN  
 MDN 0  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

ID NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 CY 0.00 cm  
 F1P 10.320 ppm  
 F1 3097.21 Hz  
 F2P -0.755 ppm  
 F2 -226.58 Hz  
 PPMCM 0.55373 ppm/cm  
 HZCM 166.16954 Hz/cm

CU X

353.65  
 472.96  
 501.26  
 659.16

2037.10

Hz

