



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE CATIONES LIPOFÍLICOS DESLOCALIZADOS
DERIVADOS DE ÁCIDOS POLI HIDROXI BENZOICOS COMO
AGENTES CITOTÓXICOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA
HUMANAS.**

SEBASTIÁN ANDRÉS FUENTES RETAMAL
MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Directores de Memoria

Dr. Jorge Ferreira Parker
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa de Farmacología
Molecular y Clínica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. José Jara Sandoval
Instituto de Investigación en
Ciencias Odontológicas
Unidad de Farmacología
Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante

Dr. Ramiro Araya Maturana
Departamento de Química
Orgánica y Fisicoquímica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile
2015

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.
Es un viaje, nunca una llegada”

Karl R. Popper

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su abnegada labor y por ser el apoyo y guía constante que me ha permitido conseguir cada uno de mis objetivos. Mis logros sólo son el reflejo de su incansable entrega, dedicación y sacrificio. A mis hermanos, Pablo y José Antonio por ser dos pilares fundamentales en mi vida.

A todo el equipo de laboratorio que me permitió aprender y desarrollar con éxito cada una de las actividades involucradas en esta memoria, así como también por incentivar la prosecución de mi formación académica. En especial a mis directores de memoria por la confianza depositada y la labor realizada.

FINANCIAMIENTO

La presente Memoria contó con el apoyo financiero de los Proyectos FONDECYT Regular N°1130772 y PIA N° 791220004. Fue realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Aspectos generales del cáncer	5
1.2. Reprogramación metabólica en células tumorales	6
1.3. Rol mitocondrial en la muerte celular	9
1.4. Compuestos dirigidos hacia la mitocondria	11
1.5. Cáncer de mama	13
1.6. Cationes lipofílicos derivados de ácidos mono y dihidroxibenzoicos	14
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivos generales	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Reactivos	19
4.2. Compuestos en estudio	19
4.3. Propagación y obtención de células tumorales TA3/Ha	19
4.4. Cultivo celular	19
4.5. Determinación de la viabilidad celular	20
4.6. Ensayo de formación de colonias	21
4.7. Determinación del efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre el consumo de oxígeno mitocondrial	21
4.8. Determinación del efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la respiración celular	22
4.9. Determinación del contenido mitocondrial	22
4.10. Determinación de niveles mitocondriales de anión superóxido	23

4.11. Determinación del potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante TMRE	23
4.12. Determinación del cambio en potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante safranina O	24
4.13. Determinación de los niveles de ATP	24
4.14. Incorporación de yoduro de propidio	25
4.15. Determinación de los niveles intracelulares de NAD(P)H	25
4.16. Determinación del tipo de muerte celular inducida.....	26
4.17. Determinación de la migración celular.....	26
4.18. Determinación teórica de pKa	27
4.19. Análisis estadístico.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Los derivados de alquilhidroxibenzoatos estudiados ejercen actividad citotóxica en líneas tumorales de cáncer de mama.....	28
5.2. La clonogenicidad de células tumorales se ve afectada por Gent TPP ⁺ C ₁₀ y 2-OH TPP ⁺ C ₁₀	31
5.3. Los derivados de alquilhidroxibenzoatos alteran el metabolismo tumoral mediante el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones de la ATP sintasa.....	34
5.4. Determinación del aumento del consumo de oxígeno producto de la acción de los derivados estudiados en suspensiones de mitocondrias aisladas murinas y humanas	37
5.5. Análisis comparativo de la población mitocondrial	40
5.6. Los compuestos en estudio no inducen la producción de anión superóxido mitocondrial.....	41
5.7. Los alquilhidroxibenzoatos inducen una disminución del potencial de transmembrana mitocondrial.....	44
5.8. Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre parámetros bioenergéticos en células tumorales MCF7 y MDA-MB-231	49
5.8.1. Medición de la caída de NAD(P)H producto del efecto desacoplante ..	49
5.8.2. Medición de la caída de ATP producto de la acción de los derivados en estudio	52
5.8.3. La caída del nivel de ATP inducida por Gent TPP ⁺ C ₁₀ es compensada por la acción de Adenilato Kinasa y AMPK.....	56
5.9. Evaluación del tipo de muerte inducida por los alquilhidroxibenzoatos en células MCF7 y MDA-MB-231	60
5.10. 2-OH TPP ⁺ C ₁₀ y Gent TPP ⁺ C ₁₀ presentan selectividad frente a células epiteliales mamarias humanas.....	64
5.11. Los compuestos estudiados afectan la migración en células tumorales metastásicas MDA-MB-231	69

6. DISCUSIÓN.....	72
7. CONCLUSIÓN.....	83
8. ANEXOS.....	85
8.1. Figuras suplementarias.....	85
9. REFERENCIAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Principales metabolitos de Aspirina.....	15
Figura 2:	Cationes lipofílicos deslocalizados en estudio.	17
Figura 3:	Efecto de derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la viabilidad en células MCF7, AU565, MDA-MB-231, BT-549.....	29
Figura 4:	Efecto de derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la capacidad clonogénica en células MCF7.....	32
Figura 5:	Efecto de alquilhidroxibenzoatos derivados sobre la capacidad clonogénica en células MDA-MB-231	33
Figura 6:	Efecto de los derivados sobre el consumo de oxígeno en células MCF7.....	35
Figura 7:	Efecto de los derivados sobre el consumo de oxígeno en células MDA-MB-231.....	36
Figura 8:	Efecto de los derivados sobre el consumo de oxígeno en una suspensión de mitocondrias de TA3/Ha en estado 3 inhibido por oligomicina.	38
Figura 9:	Efecto de Gent TPP ⁺ C ₁₀ sobre el consumo de oxígeno en una suspensión de mitocondrias de MCF7 en estado 3 inhibido por oligomicina.....	39
Figura 10:	Análisis comparativo de la población mitocondrial en células MCF 10F, MCF7 y MDA-MB-231	40
Figura 11:	Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la producción de anión superóxido en células de la línea MCF7	42
Figura 12:	Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la producción de anión superóxido en células de la línea MDA-MB-231	43
Figura 13:	Efecto de los derivados sobre el potencial de transmembrana mitocondrial en MCF7.....	45
Figura 14:	Determinación de la pérdida potencial de transmembrana mitocondrial a través de safranina O en células MCF7	46
Figura 15:	Determinación de la pérdida potencial de transmembrana mitocondrial a través de safranina O en células MDA-MB-231.....	47
Figura 16:	Determinación de la acción ATPásica sobre la pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial en células	48
Figura 17:	Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre los niveles de NAD(P)H en células MCF7.....	50
Figura 18:	Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre los niveles de NAD(P)H en células MDA-MB-231	51
Figura 19:	Efecto de los derivados sobre el contenido de ATP en células MCF7.....	53
Figura 20:	Efecto de los derivados sobre el contenido de ATP en células MDA-MB-231	54
Figura 21:	Incorporación de PI a 4 horas en células MCF7.....	55
Figura 22:	Incorporación de PI a 4 horas en células MDA-MB-231.....	58
Figura 23:	Efecto compensatorio de adenilatokinasa en la caída de ATP inducida por Gent TPP ⁺ C ₁₀	58

Figura 24:	Efecto compensatorio de AMPK en la caída de ATP inducida por Gent TPP ⁺ C ₁₀	58
Figura 25:	Efecto sobre el tipo de muerte celular en MCF7.	61
Figura 26:	Efecto sobre el tipo de muerte celular en MDA-MB-231.	62
Figura 27:	Efecto sobre el tipo de muerte celular en MDA-MB-231 a 24 y 48 horas.....	63
Figura 28:	Selectividad de los derivados de alquilhidroxibenzoatos frente a la línea de epitelio mamario MCF 10F.....	66
Figura 29:	Comparación de la muerte inducida por los derivados de alquilhidroxibenzoatos en células MCF 10F y MCF7.....	67
Figura 30:	Efecto compensatorio de adenilato kinasa en la caída de ATP inducida por Gent TPP ⁺ C ₁₀ en células MCF 10F y MCF7.	68
Figura 31:	Efecto compensatorio de AMPK en la caída de ATP inducida por Gent TPP ⁺ C ₁₀ en células MCF 10F y MCF7.....	68
Figura 32:	Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la migración en células MDA-MB-231	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Efecto de derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la proliferación en células MCF7, AU565, MDA-MB-231 y BT-549	30
Tabla 2:	Determinación del efecto compensatorio de AMPK en la viabilidad celular.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1:	Efecto de digitonina sobre la viabilidad en células MCF7 y MDA-MB-23185
Figura suplementaria 2:	Efecto de Ap5A sobre el contenido de ATP en células MCF7 y MDA-MB-23186
Figura suplementaria 3:	Efecto de dorsomorfina sobre el contenido de ATP en células MCF7 y MDA-MB-23186
Figura suplementaria 4:	Efecto de dorsomorfina sobre la viabilidad en células MCF7 y MDA-MB-23187

ABREVIATURAS

AMP	:	Adenosín monofosfato
ADP	:	Adenosín difosfato
ATP	:	Adenosín trifosfato
AV	:	Anexina V
Ap5A	:	P ¹ ,P ⁵ -Di(Adenosina-5')Pentafosfato
BrdU	:	5-bromo-2-desoxiuridina
CCCP	:	Carbonil-cianuro- <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CTE	:	Cadena transportadora de electrones
DMEM HG	:	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle alto en glucosa
DMEN/F12	:	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle: mezcla de nutrientes F12
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
GLU	:	Glutamato
HEPES	:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HER2	:	Receptor de factor de crecimiento epidermal humano
MAL	:	Malato
MIF	:	Mediana de la intensidad de fluorescencia
MTT	:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADH	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido
NAD⁺	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Oxidado
NADPH	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido
NAD(P)H	:	NADH y NADPH
OCR	:	Tasa de consumo de oxígeno
OLIGO	:	Oligomicina
PBS	:	Amortiguador fosfato salino

ABREVIATURAS

Ph₃P	:	Trifenilfosfano
PI	:	Yoduro de propidio
PMM	:	Permeabilización de la membrana mitocondrial
RE	:	Receptor de estrógeno
ROS	:	Especies reactivas de oxígeno
ROT	:	Rotenona
RP	:	Receptor de progesterona
RPMI 1640	:	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SFB	:	Suero fetal bovino
SFE	:	Suero fetal equino
STS	:	Estaurosporina
TMRE	:	Tetrametilrodamina etil éster
UFR	:	Unidad de fluorescencia relativa
VDAC	:	Canal aniónico dependiente de voltaje
$\Delta\Psi_m$:	Potencial de membrana mitocondrial
2-OH TPP⁺C₁₀	:	(10-((2-hidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
2,3-diOH TPP⁺C₁₀	:	(10-((2,3-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
Gent TPP⁺C₁₀	:	(10-((2,5-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
TPP⁺C₁₀	:	(10-((3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
Gent C₁₀	:	Decil 2,5-dihidroxibenzoato

RESUMEN

Estudios previos han demostrado que derivados del ácido gálico unidos a trifenilfosfonio mediante una cadena alifática de diez carbonos son efectivos agentes citotóxicos, desacoplando la cadena transportadora de electrones del complejo ATP sintasa mitocondrial en células de adenocarcinoma murinas. En el presente trabajo se demostró dicho efecto en células de cáncer de mama humano, así como también se determinó la relación estructura-actividad de derivados de este compuesto.

Fueron analizados derivados mono- y di-hidroxilados del ácido benzoico en diferentes líneas celulares de cáncer de mama humanas, las cuales se diferencian en su perfil metabólico y en la expresión de receptores de crecimiento y hormonales.

Se observó que dos de los nuevos derivados presentan un mayor efecto citotóxico que los previamente estudiados, los cuales son 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀, debido a una mayor actividad desacoplante de la fosforilación oxidativa.

En forma exhaustiva fueron estudiadas las líneas celulares, MCF7 caracterizada por la presencia de receptores hormonales y la línea MDA-MB-231, la cual posee un fenotipo triple negativo con características metastásica y un metabolismo altamente glicolítico. Se evidenció que los derivados presentan un tropismo mitocondrial, afectando las funciones de este organelo debido a que son capaces de desencadenar una disminución del potencial de transmembrana mitocondrial, lo que conlleva a una disminución de la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺ y una caída del ATP total, parcialmente compensada por la actividad de AMP-kinasa y adenilato kinasa. Como consecuencia, se desencadena una muerte de tipo apoptótica. Además, se observó que los derivados son capaces de inhibir la migración celular en la línea metastásica.

La selectividad de estos compuestos fue evaluada al comparar el efecto citotóxico con la línea mamaria epitelial MCF 10F, demostrando que los compuestos

2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀ presentan selectividad a las concentraciones utilizadas, ya que no inducen una muerte significativa a las 48 horas, ni una caída del ATP total en las condiciones analizadas.

Como conclusión, todas las moléculas analizadas presentan actividad citotóxica similar en células de cáncer de mama humanas; además, la modificación realizada al grupo farmacóforo la aumenta.

SUMMARY

STUDY OF DESLOCALIZED LIPOPHILIC CATIONS DERIVATIVES OF POLYHYDROXY BENZOIC ACIDS AS CYTOTOXIC AGENTS IN BREAST HUMAN CANCER CELLS.

Previous studies have shown that gallic acid derivatives bound to an aliphatic chain of ten carbons length to triphenylphosphonium are effective cytotoxic agents, inducing an uncoupler effect to the electron transport chain of the mitochondrial ATP synthase complex in murine adenocarcinoma cells. The present work displays the effect of these derivatives in human breast cancer cells, as well as the study of the structure-activity relationship derived from these compounds.

Mono- and di-hydroxyl derivatives of benzoic acid were analyzed in different human breast cancer cell lines, which differ in their metabolic profile, hormone receptors expression and growth.

It was observed that two new derivatives exhibit greater cytotoxic effect than those previously studied, which are: 2-OH TPP⁺C₁₀ and Gent TPP⁺C₁₀, due to an increased activity of uncoupling oxidative phosphorylation process.

Two cell lines were exhaustively studied, MCF7 characterized by the presence of hormone receptors and MDA-MB-231, which has a triple negative phenotype, metastatic features and a highly glycolytic metabolism. It was demonstrated that the derivatives possess a mitochondrial tropism, affecting the functions of this organelle because they are capable of triggering a decrease in mitochondrial transmembrane potential, leading to a decrease in NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratio and drop of total ATP, partially offset by the activity of AMP-kinase and adenylate kinase. As a result, the intrinsic apoptotic death via is triggered. It was further noted that the derivatives are capable of inhibiting cell migration in metastatic cell line.

SUMMARY

The selectivity of these compounds was evaluated by comparing the cytotoxic effect with MCF 10F mammary epithelial cell line, showing that compounds 2-OH TPP⁺C₁₀ and Gent TPP⁺C₁₀ revealed selectivity at the concentrations used, as they did not induce significant death at 48 hours of treatment, or a drop of the total ATP in the conditions analyzed.

In conclusion, all tested molecules shown similar cytotoxic activity on breast human cancer cell lines where, the modification in the pharmacophore moiety increased this activity.

1. INTRODUCCIÓN

Aspectos generales del cáncer

El cáncer no es una enfermedad puntual, sino un grupo de enfermedades caracterizadas por una rápida y descontrolada proliferación de células anormales. Éstas no responden a la regulación de procesos como el crecimiento, la proliferación y sobrevida celular.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, se estima que en el año 2012 hubo 14,1 millones de nuevos casos y causó 8,2 millones de muertes [1]. Además cabe destacar que un 48% de los casos prevalentes en los últimos cinco años fueron registrados en regiones menos desarrolladas [2].

Según el reporte entregado el año 2014 por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, se ha estimado que dentro de 20 años, la incidencia de cáncer aumentará a 20 millones por año y el número de decesos aumentará a 13 millones en el mismo lapso de tiempo. Este fenómeno, que se desarrollará en un porcentaje importante en países en desarrollo se debe al envejecimiento y aumento de la población, así como también a los hábitos adquiridos tras conseguir mejores niveles de vida.

En Chile el cáncer es la segunda causa de muerte, en el año 2012 se registraron 40 mil nuevos casos y 25 mil muertes por esta enfermedad. Representando aproximadamente un 25,1% del total de los decesos. En mujeres el cáncer de mayor incidencia es el cáncer de mama, representando el 25,2% de todos los nuevos casos de cáncer y da cuenta de alrededor del 14,7% de las muertes asociadas a cáncer. En cuanto a la prevalencia, el cáncer de mama da cuenta de más del 40,1% de los cánceres entre las mujeres chilenas [1, 2].

Es por esto, que el conocimiento actual de algunas de las características propias de las células tumorales puede ayudar a la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos que se traduzcan en el aumento del arsenal farmacológico disponible para el tratamiento de estas patologías. Pues las células tumorales han mostrado una alta resistencia a los fármacos actualmente utilizados en clínica, debido a que su actividad es altamente dependiente del fenotipo presente en las células tumorales de cáncer de mama, lo que se traduce en una terapia antineoplásica de efectividad limitada. Es por ello que resulta interesante la búsqueda e investigación de nuevas herramientas terapéuticas que permitan aumentar tanto la eficacia, como la selectividad de los tratamientos.

Reprogramación metabólica en células tumorales

Las células tumorales presentan un metabolismo de la glucosa muy diferenciado a una célula normal, pues un porcentaje muy elevado del ATP producido es a través de la glicolisis en desmedro de la fosforilación oxidativa, pese a la existencia de niveles normales de oxígeno. Este patrón del metabolismo ha sido denominado “glicólisis aeróbica”, comúnmente conocido como efecto Warburg [3].

La producción de ATP por la vía glicolítica pareciera representar una desventaja para una célula en crecimiento, pues mediante esta vía se producen dos moles de este nucleótido por mol de glucosa, en comparación a los 36 moles de ATP producidos por mol de glucosa mediante la fosforilación oxidativa. Pero este cambio metabólico pareciera proporcionar a la célula tumoral elementos necesarios para su exacerbada condición anabólica, pues metabolitos de glucosa son destinados a la producción de lípidos, aminoácidos y nucleótidos requeridos para la proliferación celular [4]. Además, esta vía alternativa permite generar cantidades suficientes de NADPH, el cual es un regulador crítico en el potencial redox celular.

Producto del efecto Warburg se crea un microambiente acidificado, el cual es tóxico para las células normales y favorece la invasión de células tumorales [5].

Si bien, defectos en la fosforilación oxidativa y mutaciones del ADN mitocondrial presentes en líneas celulares parecieran explicar el efecto Warburg, ésta no es una condición generalizada, pues se ha comprobado que en algunas líneas tumorales la maquinaria fosforilativa se encuentra funcional [6].

Se ha comprobado que mutaciones en oncogenes, supresores de tumores y cambios en proteínas relacionadas con la traducción de señales conllevan al cambio metabólico. Myc, Ras, Akt, PI3K y el factor HIF estimulan la actividad glicolítica [7]. El factor de transcripción Myc activa la transcripción de numerosas enzimas glicolíticas, entre ellas PI3K a través de la señalización de Akt y mTOR promueven la expresión de transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas [8]. La oligomerización de HIF, desencadena un incremento en la expresión de transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas, así como también la inhibición de rutas metabólicas conducentes a la activación de la fosforilación oxidativa [9, 10].

Además, se ha demostrado que la pérdida de la función de genes supresores de tumores contribuye a la generación del efecto Warburg. La pérdida de actividad de PTEN desencadena un aumento de la señalización de PI3K, promoviendo la vía glicolítica. La actividad de P53 inhibe la vía glicolítica a través de la estimulación de la isoforma TIGAR de la enzima fosfofructoquinasa [11], además de inducir directamente la respiración mitocondrial a través de la activación del gen *SCO2* el cual es necesario para el ensamblaje del complejo IV mitocondrial, citocromo c oxidasa [12]. Además, más de la mitad de los tipos de cáncer humano presenta P53 mutado [13], por ello la pérdida en su funcionalidad, desencadena la disminución de la respiración mitocondrial con un aumento de la función glicolítica.

Por otra parte, se ha determinado que la activación de AKT está involucrada en la génesis de numerosos tipos cáncer [14], pues es capaz de inducir la glicolisis mediando la fosforilación de la hexokinasa II (HK-2), lo cual permite la asociación con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana mitocondrial externa [15]. La isoforma HK-2 es capaz de anclarse a la membrana mitocondrial, esta enzima cataliza la

primera fosforilación de la glucosa para obtener como sustrato glucosa-6-fosfato impidiendo con ello, su salida de la célula. Por su cercana unión a la mitocondria, HK-2 adquiere características que le permiten una alta actividad constitutiva y por ende, incrementa el flujo glicolítico en desmedro de la fosforilación oxidativa. Esta enzima posee una afinidad 100 veces mayor por glucosa que HK-4. La asociación de HK-2 con VDAC provee algunos beneficios cinéticos que facilitan su actividad catalítica, pues esta isoforma posee una mayor afinidad, de aproximadamente 5 veces, por ATP [16], además de no ser inhibida por el producto generado. La unión estrecha a la mitocondria otorga además, un acceso preferencial al ATP generado por la oxidación fosforilativa [17], y difundido a través del canal aniónico hacia el citoplasma [18]. Esta característica tiene especial importancia, pues la acción de esta enzima es exclusivamente dependiente de la función mitocondrial. Como última característica, se ha descrito que las HK-1 y HK-2 presentan dos dominios para fosforilar glucosa, pero sólo la HK-2 es capaz de retener la actividad catalítica en ambos dominios [19]. Por todo lo anteriormente señalado, se puede deducir que la alta expresión de esta enzima contribuye a un metabolismo glicolítico exacerbado.

Por otra parte, la actividad del proceso de fosforilación oxidativa en las células tumorales es potentemente regulada por inhibidores endógenos de la ATP-sintasa. El inhibidor IF1 es expresado tanto en células normales como tumorales. Sin embargo, se ha comprobado su sobreexpresión en diversos tipos de células tumorales; tales como, en células de cáncer de mama, pulmón y colon [20]. Su función ha sido descrita como un inhibidor de la actividad hidrolasa del complejo V mitocondrial y es dependiente de la acidificación del pH de la matriz mitocondrial [21, 22]. Cuando esto ocurre, la dimerización de este péptido es capaz de unirse a β -F1-ATPasa para prevenir el gasto inútil de energía en periodos de déficit de nutrientes [21, 23]. Sin embargo, se ha descrito que en células tumorales este péptido se torna insensible a cambios de pH [21] y su actividad gatilla una disminución de la actividad fosforilativa de H^+ -ATP sintasa, una reestructuración mitocondrial [24] que desencadena en la acentuación de la glicolisis aeróbica y un aumento en el potencial de transmembrana [20].

Rol mitocondrial en la muerte celular

La mitocondria además de su función metabólica, juega un rol importante en el ciclo de vida celular, pues media la vía intrínseca en la muerte apoptótica. Esta vía es activada por señales de estrés y daño celular, entre las que se incluyen daño en el ADN, privación de factores de crecimiento, activación de oncogenes y estrés oxidativo. Esta actividad “suicida” permite asegurar la eliminación rápida y segura de células defectuosas, antes que éstas se conviertan en un peligro. En contraparte, la evasión de la apoptosis es una de las propiedades características del cáncer, y la inhibición de la vía apoptótica es necesaria para la tumorigénesis [25].

Durante el proceso de la apoptosis intrínseca, existen numerosos factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos que se integran y convergen a la membrana externa mitocondrial, esto pues la permeabilización de esta membrana (PMM) es un paso crítico en el desarrollo de este tipo de muerte. Tal permeabilización de la membrana externa desencadena la liberación de citocromo c y otras proteínas apoptogénicas, como SMAC/Diablo y AIF desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol [26].

El citocromo c es una pequeña proteína que juega un importante rol en la cadena respiratoria al ser el transportador de electrones entre los complejos III y IV. Una vez liberado al citosol, media la apoptosis mediante la activación irreversible de la cascada mediada por caspasas que llevarán a la muerte celular [26, 27].

La familia Bcl-2 representa un grupo de proteínas claves en la regulación de la inducción de PMM. Todas ellas se caracterizan por la presencia de dominios de homología Bcl-2 (BH) y son clasificadas de acuerdo a su actividad pro-apoptótica o anti-apoptótica. Las proteínas pro apoptóticas a su vez se subdividen en efectoras, donde se encuentran BAX y BAK, las cuales son capaces de inducir directamente PMM; y las proteínas que contienen sólo un dominio BH, llamadas BH3-only, cuya función se caracteriza por la inhibición de factores anti-apoptóticos. Las proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl-2,

Bcl-xL y MCL-1, ejercen su función a través de la unión a las proteínas pro-apoptóticas, impidiendo así la PMM y por lo tanto el desarrollo de la apoptosis [28].

Una vez activados, BAX es capaz de dirigirse desde el espacio citosólico a la mitocondria, y junto con BAK se insertan en la membrana externa, formando homooligómeros, induciendo así la formación de un poro a través del cual el citocromo c y otras proteínas mitocondriales son liberadas. Una vez liberado, el citocromo c interactúa con la proteína APAF1 para formar el apoptosoma, el cual gatilla la activación de la caspasa-3 y la caspasa-9; con ello la activación de la cascada apoptótica que terminará en la muerte celular [28, 29].

Se ha descrito además, que células de tumores humanos presentan defectos en la apoptosis intrínseca, lo que compromete la eliminación de estas células alteradas, permitiendo con ello el continuo crecimiento de estas células. Se ha demostrado que defectos en la apoptosis intrínseca juegan un importante rol en la metástasis y la quimioresistencia [30, 31]. La desregulación normal de esta función se produce por dos mecanismos principales, la sobreexpresión o sobreactivación de proteínas anti apoptóticas y la disminución o pérdida de función de proteínas pro-apoptóticas. La sobreexpresión de Bcl-2 ha sido determinada en numerosos casos de patologías hematopoyéticas, como también en un tumor sólido incluyendo los cáncer de próstata, colorectal, pulmonar y gástrico [30, 31]. La sobreexpresión de Bcl-X_L y MCL-1 también han sido detectado en un numerosos tipos de cáncer [30]. Todo lo anterior, ha permitido concluir que una elevada expresión de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas se correlaciona en algunos casos con un aumento en la resistencia tumoral al tratamiento con quimioterapia [30].

La desregulación de este tipo de muerte, también se puede ocasionar por defectos anteriores a la acción de las proteínas Bcl-2 y PMM. El caso más conocido es la pérdida de función de P53, cuya activación como respuesta a un daño en el DNA y otros estresores está inactivado por mutación u otros mecanismos en sobre el 50% de los cáncer humanos [32, 33].

Estudios farmacológicos han demostrado que, inhibidores de la cadena transportadora de electrones o el desacoplamiento del sistema de generación del $\Delta\Psi_m$ conducen a una pérdida del $\Delta\Psi_m$, el cual es un elemento clave en el desarrollo normal de distintas funciones de este organelo. Cuando esto ocurre, se ha evidenciado un incremento de la permeabilidad de la membrana interna, la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la pérdida de la capacidad de almacenaje de calcio, impidiendo la homeostasis de este catión lo cual desencadena en la activación de factores pro-apoptóticos [34].

Compuestos dirigidos hacia la mitocondria.

Entre las principales funciones de la mitocondria son la regulación del metabolismo a través de la síntesis de ATP, la regulación de calcio citosólico, producción de ROS y regulación de la muerte celular. Para todas ellas, este organelo necesita mantener un gradiente electroquímico dado por la diferencia de concentración de protones entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial, los cuales están separados por la membrana interna mitocondrial la cual es impermeable a ellos. Esta característica otorga una carga negativa al lado interno de la membrana mitocondrial, lo que permite que cationes que presenten la capacidad de atravesar membranas se puedan acumular. Este potencial de transmembrana, se ha determinado que es entre 2 a 6 veces superior a cualquier otro organelo, incluida la membrana plasmática, alcanzando alrededor de 170 mV [35]. Es por ello que ha sido utilizado para dirigir selectivamente compuestos catiónicos a la mitocondria, pues la ley de Nernst predice que por cada 60 mV de diferencia de voltaje en el potencial de membrana, la acumulación de compuestos aumenta en cerca de 10 veces [36].

Las primeras evidencias de que cationes pueden acumularse selectivamente en la membrana interna mitocondrial, fueron dadas por el uso de Rodamina 123, la cual se caracteriza por presentar una porción catiónica unida a una región apolar, lo que permite

dirigirse y acumularse hasta 500 veces al interior del organelo [37, 38]. Se ha comprobado que sales de trifenilfosfonio (TPP^+) mantienen este mismo patrón e inicialmente fueron utilizadas para demostrar la existencia del potencial electroquímico en las membranas mitocondriales [39]. Moléculas cargadas, generalmente son incapaces de atravesar membranas sin la existencia de un transportador proteico, debido a la gran energía de activación que requiere remover las moléculas de agua asociadas a estas moléculas. Sin embargo, la distribución de la carga a través de una larga porción lipofílica presente en el catión deslocalizado trifenilfosfonio se traduce en energías significativamente menores facilitando su paso a través de membranas lipídicas [40]. Por esta razón, el ion TPP^+ ha sido utilizado como una porción molecular capaz de dirigir a un farmacóforo selectivamente hacia la mitocondria. Esta técnica ha sido utilizada en antioxidantes mitocondriales, como son Mito-Q [41] y MitoVit-E [42], derivados de la coenzima Q y la vitamina E respectivamente, unidos a una porción TPP^+ , los cuales han demostrado ser antioxidantes mitocondriales más efectivos que sus moléculas parentales. Además ha sido utilizada para dirigir antimicrobianos contra bacterias Gram positivos y negativos [43], antiparasitarios contra *T. cruzi* [44], y anti glicémicos [45].

Por otra parte, se ha descrito que las mitocondrias de algunas líneas celulares tumorales, presentan un $\Delta\Psi_m$ aún más elevado que el incluso presentado en células de tejidos excitables [37], esta característica permitiría que los cationes lipofílicos deslocalizados se acumulen preferentemente en mitocondrias de células tumorales, incrementando con ello la selectividad de las moléculas hacia las células cancerosas y evitando la toxicidad hacia células normales [46, 47]. La primera evidencia de compuestos antiproliferativos unidos a TPP^+ fue realizada en 1978, donde se comprobó que sales de isoindolilalquil fosfonio presentaron una potente actividad anti leucémica [48]. Posteriormente, se demostró que compuestos unidos a TPP^+ pueden ser empleados como agentes de contraste en imágenes de diagnóstico [49, 50]. Esto último demostró que estos agentes son capaces de acumularse preferencialmente dentro del tumor, sin ejercer efectos citotóxicos inducidos por el catión fosfonio.

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres, es una enfermedad heterogénea que presenta diversas características biológicas y comportamientos clínicos. Los subtipos clínicos se clasifican de acuerdo a la presencia o ausencia de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), y el receptor de factor de crecimiento epidermal humano (HER2). Así el cáncer de mama se divide en luminal A (RE-RP positivo y HER2 negativo), luminal B (RE-RP positivo y HER2 positivo), HER2 sobre-expresado (RE-RP negativo y HER2 positivo), triple negativo (RE-RP negativo, HER2 negativo) y “normal-like” (RE-RP negativo, HER2 negativo) caracterizado por presentar un origen celular no epitelial [51, 52]. La mayoría de los cánceres de mama presentan el receptor de estrógeno (>60%) [53], mientras que el 20% de ellos, no presentan ninguno de estos receptores, siendo este tipo de cáncer el que presenta una prognosis clínica más desfavorable [54].

Actualmente no existe una alternativa terapéutica contra los cinco subtipos de cáncer de mama, pues los actuales tratamientos usados en clínica se basan en la presencia de alguno de los receptores ya descritos. Por esta misma razón no existe un tratamiento efectivo contra las células triples negativas. Es más, el cáncer de mama triple negativo, ha demostrado ser considerablemente más agresivo. Al compararlas con líneas celulares positivas para RE, se ha comprobado que las líneas triples negativas exhiben un consumo de oxígeno mitocondrial ampliamente reducido, y un consumo de glucosa y producción de lactato considerablemente altas [55].

Una estrategia para concebir un tratamiento efectivo para estos cuatro subtipos celulares es dirigir la investigación hacia un punto en común. En este sentido surge la mitocondria como posible blanco terapéutico, pues se han comprobado las alteraciones que presenta en las células cancerosas y las consecuencias que desencadena la alteración de sus funciones normales.

Sin embargo, se debe destacar que los receptores hormonales y de crecimiento ya descritos tienen funciones relacionadas con el metabolismo mitocondrial. El receptor de estrógeno, es capaz de estimular la transcripción de complejos respiratorios [56], inhibir la permeabilización del poro de transmembrana mitocondrial [56] e inhibir la apoptosis intrínseca [57]. En cambio el receptor HER2 es capaz de promover el efecto Warburg a través de la activación de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDH-A), disminuyendo así la acción fosforilativa de la mitocondria [58].

En el presente trabajo, fueron estudiadas en forma exhaustiva las líneas tumorales de cáncer de mama humanas MCF7, la cual se caracteriza por presentar el receptor de estrógeno, ausencia del receptor HER2 y poseer p53 sin mutaciones [59, 60]. La línea MDA-MB-231, la cual corresponde a una línea triple negativa, que destaca por su capacidad metastásica, p53 mutado [60]. Además, para ver la efectividad de los compuestos estudiados se analizó la línea BT-549, una segunda línea triple negativa, que presenta p53 mutado [60] y la línea AU565, caracterizada por presentar al receptor HER2 y la ausencia de los receptores hormonales para estrógeno y progesterona, además de presentar p53 sin mutaciones [60].

Cationes lipofílicos derivados de ácidos mono- y dihidroxibenzoicos

Con el fin de obtener nuevos tratamientos terapéuticos que cumplan con las características ya señaladas, se evaluaron en el presente trabajo cuatro cationes lipofílicos deslocalizados con acción mitocondrial.

Estudios anteriores realizados demostraron la acción citotóxica de derivados de ácido gálico unidos a trifenilfosfonio mediante una cadena carbonada, siendo la longitud óptima de ésta, diez átomos de carbono ($\text{TPP}^+\text{C}_{10}$). Este compuesto es capaz de inducir una muerte de tipo apoptótica en células tumorales murinas producto de alteraciones en las funciones mitocondriales normales [61].

En el presente estudio, se evaluó el comportamiento de TPP^+C_{10} en células tumorales de cáncer de mama humanas. Además de tres nuevos derivados utilizando como farmacóforo ácidos mono y dihidroxilados. Estos nuevos compuestos corresponden a ésteres derivados del metabolismo de aspirina [62] (**Figura 1**), el ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), y pirocatéquico (ácido 2,3-dihidroxibenzoico), unidos a un grupo trifenilfosfonio mediante una cadena saturada de diez carbonos (**Figura 2**).

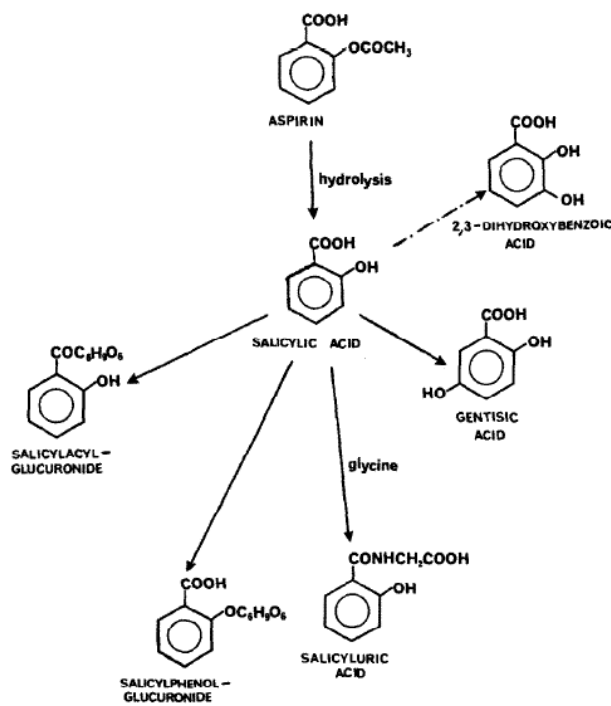


Fig. 1. Major reported metabolites of salicylic acid.

Figura 1: Principales metabolitos de aspirina [62]

El ácido salicílico, un fármaco ampliamente usado como antiinflamatorio no esterooidal presenta además actividad antitumoral. Se han demostrado distintos mecanismos por los cuales ejercen dicha acción. Éste ácido es capaz de desencadenar alteraciones a nivel mitocondrial [63], lo cual conduce a una disminución en la síntesis de ATP, estrés oxidativo [64] y pérdida del potencial de transmembrana [65], como también ser un inhibidor catalítico de la topoisomerasa II [66].

Por su parte el ácido gentísico ha demostrado poseer actividad inhibitoria tanto en el crecimiento de tumores, como en el desarrollo de estrés oxidativo en modelos *in vivo* [67, 68]. Además de inhibir la producción de prostaglandinas, en respuesta a lipopolisacáridos a través de la inhibición de la vía COX [69].

Al igual que el compuesto anterior, el ácido pirocatéquico destaca por su actividad antioxidante, actuando como atrapador de peróxido de hidrogeno, lo que reduce la activación de NFκB, el cual juega un importante rol en procesos de inflamación [70]. Este derivado ha sido ampliamente estudiado como quelante en casos de sobredosis de hierro en pacientes talasémicos [62].

Se postula que la incorporación de un grupo trifenilfosfonio mediante la esterificación de los ácidos ya mencionados por una cadena saturada de diez carbonos será capaz de potenciar su actividad citotóxica, otorgándole una mayor selectividad frente a células tumorales. Además se dilucidará como la actividad citotóxica es modulada mediante la modificación, tanto del número como la posición de los hidroxilos en el grupo farmacóforo.

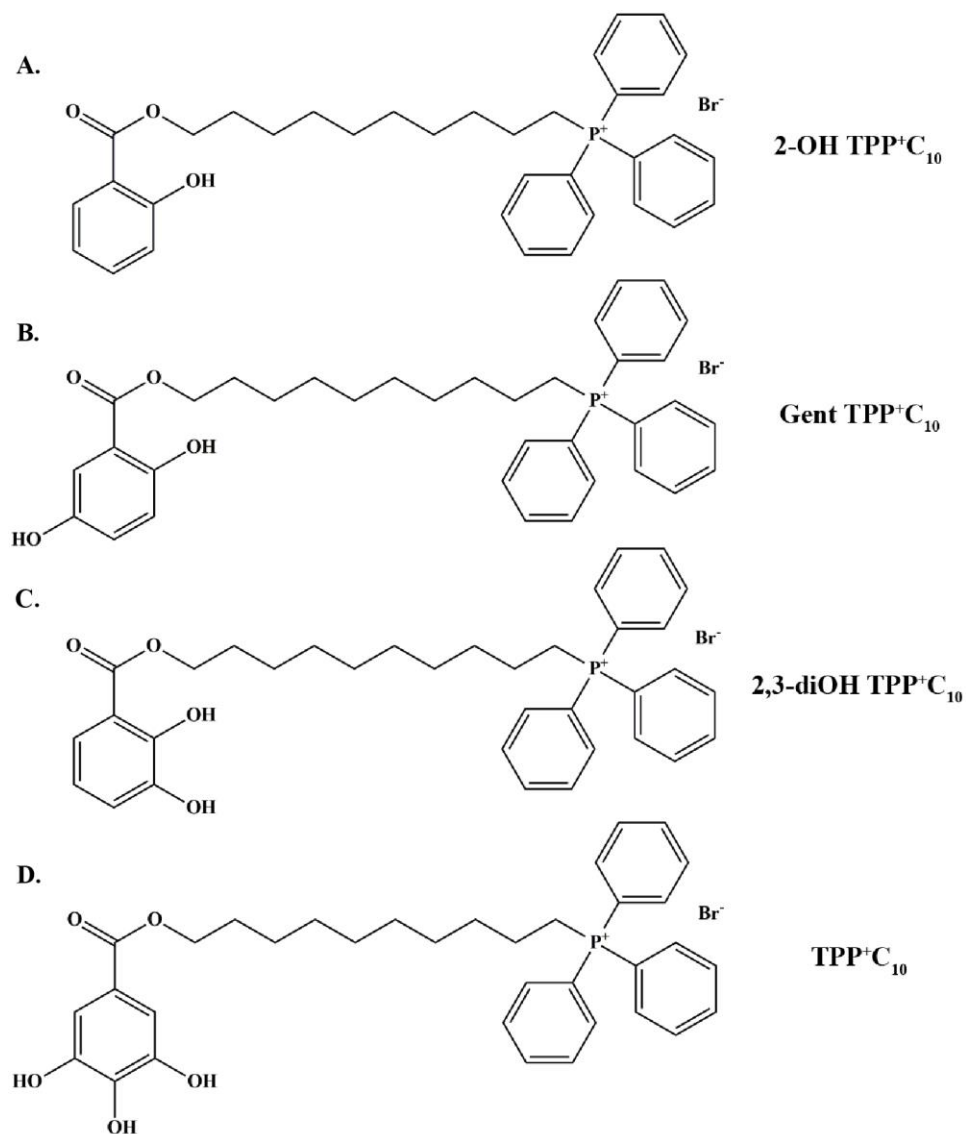


Figura 2. Cationes lipofílicos deslocalizados en estudio.

- | | |
|---|--|
| (A) 2-OH TPP ⁺ C ₁₀ | (10-((2-hidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio |
| (B) Gent TPP ⁺ C ₁₀ | (10-((2,5-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio |
| (C) 2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀ | (10-((2,3-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio |
| (D) TPP ⁺ C ₁₀ | (10-((3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio |

2. HIPÓTESIS

Los cationes lipofílicos deslocalizados derivados de alquilpolihidroxibenzoatos presentan actividad citotóxica selectiva en células tumorales de cáncer de mama humana respecto a células normales, al ejercer un efecto desacoplante entre el complejo ATP sintasa y la cadena transportadora de electrones.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico y establecer la relación estructura actividad de los derivados de alquilhidroxibenzoatos en células de cáncer de mama humano.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la citotoxicidad de los derivados de alquilpolihidroxibenzoatos en líneas tumorales y comparar su efecto con células normales de mama humanas.
2. Determinar el efecto desacoplante de los derivados de alquilpolihidroxibenzoatos en células tumorales de mama humanas y mitocondrias aisladas de adenocarcinoma mamario de ratón
3. Evaluar el efecto sobre el potencial de transmembrana mitocondrial, generación de ROS y los niveles de ATP y NAD(P)H en células tumorales de mama humanas.
4. Valorar el efecto de los derivados de alquilpolihidroxibenzoatos sobre la migración en células metastásicas de cáncer de mama humanas.
5. Evaluar la inducción de necrosis o apoptosis por las moléculas en estudio en células tumorales de mama humanas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

ATP, ADP, Oligomicina, CCCP, Rotenona, glutamato, malato, TMRE, safranina O, Ap5A, tritón X-100, MTT, fueron adquiridos en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU). Dorsomorfina fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EE.UU.).

4.2. Compuestos en estudio

Los compuestos derivados de alquilpolihidroxibenzoatos estudiados fueron sintetizados en el laboratorio de Química Experimental, departamento de Química de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación. Todas las soluciones stock fueron preparadas en DMSO (Merck, Darmstadt, Alemania).

4.3. Propagación y obtención de células tumorales TA3/Ha

La propagación de las células de tumor ascítico TA3/Ha se realizó mediante inyección intraperitoneal en ratones de la cepa CAF 1 Jax. Después de 5-6 días desde la inoculación y propagación, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Las células tumorales fueron obtenidas desde los fluidos ascíticos, según métodos previamente descritos [71].

4.4. Cultivo celular

Las líneas tumorales de cáncer de mama humanas MCF7 (Código ATCC[®] HTB-22[®]) y MDA-MB-231 (Código ATCC[®] HTB-26[®]) fueron adquiridas en ATCC (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Éstas fueron cultivadas en medio DMEM HG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone, Logan, UT, EE. UU) y los antibióticos, penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL.

La línea tumoral de cáncer de mama humana AU565 (Código ATCC[®] CRL-2351[®]) fue adquirida a ATCC. Fue cultivada en medio RPMI, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos, penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 100 µg/mL.

La línea tumoral de cáncer de mama humana BT-549 (Código ATCC[®] HTB-122[®]) fue adquirida a ATCC. Fue cultivada en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), suplementado con 10% de SFB, insulina 0,023UI/mL y los antibióticos penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 100 µg/mL.

La línea celular de epitelio mamario MCF 10F (Código ATCC[®] CRL-10318[®]) fue donada gentilmente por la Dra. Gloria Calaf de la Universidad Tarapacá. Fue cultivada en medio DMEM/F12, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y suplementado insulina, hEGF, gentamicina e hidrocortisona contenidos en el kit MEGM SingleQuots (Lonza, Basilea, Suiza) y 10% de suero fetal equino.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en una atmósfera humidificada, a 37°C y CO₂ al 5%.

4.5. Determinación de la viabilidad celular

La evaluación del efecto de los compuestos en estudio sobre la viabilidad celular se realizó mediante el ensayo de MTT. Éste se fundamenta en la capacidad de reducir enzimáticamente el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por células viables, lo cual genera cristales de formazán que presentan un coloreado azul. Para la realización de este ensayo se utilizaron las líneas tumorales MCF7, AU565, MDA-MB-231, BT-549 y la línea de epitelio mamario no tumoral MCF 10F, las cuales fueron sembradas en placas de 96 pocillos en una concentración de $1 \cdot 10^4$ células/pocillo e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Luego, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de cada compuesto en estudio por 24, 48 y 72 horas según corresponda. Una vez cumplido este tiempo, se agregan 100µL por pocillo de MTT 0,5 mg/mL (Molecular Probes[®], Eugene, OR, EE. UU.). Luego de 1 hora, para las líneas

MCF7, MDA-MB-231, MCF 10F y AU565, y 3 horas para BT-549, los cristales de formazán fueron solubilizados con 20 μ L de Tritón X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) al 10% en HCl 0,01 N. Los valores fueron obtenidos espectrofotométricamente, mediante un lector de placas de ELISA reader (BioRad, Hercules, CA, USA), $\lambda = 570$ nm. Los valores de viabilidad son expresados como $IC_{50} \pm SEM$ y calculados mediante una curva de dosis-respuesta.

4.6. Ensayo de formación de colonias

Células de la línea MCF7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una concentración de 500 células/pocillo, e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Luego, fueron tratadas con concentraciones crecientes de 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀ por 24 horas (0,1 - 5 μ M). Concluido esto, se lavó con PBS y se renovó el medio de incubación por uno libre de compuestos. Las células MCF7 fueron incubadas por 7 días, en cambio MDA-MB-231 por 5 días. Las colonias fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol por 30 minutos. El número de colonias fue calculado usando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

4.7. Determinación del efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.

El efecto producido por Gent TPP⁺C₁₀, 2-OH TPP⁺C₁₀ y 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ sobre el consumo de oxígeno mitocondrial se determinó polarográficamente mediante un electrodo de oxígeno Clark No. 5331 (Yellow Springs Instruments, Yellow Spring, OH, EE. UU.), acoplado a un monitor YSI modelo 53 conectado a un módulo DI-148U con interfase USB. Los datos fueron obtenidos mediante el software Windaq Acquisition Waveform Recorder (DataQ Instruments, EE. UU.).

Las suspensiones mitocondriales fueron preparadas desde células tumorales mamarias murinas TA3/Ha mediante centrifugación diferencial, según protocolos descritos previamente [71] y resuspendidas en medio de respiración mitocondrial (sacarosa 200 mM, KCl 50 mM, K₃HPO₄ 3 mM, MgCl₂ 2mM, EGTA 0,5 mM, HEPES 3

mM, pH=7,4). La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry [72], utilizando albúmina de bovino como estándar. Se utilizó una concentración de 0,5 mg/mL de proteína mitocondrial en cada medición.

La medición de consumo de oxígeno mitocondrial se realizaron utilizando como sustrato glutamato y malato, ambos en una concentración de 8,3 mM, seguido de la adición ADP 0,5 mM, oligomicina 1,6 µg/mL y finalmente los derivados estudiados en concentraciones crecientes (1-100µM), comparando cada uno de los efectos con el efecto ejercido por el desacoplante CCCP 0,3 µM con el objetivo de alcanzar el máximo de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.

4.8. Determinación del efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la respiración celular.

El equipamiento empleado para la determinación de la respiración celular es el mismo descrito en el punto 4.7.

Para cada medición, $4 \cdot 10^6$ células de las líneas MCF7 y MDA-MB-231 fueron resuspendidas en un volumen de 0,6 mL de PBS. En forma secuencial se agregó glutamina 8,3 mM como sustrato, oligomicina 2,5 µg/mL y los compuestos en estudio en concentraciones crecientes (10, 20, 50 µM). La máxima respiración celular fue determinada al agregar CCCP 0,3 µM. Los resultados son expresados como la razón entre el OCR obtenido una vez adicionado el compuesto desacoplante y el OCR cuando la CTE se encuentra inhibida por oligomicina.

4.9. Determinación del contenido mitocondrial.

La determinación fue realizada a través de la sonda fluorescente MitoTracker Red-CMX ROS®.

Células de las líneas MCF 10F, MCF7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una concentración de $1 \cdot 10^5$ células/pocillo e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron incubadas con MitoTracker 60 nM por 45 minutos

protegidas de la luz. Las muestras son tripsinizadas y luego resuspendidas en 200 μ L de PBS. El análisis fue realizado mediante citometría de flujo FACS (FACS Aria®III, BD Biosciences) 579_{Ex}/599_{Em} nm.

Los resultados se expresan como la razón entre la MIF presentada por las células marcadas con la sonda y MIF de la autofluorescencia de las células sin marca.

4.10. Determinación de niveles mitocondriales de anión superóxido.

La determinación fue realizada a través de la sonda fluorescente MitoSOX Red®. El anión superóxido, es capaz de oxidar la sonda generando un producto que es cuantificable a través de citometría de flujo, el cual es proporcional a la cantidad de la especie reactiva de oxígeno analizada.

La medición fue realizada de acuerdo a las especificaciones indicadas por el fabricante. Células de las líneas MCF7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una concentración de 1·10⁵ células/pocillo e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron incubadas con la sonda MitoSOX® 5 μ M por 30 minutos protegidas de la luz. Luego, se estimula con concentraciones crecientes (2,5-100 μ M) de los compuestos en estudio en medio fresco por dos horas. Las muestras son tripsinizadas y resuspendidas en 200 μ L de PBS y analizadas mediante citometría de flujo FACS (FACS Aria®III, BD Biosciences) 510_{Ex}/580_{Em} nm.

4.11. Determinación del potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante TMRE.

Cambios generados en el potencial de transmembrana mitocondrial por la acción de los cationes lipofílicos derivados de alquilhidroxibenzoatos fueron determinados por la sonda fluorescente TMRE, en forma dependiente del potencial de transmembrana.

Se incubaron 1·10⁵ células/pocillo de la línea MCF7 en placas de 24 pocillos por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. En medio fresco las células son tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos analizados (2,5-20 μ M) por un periodo de

2 horas. Luego, las células son lavadas con PBS estéril para eliminar trazas de compuesto, tripsinizadas y resuspendidas en 500 μL de TMRE 50 nM por 30 minutos. Luego, el exceso de sonda fue lavado y el precipitado fue resuspendido en 200 μL de PBS para ser analizados mediante citometría de flujo FACS (FACSAria®III, BD Biosciences) 540_{Ex}/595_{Em} nm.

4.12. Determinación del cambio en potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante safranina O.

La evaluación se realizó mediante una medición de fluorescencia en tiempo real utilizando 4 mg de proteína de las líneas celular MCF7 y MDA-MB-231. Se realizó una incubación previa de 5 minutos con glutamato y malato, ambos a una concentración de 4 mM, safranina O 5 μM , y digitonina 8 $\mu\text{g/mL}$. Luego de 200 segundos de medición, fueron agregadas concentraciones crecientes de los compuestos en estudio (5, 10 y 20 μM). La emisión fue registrada a 485_{Ex}/586_{Em} nm en un tiempo total de 1000 segundos, mediante un espectrofluorímetro JASCO FP-6200. La pérdida total del potencial de transmembrana se consiguió mediante la incorporación de CCCP 0,5 μM .

Se evaluó además, un posible efecto de la acción ATPásica del complejo V (ATP sintasa). Para ello se realizaron evaluaciones, con glucosa 10 mM y ATP 5 mM. Para diferenciar el efecto desacoplante de una posible acción inhibitoria sobre CTE, se comparó con el efecto de Rotenona 5 μM .

4.13. Determinación de los niveles de ATP

Los niveles de ATP se midieron en células MCF7 y MDA-MB-231. Se sembraron $1 \cdot 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos las cuales fueron incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Éstas fueron tratadas por 4 horas con concentraciones crecientes de los compuestos analizados (2,5, 5, 10 y 20 μM). La medición se realizó siguiendo las especificaciones indicadas por el fabricante del kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, EE. UU.), con las siguientes modificaciones, se retiró 50 μL de medio y la medición se realizó con 50 μL del kit. El

contenido total fue transferido a una placa opaca y medido en un espectrofluorímetro lector de placas Varioskan® Flash (Thermo Scientific).

Con el fin de determinar cómo la caída del ATP está mediada por enzimas sensores de ATP: AMPK y adenilato kinasa, se realizó la medición en presencia de concentraciones crecientes de Gent TPP⁺C₁₀ (2,5, 5, 10 y 20 μM) y el inhibidor de la AMPK, dorsomorfina (1 μM) por 4 horas. Para evaluar la actividad de adenilato kinasa (AK) se utilizó el inhibidor Ap5A (5 μM) luego de 3 horas tratamiento con Gent TPP⁺C₁₀ con la adición simultánea de digitonina (0,625 μg/mL) durante el tratamiento.

4.14. Incorporación de yoduro de propidio

La determinación de la incorporación de yoduro de propidio (PI) permite comprobar la impermeabilidad de la membrana celular luego del tratamiento realizado, es por ello, que se utiliza como control en la determinación del ATP celular.

Células de las líneas MCF7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una concentración de $1 \cdot 10^5$ células/pocillo e incubadas por 24 horas. Se estimuló por 4 horas con concentraciones crecientes de cada compuesto en estudio (2,5, 5, 10 y 20 μM) en medio fresco. Luego las células son tripsinizadas, y resuspendidas en 200 μL de PBS con la adición de PI. El análisis se realiza a través de citometría de flujo FACS (FACS Aria®III, BD Biosciences) midiendo a $488_{Ex} / 617_{Em}$ nm.

4.15. Determinación de los niveles intracelulares de NAD(P)H.

Los niveles intracelulares de NAD(P)H se determinaron en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. Una concentración de $5 \cdot 10^4$ células/pocillo fueron resuspendidas en PBS en placas opacas de 96 pocillos, las que fueron tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos 2-OH TPP⁺C₁₀, 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y TPP⁺C₁₀ (2,5, 5, 10 y 20 μM) por 1 hora. NAD(P)H y los compuestos en estudio emiten fluorescencia a 428 nM previa excitación a 340 nM. Es por ello que, el resultado del contenido de NAD(P)H se expresa como la diferencia entre la fluorescencia total presentada luego del tratamiento y

la de los compuestos en PBS a las mismas concentraciones analizadas. Para ello se utilizó un espectrofluorímetro lector de placas Varioskan® Flash (Thermo Scientific).

4.16. Determinación del tipo de muerte celular inducida

El tipo de muerte celular inducida por los compuestos analizados, se determinó mediante las tinciones con Anexina V (AV) y Yoduro de propidio (PI) según instrucciones del fabricante de Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Abcam, Cambridge, R.U.), el cual permite diferenciar entre muerte celular de tipo apoptótica y/o necrótica. Se sembraron células de las líneas MCF7 y MDA-MB-231 en placas de 24 pocillos en una concentración de $5 \cdot 10^4$ células/pocillo. En el caso de MCF7 el periodo de incubación previo al tratamiento fue de 24 horas y las concentraciones de cada compuesto analizado fueron 2,5 y 5 μM . En cambio, para la línea MDA-MB-231 el periodo de incubación previa fue de 6 horas. Luego, las células fueron tratadas con concentraciones 10 y 20 μM de cada uno de los compuestos. Ambas líneas fueron incubadas durante 48 horas. Transcurrido dicho período, las muestras fueron tripsinizadas y resuspendidas en 250 μL de buffer 1X de “annexin V binding buffer” y se les agregó 2,5 μL de AV y 2,5 μL de PI por muestra. Finalmente, las células fueron incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz y fueron analizadas mediante citometría de flujo (FACS Aria®III, BD Biosciences). Las longitudes de onda empleadas en el análisis fueron, $488_{\text{Ex}}/530_{\text{Em}}$ nm para Anexina V FITC y $488_{\text{Ex}}/617_{\text{Em}}$ nm para PI, analizando 10.000 eventos por muestra. Los resultados se expresan como apoptosis total (porcentaje de células Anexina-V⁺/PI⁻ y Anexina-V⁺/PI⁺) y necrosis (porcentaje de células anexina-V⁻/PI⁺). El procesamiento de datos se realizó a través del software Cyflogic (non-commercial version, CyFlo Ltd.)

4.17. Determinación de la migración celular

Se sembraron $1 \cdot 10^5$ células/pocillo de células MDA-MB-231 en placas de 24 pocillos, las cuales fueron incubadas durante 24 horas en medio DMEM suplementado con 10% SFB. Posteriormente, se realizó la herida mediante una punta de micropipeta de

200 μL , se lavó tres veces con PBS estéril y los compuestos analizados fueron agregados en concentraciones crecientes (1, 2,5 y 5 μM) en medio DMEM sin SFB. Como control positivo se utilizó DMEM suplementado con 10% de SFB y como control negativo se utilizó BrdU en concentraciones de 30 y 50 μM . Cada muestra fue fotografiada a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas utilizando un microscopio Olympus CKX41, el análisis se realizó mediante el software Image J (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). Cada muestra es comparada con su propia herida registrada al comienzo del experimento.

4.18. Determinación teórica de pKa.

La determinación de la constantes aparentes (pKa) de cada compuesto fueron estimadas utilizando el software ACD/ChemSketch, versión ACD/Labs 6.00.

4.19. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. El análisis entre los distintos grupos experimentales versus el control se realizaron utilizando análisis de ANOVA, de uno o dos vías según corresponda, con post-test de Bonferroni mediante software GraphPad Prism 5.0. Se estableció como nivel de significancia un $p < 0.05$. Los valores obtenidos en el ensayo de MTT fueron calculados mediante la curva dosis-respuesta ajustada a una curva no lineal.

5. RESULTADOS

5.1. LOS DERIVADOS DE ALQUILHIDROXIBENZOATOS ESTUDIADOS EJERCEN ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN LÍNEAS TUMORALES DE CÁNCER DE MAMA.

La actividad citotóxica y/o el efecto antiproliferativo de los derivados de alquilhidroxibenzoatos, fue evaluada en células de las líneas de cáncer de mama humanas MCF7, AU565, MDA-MB-231 y BT-549 mediante el ensayo de MTT a 24, 48 y 72 horas (**Fig. 3**), con el fin de esclarecer sus propiedades en nuestras condiciones de ensayo.

Los resultados muestran que todos los compuestos utilizados donde se ha incorporado el grupo trifenilfosfonio (TPP⁺) mediante una cadena saturada de diez carbonos, presentan una elevada actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama humanas (**Tabla 1**). Las modificaciones realizadas al grupo farmacóforo, en que los tres grupos hidroxilos presentes en el ácido gálico, son sustituidos por derivados con uno o dos grupos hidroxilos, demostraron un aumento en la actividad citotóxica, en la cual destacan principalmente los compuestos 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀, pues a las 48 horas de incubación presentaron el efecto citotóxico mayor y estadísticamente significativo ($p \leq 0,01$), comparándolo con el compuesto base, TPP⁺C₁₀, en todas las líneas celulares analizadas.

Cabe destacar, que los IC₅₀ obtenidos por los compuestos unidos a TPP⁺, se encuentran dentro de un mismo orden de magnitud en todas las líneas celulares analizadas (**Tabla 1**).

Los valores IC₅₀ obtenidos de las curvas dosis-respuesta respectivas muestran que el ácido gálico y trifenilfosfano (Ph₃P) y el ácido gentísico esterificado con una cadena alifática de 10 carbonos, pero sin la fragmento TPP⁺ (Gent C₁₀) presentan la menor citotoxicidad en todas las líneas analizadas (**Tabla 1A, B, C y D**). Además, la

esterificación del ácido gálico con una cadena alifática de doce carbonos (lauril galato) aumentando notablemente su actividad, lo que demuestra que la actividad citotóxica está relacionada también con el aumento de la lipofilia. Pese a ello, la actividad de los compuestos unidos a TPP⁺ es significativamente mayor en todos los casos.

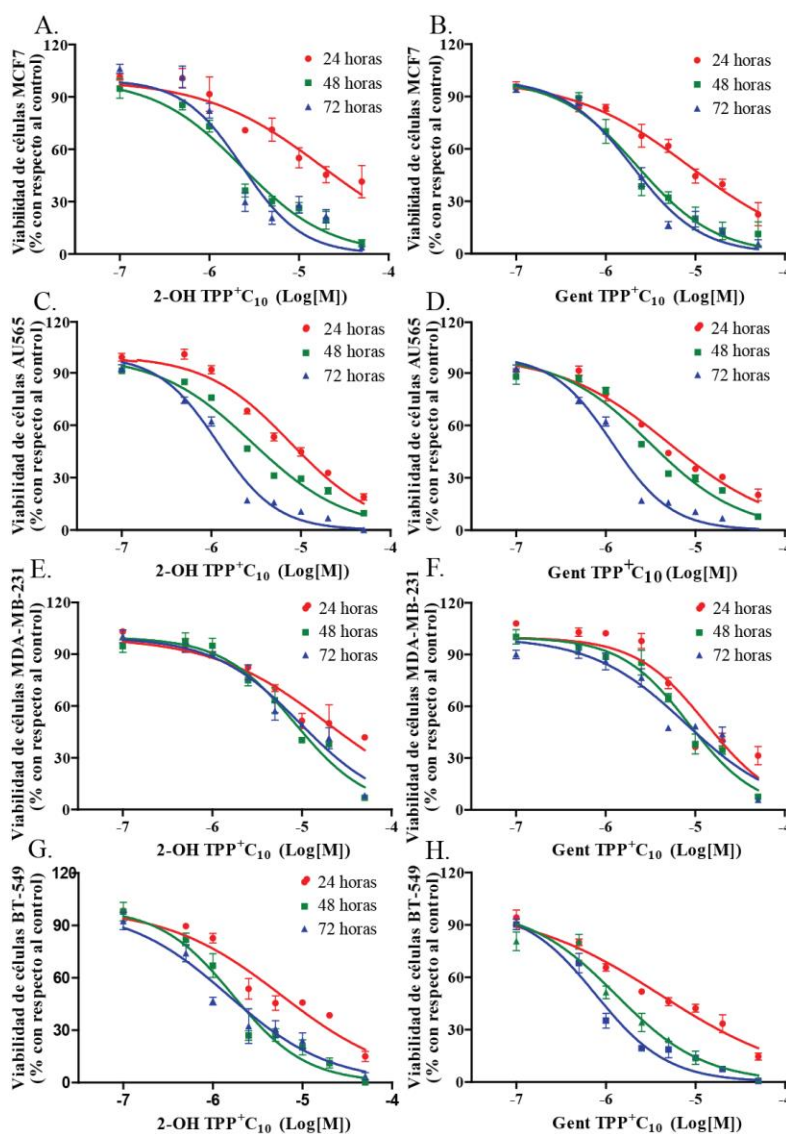


Figura 3: Efecto de los alquilhidrobenzoatos derivados sobre la viabilidad en células MCF7 (A) 2-OH TPP⁺C₁₀(B) Gent TPP⁺C₁₀. AU565 (C) 2-OH TPP⁺C₁₀(D) Gent TPP⁺C₁₀. MDA-MB-231 (E) 2-OH TPP⁺C₁₀ (F) Gent TPP⁺C₁₀. BT-549 (G) 2-OH TPP⁺C₁₀ (H) Gent TPP⁺C₁₀. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (0,1-50 μM) de los compuestos analizados por 24, 48 y 72 horas. El efecto antiproliferativo se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SEM.

RESULTADOS

A.	IC ₅₀ [μM]			
	MCF7	24 horas	48 horas	72 horas
	2-OH TPP ⁺ C ₁₀	13,96 ± 0,53	2,33 ± 0,18	2,35 ± 0,32
	Gent TPP ⁺ C ₁₀	9,41 ± 1,05	2,35 ± 0,43	2,34 ± 0,12
	TPP ⁺ C ₁₀	14,4 ± 0,78	6,17 ± 0,48	3,33 ± 0,20
	2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀	12,12 ± 2,00	5,17 ± 0,51	3,14 ± 0,21
	Ácido Gálico	364,73 ± 6,64	292,73 ± 6,81	183,90 ± 7,42
	Gent C ₁₀	> 400	> 400	> 400
	Lauril Galato	43,54 ± 2,94	36,75 ± 1,00	20,05 ± 0,57
	Ph ₃ P	75,89 ± 1,33	72,08 ± 2,12	73,05 ± 0,94

B.	IC ₅₀ [μM]			
	AU565	24 horas	48 horas	72 horas
	2-OH TPP ⁺ C ₁₀	13,96 ± 0,53	2,88 ± 0,21	2,35 ± 0,32
	Gent TPP ⁺ C ₁₀	9,41 ± 1,05	2,73 ± 0,28	2,34 ± 0,12
	TPP ⁺ C ₁₀	14,4 ± 0,78	3,85 ± 0,12	3,33 ± 0,20
	2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀	12,12 ± 2,00	3,10 ± 0,07	3,14 ± 0,21
	Ácido Gálico	110,07 ± 2,60	75,07 ± 2,42	74,57 ± 3,83
	Gent C ₁₀	> 400	> 400	> 400
	Lauril Galato	28,41 ± 1,55	19,94 ± 1,81	16,09 ± 1,56
	Ph ₃ P	75,89 ± 1,33	72,08 ± 2,12	73,05 ± 0,94

C.	IC ₅₀ [μM]			
	MDA-MB-231	24 horas	48 horas	72 horas
	2-OH TPP ⁺ C ₁₀	13,77 ± 0,52	8,34 ± 1,00	7,25 ± 0,18
	Gent TPP ⁺ C ₁₀	10,08 ± 0,42	8,01 ± 0,57	7,23 ± 0,15
	TPP ⁺ C ₁₀	13,31 ± 1,56	11,99 ± 0,17	7,77 ± 0,50
	2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀	12,65 ± 1,57	9,86 ± 0,30	9,0 ± 1,10
	Ácido Gálico	373,80 ± 9,96	346,33 ± 9,59	340,57 ± 14,87
	Gent C ₁₀	> 400	> 400	> 400
	Lauril Galato	71,13 ± 2,13	87,18 ± 6,12	47,4 ± 1,91
	Ph ₃ P	202,03 ± 11,00	205,77 ± 5,57	210,3 ± 6,29

D.	IC ₅₀ [μM]			
	BT-549	24 horas	48 horas	72 horas
	2-OH TPP ⁺ C ₁₀	6,45 ± 1,88	1,67 ± 0,57	1,89 ± 0,86
	Gent TPP ⁺ C ₁₀	4,82 ± 0,41	1,20 ± 0,10	1,48 ± 0,24
	TPP ⁺ C ₁₀	6,04 ± 1,84	5,04 ± 1,08	2,515 ± 0,78
	2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀	7,04 ± 0,45	2,40 ± 0,20	1,51 ± 0,02
	Ácido Gálico	367,37 ± 5,40	337,00 ± 12,47	313,63 ± 6,06
	Gent C ₁₀	> 400	> 400	> 400
	Lauril Galato	39,91 ± 1,15	28,64 ± 0,62	27,18 ± 2,59
	Ph ₃ P	247,7 ± 5,11	160,48 ± 5,65	89,73 ± 1,70

Tabla 1: Efecto de derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la proliferación en células (A) MCF7, (B) AU-565 (C) MDA-MB-231 y (D) BT-549. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de los compuestos analizados por 24, 48 y 72 horas. El efecto antiproliferativo se estimó mediante el ensayo de MTT. Los valores fueron calculados desde la curva sigmoideal-dosis respuesta. Los resultados representan el promedio ± SEM, N = 3.

5.2. LA CLONOGENICIDAD DE CÉLULAS TUMORALES SE VE AFECTADA POR Gent TPP⁺C₁₀ y 2-OH TPP⁺C₁₀.

Con el fin de comprobar la efectividad de los dos compuestos que demostraron la mayor actividad citotóxica mediante el ensayo de MTT, 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀, se realizó el ensayo clonogénico.

Mediante este ensayo se comprueba la capacidad proliferativa de las células luego de la exposición al tratamiento con los compuestos estudiados. Luego de incubar durante 24 horas con los compuestos, éstos se retiraron para permitir el crecimiento durante siete días para las células MCF7 y cinco para MDA-MB-231.

Como se muestra en las **Figuras 4 y 5**, las células MCF7 y MDA-MB-231 exhibieron una importante disminución en la formación de colonias, luego del tratamiento realizado con ambos compuestos. Los resultados muestran que el compuesto Gent TPP⁺C₁₀, presenta una mayor actividad sobre la capacidad de formación de colonias en comparación con 2-OH TPP⁺C₁₀.

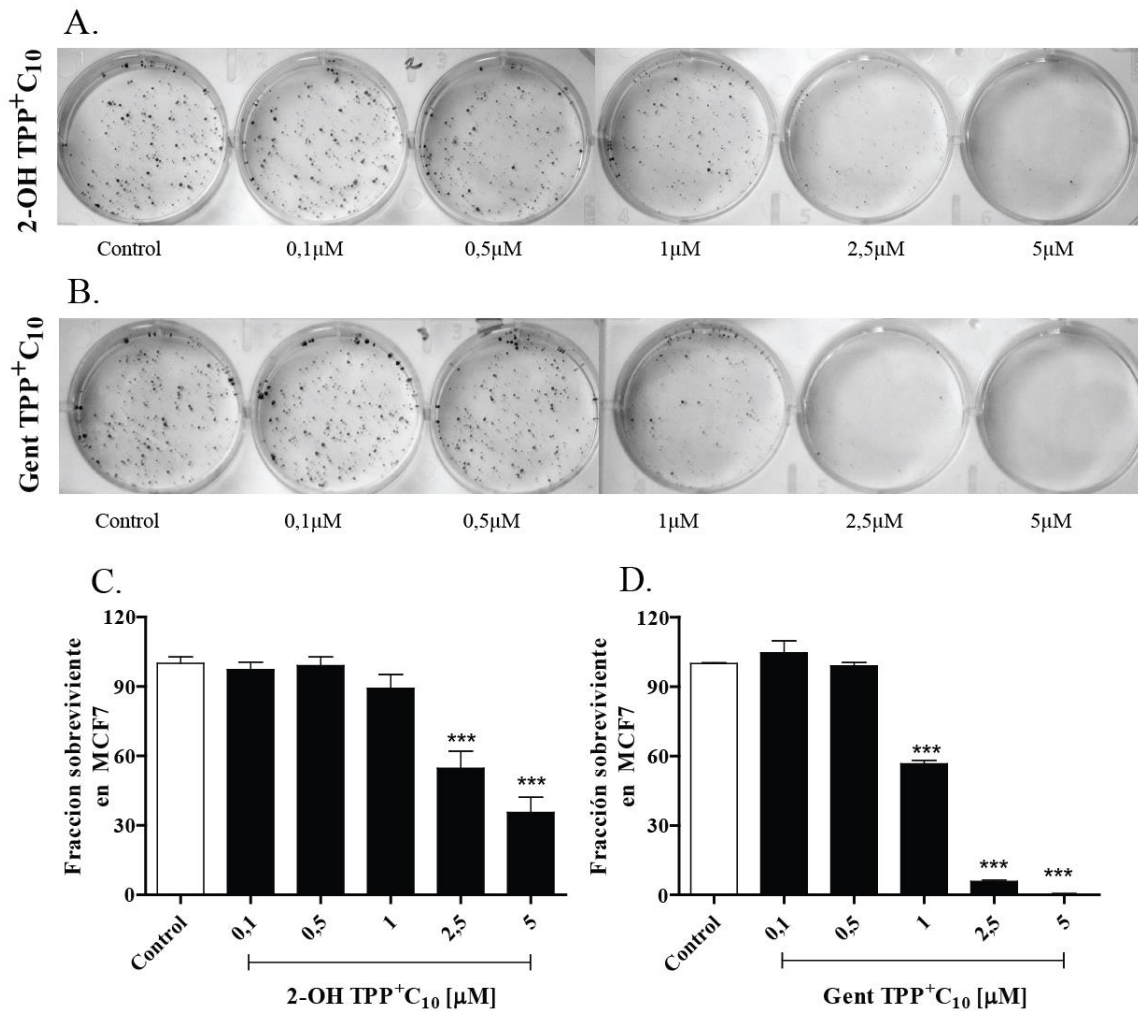


Figura 4: Efecto de derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la capacidad clonogénica en células MCF7 (A) 2-OH TPP⁺C₁₀. (B) Gent TPP⁺C₁₀. Cálculo de la fracción sobreviviente (C) 2-OH TPP⁺C₁₀. (D) Gent TPP⁺C₁₀. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes durante 24 horas y se permitió el crecimiento de las colonias durante 7 días. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 24 horas.**

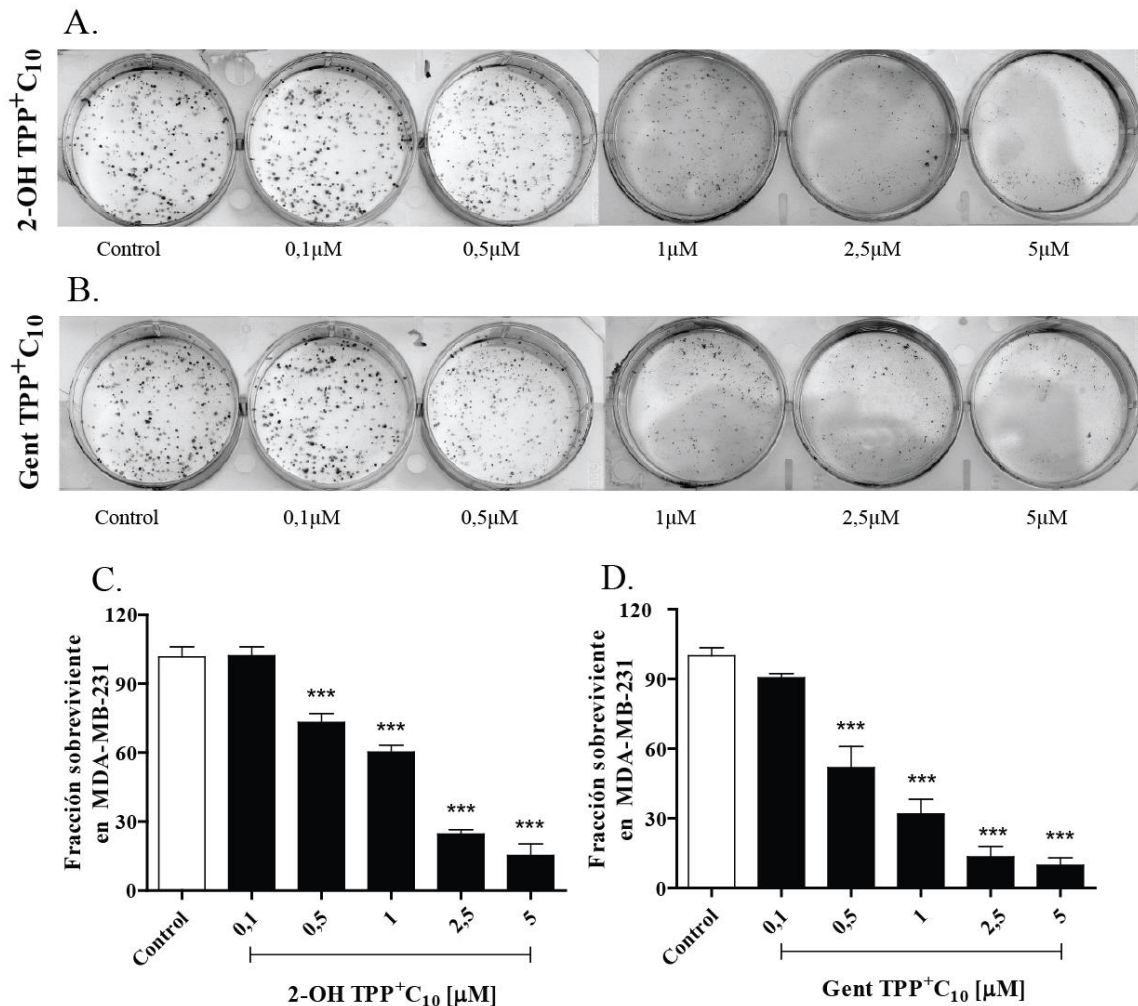


Figura 5: Efecto de alquilhidroxibenzoatos derivados sobre la capacidad clonogénica en células MDA-MB-231 (A) 2-OH TPP⁺C₁₀. (B) Gent TPP⁺C₁₀. Cálculo de la fracción sobreviviente (C) 2-OH TPP⁺C₁₀. (D) Gent TPP⁺C₁₀. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes durante 24 horas y se permitió el crecimiento de las colonias durante 5 días. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 24 horas.**

5.3. LOS DERIVADOS DE ALQUILHIDROXIBENZOATOS ALTERAN EL METABOLISMO TUMORAL MEDIANTE EL DESACOPLAMIENTO DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES DE LA ATP SINTASA.

El efecto producido por los compuestos sobre el consumo de oxígeno fue medido en células de las líneas tumorales MCF7 y MDA-MB-231.

Las **Figuras 6 y 7** muestran que los compuestos en estudio desencadenan un aumento en la velocidad en el consumo de oxígeno celular, efecto que es dependiente de la concentración. Un aumento en la respiración se produce por un efecto desacoplante de la cadena transportadora de electrones (CTE) o debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para diferenciar estos dos posibles efectos, se agregó rotenona, un inhibidor específico del complejo I de la CTE [73], lo cual provocó una caída abrupta del consumo de oxígeno, sugiriendo que el aumento en la velocidad del consumo de oxígeno es producto de un efecto desacoplante de la cadena transportadora de electrones.

Para comparar el efecto de cada compuesto, se utilizó un desacoplante protonóforo CCCP, con el fin de obtener la cadena transportadora de electrones totalmente desacoplada [74]. Cabe notar, que éste efecto máximo sólo se consigue con concentraciones altas de los compuestos analizados, 50 μ M.

Es interesante notar que la línea MDA-MB-231 presenta una mayor razón de desacoplamiento que la línea tumoral MCF7 con todos los compuestos en estudio.

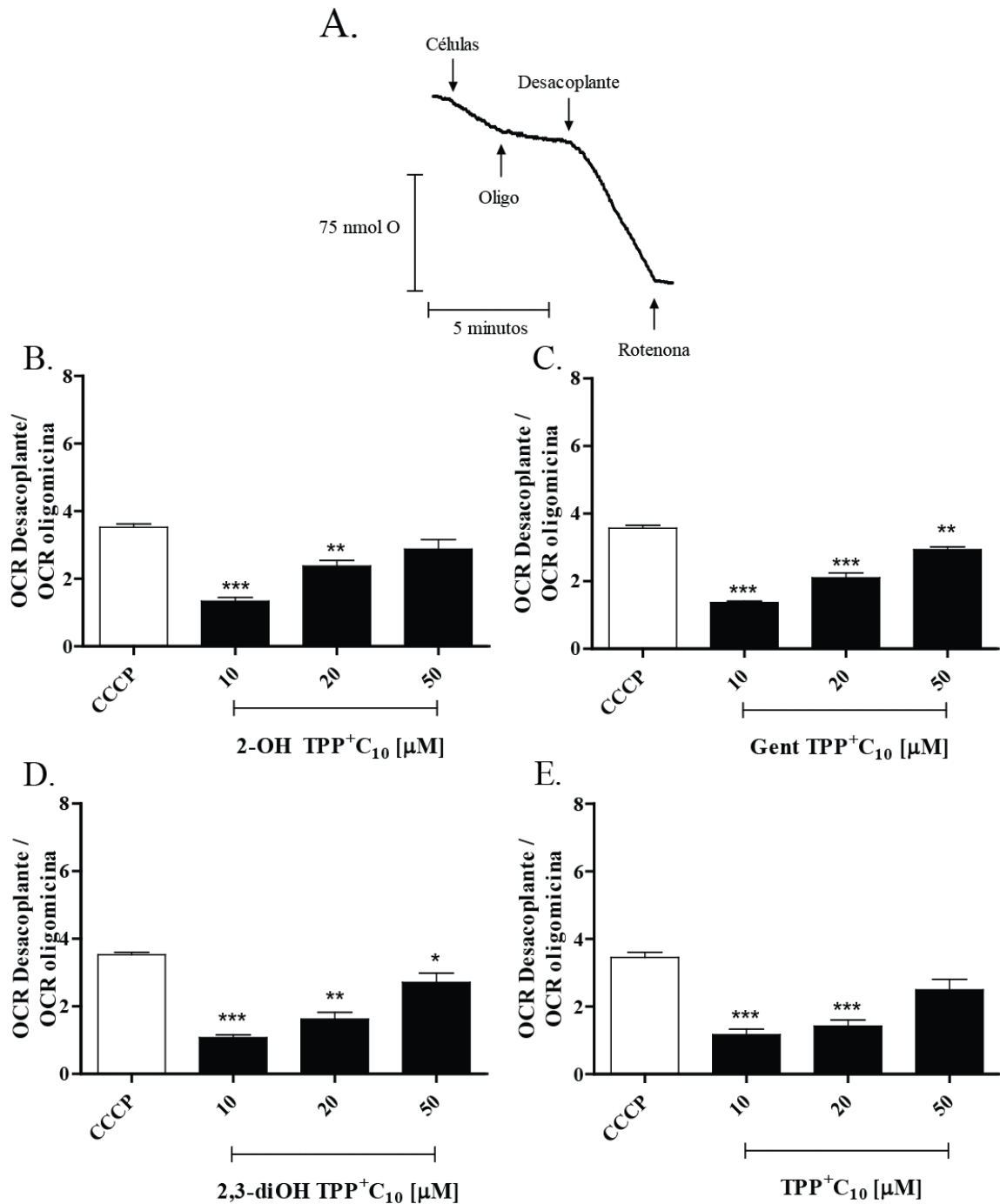


Figura 6: Efecto de los derivados sobre el consumo de oxígeno en células MCF7. (A) Trazo representativo, (B) 2-OH TPP⁺C₁₀, (C) Gent TPP⁺C₁₀, (D) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀, (E) TPP⁺C₁₀. La medición se realizó utilizando 4x10⁶ células en presencia de oligomicina 2,5 μg/mL. Los valores representan el promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

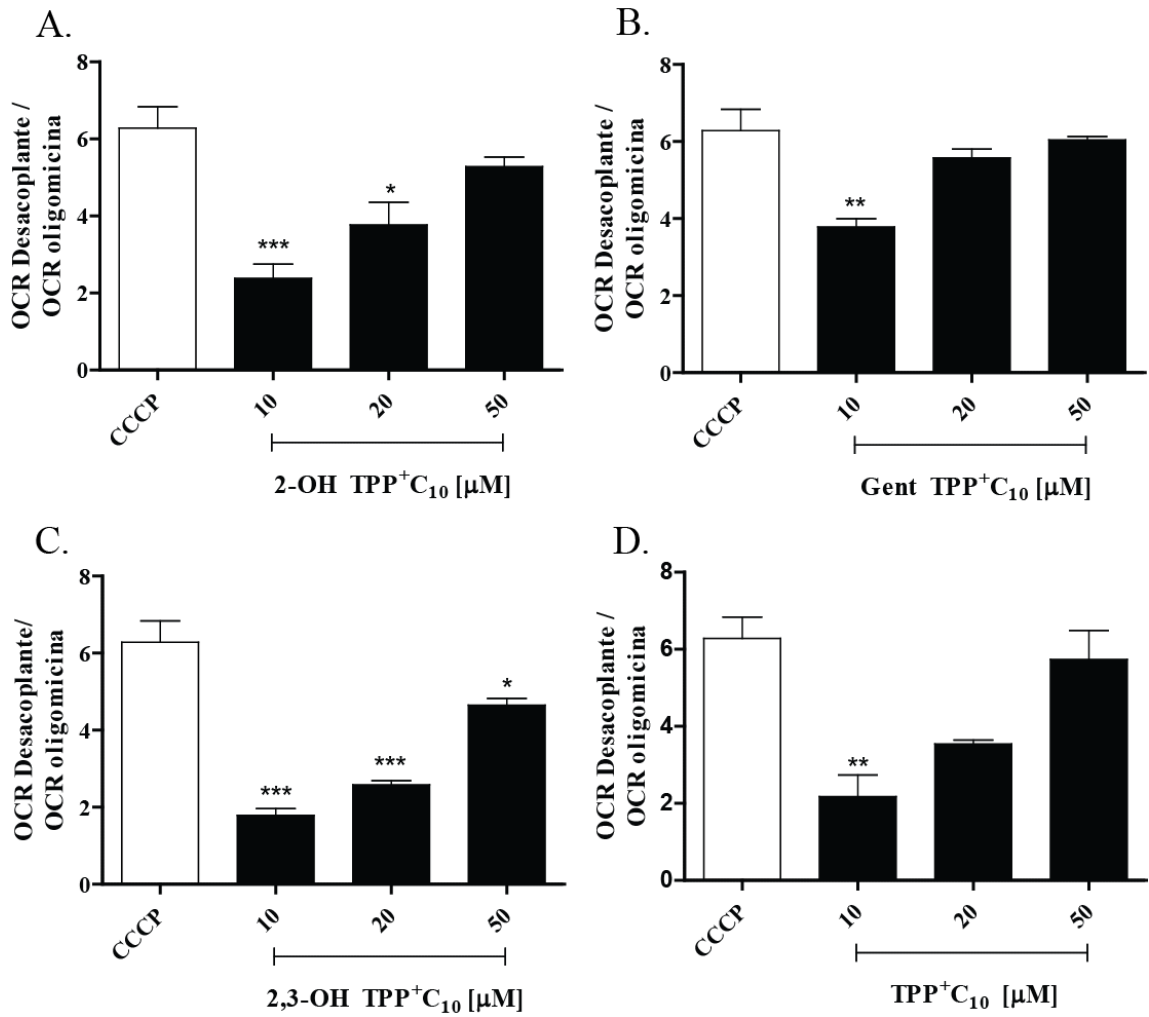


Figura 7: Efecto de los derivados sobre el consumo de oxígeno en células MDA-MB-231. (A) 2-OH TPP⁺C₁₀ (B) Gent TPP⁺C₁₀ (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ (D) TPP⁺C₁₀. La medición se realizó utilizando 4 x10⁶ células en presencia de oligomicina 2,5 μg/mL. Los valores representan el promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

5.4. DETERMINACIÓN DEL AUMENTO DEL CONSUMO DE OXÍGENO PRODUCTO DE LA ACCIÓN DE LOS DERIVADOS ESTUDIADOS EN SUSPENSIONES DE MITOCONDRIAS AISLADAS MURINAS Y HUMANAS

Con el fin de comprobar el efecto mitocondrial producido por los compuestos en estudio y si su comportamiento es en función de la concentración, se realizó la medición de cambios en el consumo de oxígeno, producto de la actividad de los derivados de alquilhidroxibenzoatos, en una suspensión de mitocondrias extraídas de células tumorales de adenocarcinoma de mama de ratón TA3/Ha.

La medición de la variación en el consumo de oxígeno en una suspensión de mitocondrias, se realizó como se muestra en la **Figura 8**. Como sustrato para el complejo I se utilizó glutamato y malato, seguido de la adición de ADP, lo cual verifica que el sistema de la fosforilación oxidativa se encuentra en un estado acoplado, para luego inhibir la fracción F_0 de la ATP sintasa mediante oligomicina, con el fin de determinar el cambio de la velocidad de consumo de oxígeno ocasionado por la adición de alguno de los compuestos sometido a estudio y entregar una señal clara que discrimine en que el aumento de la velocidad de consumo de oxígeno se debe al desacoplamiento del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria con el proceso de generación del potencial de transmembrana o a la producción de radicales libres y no a una respiración relacionada con alguna otra función mitocondrial normal [74, 75].

La **Figura 8** muestra el efecto sobre la función mitocondrial de los derivados estudiados, en ellos se aprecia que el desacoplamiento presenta un patrón concentración-dependiente en las cuales se observan tres fases marcadas. Una fase inicial, con una pendiente muy leve, que se asemeja al consumo de oxígeno inducido por el sustrato basal, para continuar con una pendiente mayor en presencia de ADP, que es inhibida por oligomicina, hasta alcanzar el valor máximo debido a la acción del desacoplante

protonóforo CCCP. La pendiente obtenida es reflejo de la actividad de cada compuesto, siendo mayor la del compuesto Gent TPP⁺C₁₀, seguido de 2-OH TPP⁺C₁₀ y 2,3-diOH TPP⁺C₁₀.

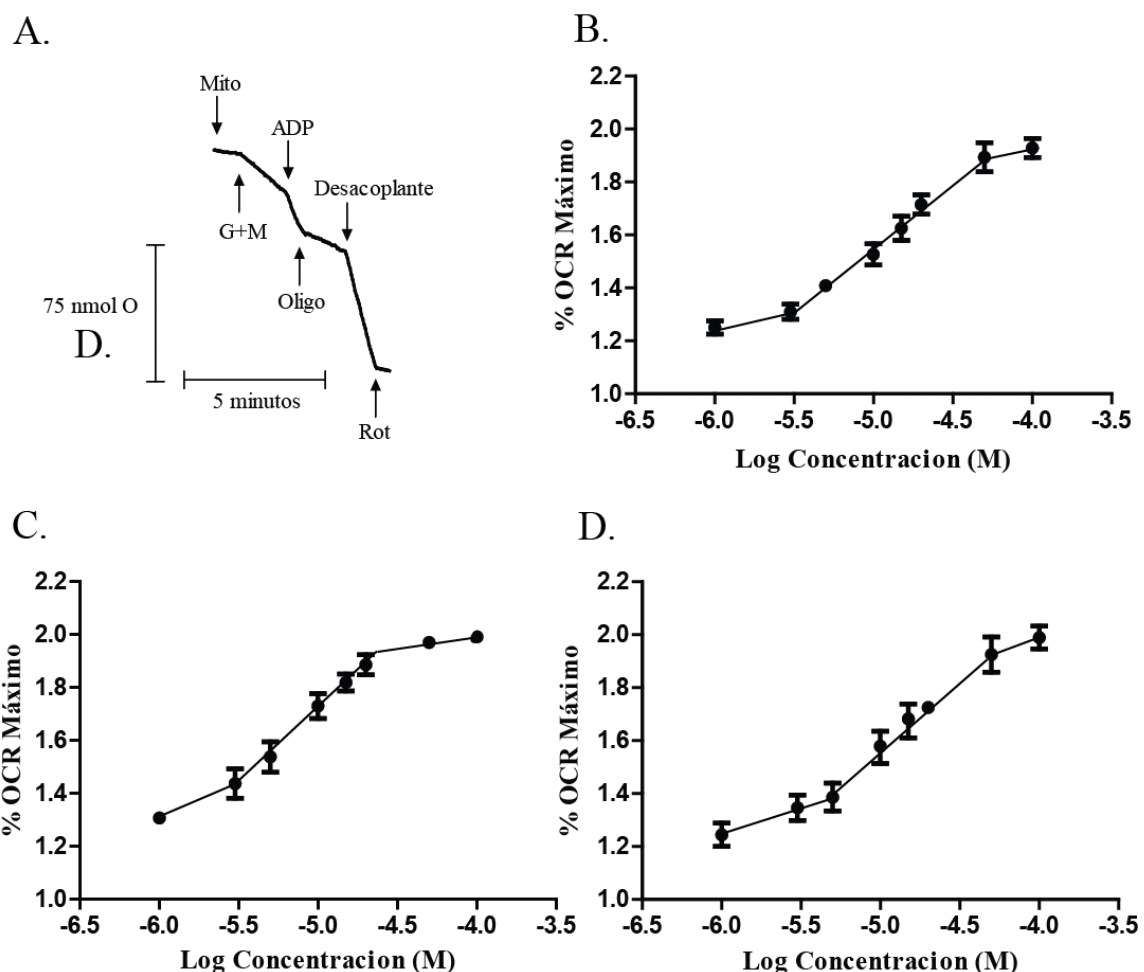


Figura 8: Efecto de los derivados sobre el consumo de oxígeno en una suspensión de mitocondrias de TA3/Ha en estado 3 inhibido. (A) Trazo representativo (B) 2-OH TPP⁺C₁₀ (C) Gent TPP⁺C₁₀ (D) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀. Las suspensiones mitocondriales fueron expuestas a concentraciones crecientes de los compuestos en estudio (1-100 μ M), previa adición de glutamato 8,3 mM, malato 8,3 mM, ADP 0,5 mM y oligomicina 1,6 μ g/mL. El OCR máximo fue obtenido mediante CCCP 0,3 μ M. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3.

La **Figura 9** muestra que mediante una suspensión de mitocondrias extraídas de células tumorales humanas MCF7, se comprobó que el compuesto Gent TPP⁺C₁₀ es capaz de aumentar el consumo de oxígeno en estado 3 inhibido por oligomicina.

El efecto desacoplante producido por el compuesto en estudio, el cual es confirmado al igual que en el ensayo con células mediante la acción inhibitoria de la cadena transportadores de electrones por rotenona, es dependiente de la concentración.

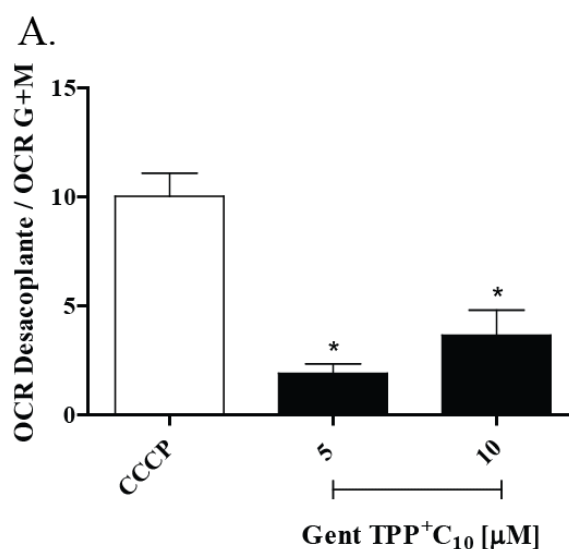


Figura 9: Efecto de Gent TPP⁺C₁₀ sobre el consumo de oxígeno en una suspensión de mitocondrias de MCF7 en estado 3 inhibido por oligomicina. Las suspensiones de mitocondrias fueron expuestas a Gent TPP⁺C₁₀ 5 y 10 μM previa adición de glutamato 8,3 mM, malato 8,3 mM, ADP 0,5 mM, oligomicina 1,6μg/mL. El OCR máximo fue obtenido mediante CCCP 0,3 μM. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3.* = $p \leq 0,05$ con respecto al control.

5.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA POBLACIÓN MITOCONDRIAL

La bioenergética de células tumorales presenta alteraciones con respecto a sus pares normales, clásicamente la literatura ha reportado una deficiencia y menor masa mitocondrial [76, 77].

A través de la tinción de la mitocondria con MitoTracker Red-CMX ROS[®] fue medido el contenido total de este organelo en las líneas celulares estudiadas mediante citometría de flujo.

Como se aprecia en la **Figura 10**, existe un valor significativamente superior de la razón de MIF, entre las células marcadas con la sonda y las células sin sonda (autofluorescencia) en ambas líneas tumorales al compararlas con la línea de epitelio mamario MCF 10F. Este valor es considerablemente mayor en la línea MCF7, pues se observa que la razón de fluorescencia con respecto a la línea normal es aproximadamente el doble.

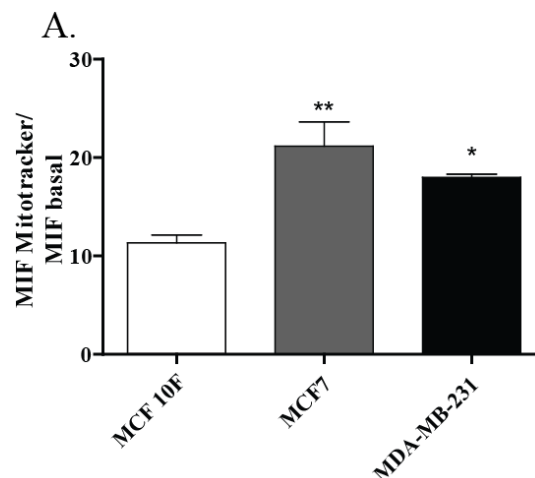


Figura 10: Análisis comparativo de la población mitocondrial en células MCF 10F, MCF7 y MDA-MB-231. Las células fueron incubadas con la sonda fluorescente MitoTracker Red-CMX ROS 60 nM por 45 minutos. La fluorescencia fue analizada por citometría de flujo. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ respecto a MCF 10F.

5.6. LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO NO INDUCEN LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL

Mediante la oxidación de MitoSOX, se comprobó si los compuestos estudiados al afectar la CTE son capaces de producir ROS en un tratamiento de dos horas.

Según se aprecia en la **Figura 11** los compuestos ensayados no producen cantidades significativas de ROS, como consecuencia del desacoplamiento mitocondrial inducido, a las concentraciones probadas en la línea tumoral MCF7, salvo TPP⁺C₁₀ a concentraciones muy elevadas, 100 μM.

La **Figura 12** muestra que no existe un incremento potencialmente tóxico en la formación de ROS a concentraciones bajas (2,5-10 μM) de los compuestos estudiados en la línea metastásica MDA-MB-231. Salvo TPP⁺C₁₀, que al igual que en la línea MCF7, es el compuesto que produce la mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno. A altas concentraciones (100 μM), se evidencia una gran producción de especies radicalarias en este tipo de células.

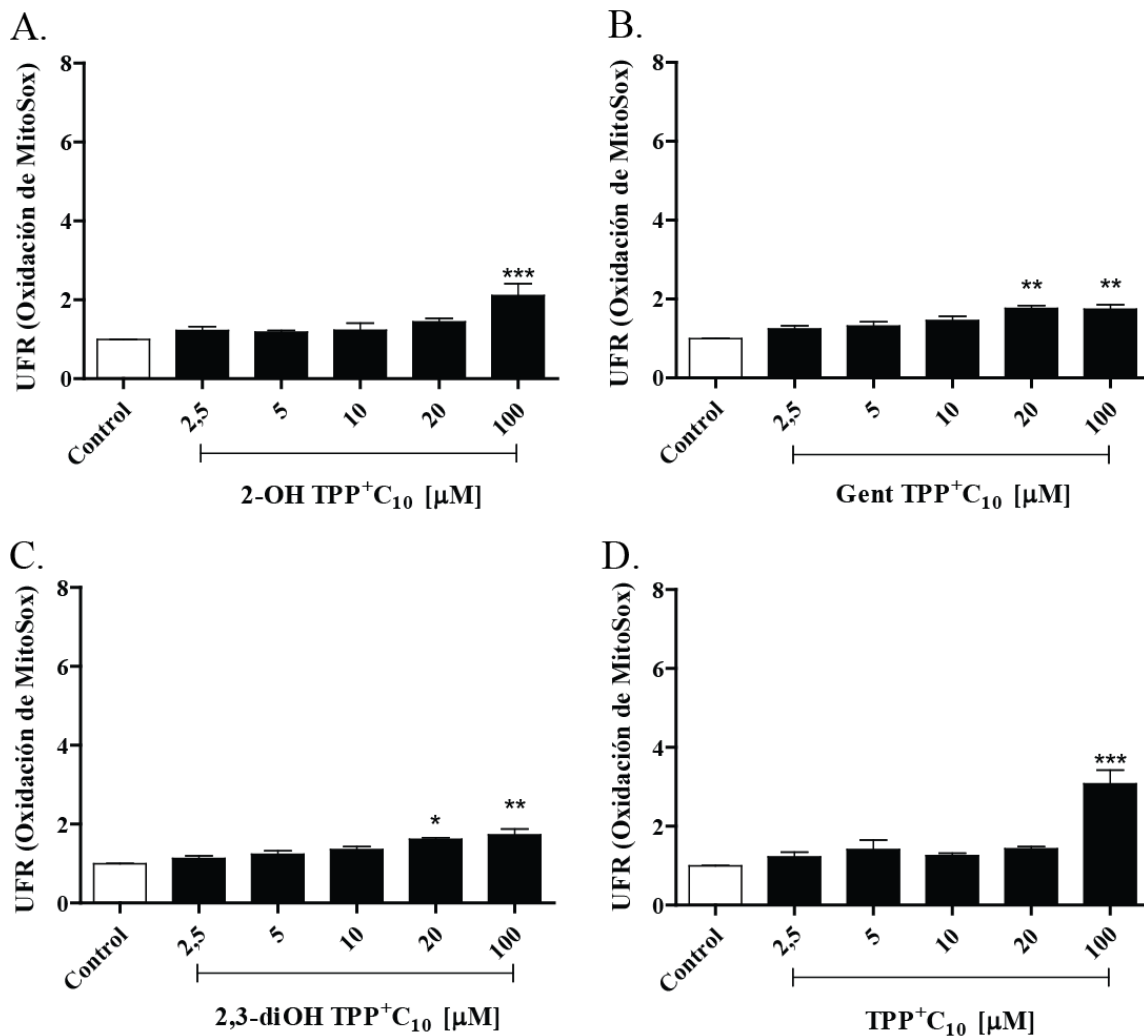


Figura 11: Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la producción de anión superóxido en células de la línea MCF7 (A) 2-OH TPP⁺C₁₀ (B) Gent TPP⁺C₁₀ (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ (D) TPP⁺C₁₀. La intensidad de fluorescencia media de MitoSOX[®] Red se obtuvo mediante citometría de flujo. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 2 horas.

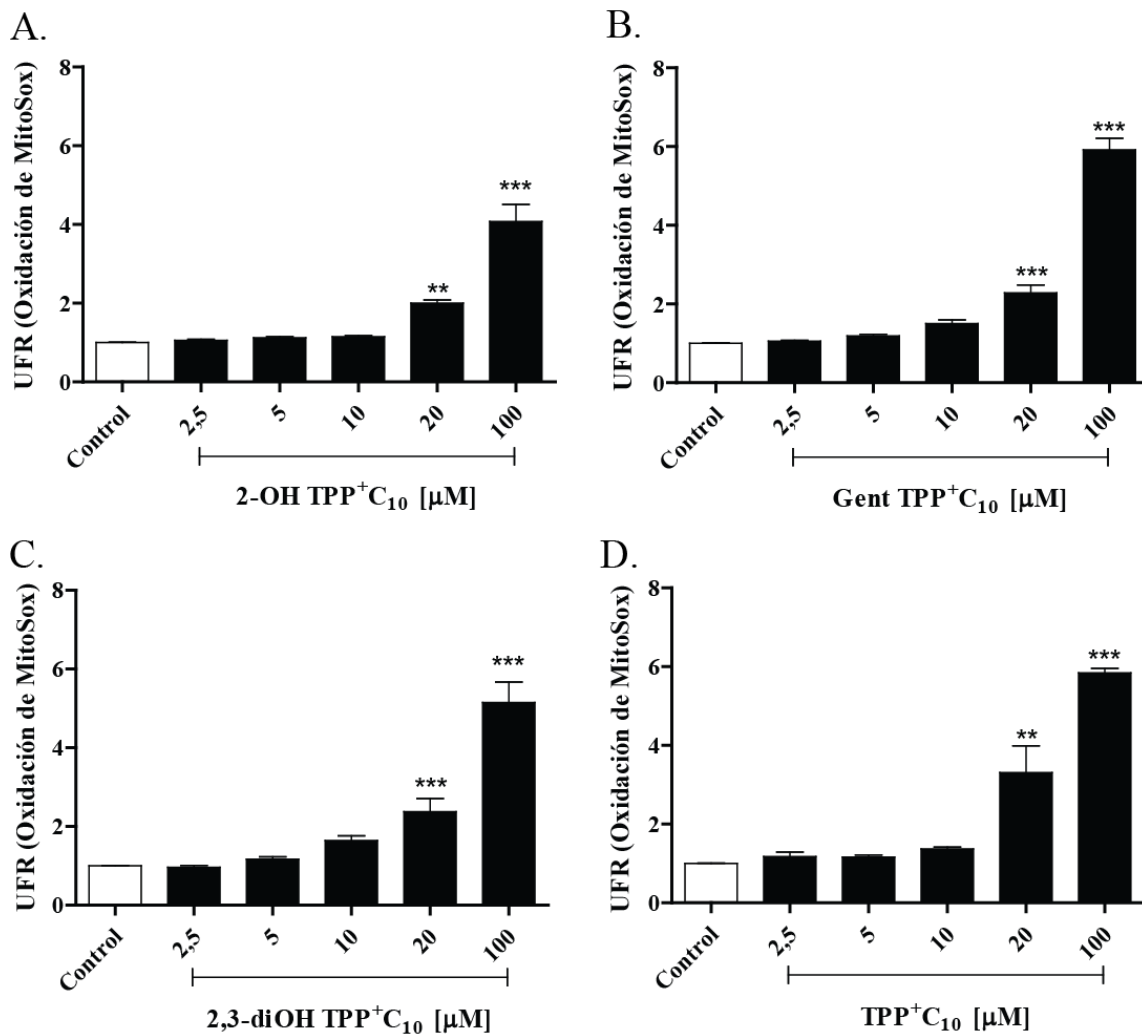


Figura 12: Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la producción de anión superóxido en células de la línea MDA-MB-231 (A) 2-OH TPP⁺C₁₀ (B) Gent TPP⁺C₁₀ (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ (D) TPP⁺C₁₀. La intensidad de fluorescencia media de MitoSOX[®] Red se obtuvo mediante citometría de flujo. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. ** = $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 2 horas.**

5.7. LOS ALQUILHIDROXIBENZOATOS INDUCEN UNA DISMINUCIÓN DEL POTENCIAL DE TRANSMEMBRANA MITOCONDRIAL

La principal consecuencia de un efecto desacoplante sobre la CTE es la pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial. La sonda fluorescente TMRE es un catión que se dirige selectivamente a la membrana de acuerdo al potencial de transmembrana existente.

Luego de un tratamiento de dos horas con los compuestos en estudio, las células fueron incubadas con TMRE 50 nM, compuesto que se incorpora a la célula de acuerdo al potencial de transmembrana mitocondrial remanente.

La **Figura 13** muestra que los compuestos estudiados provocan una pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial, producto del efecto desacoplante en la línea tumoral MCF7; el cual es proporcional a la concentración empleada.

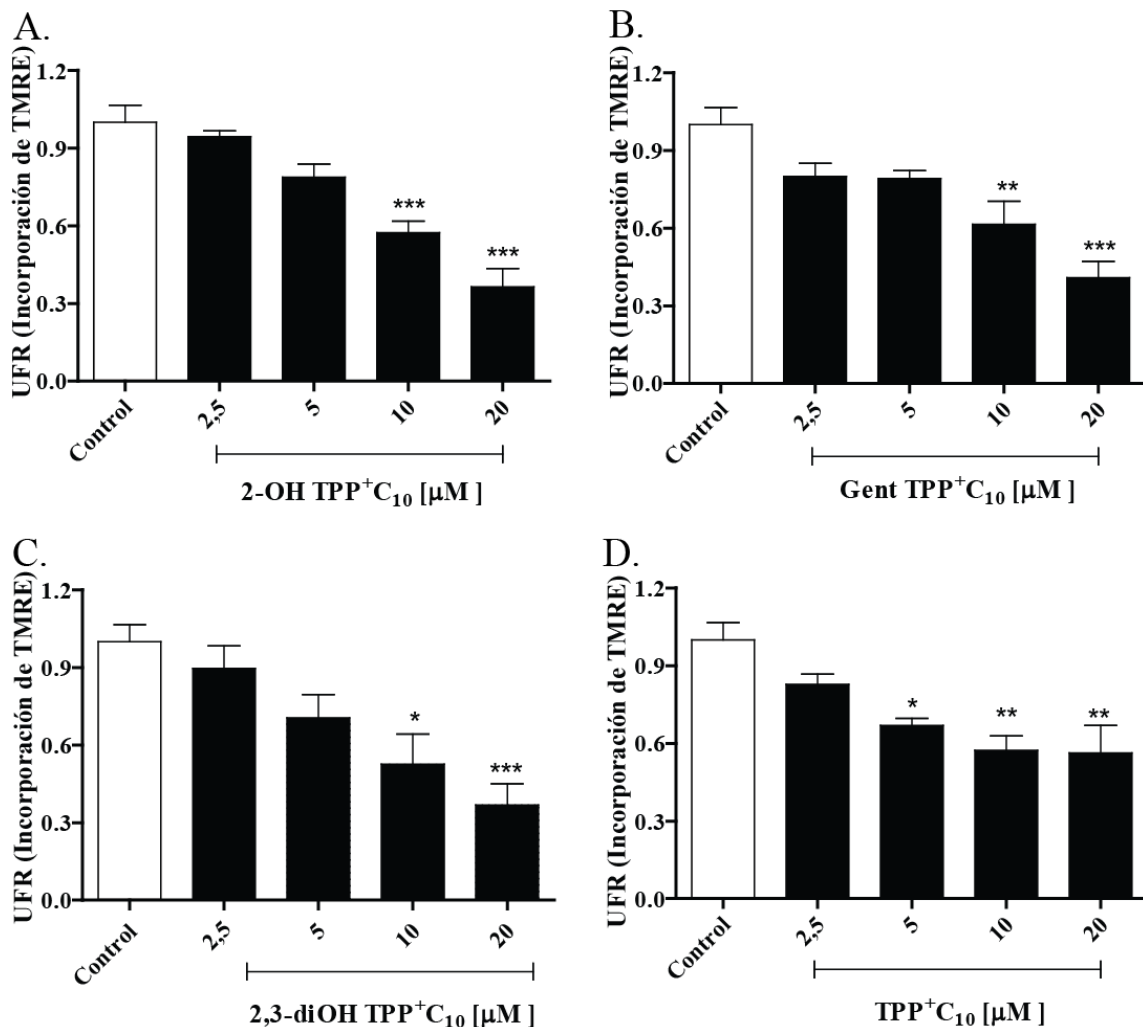


Figura 13: Efecto de los derivados sobre el potencial de transmembrana mitocondrial en MCF7. (A) 2-OH TPP⁺C₁₀, (B) Gent TPP⁺C₁₀, (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀, (D) TPP⁺C₁₀. La intensidad de fluorescencia media la sonda TMRE se obtuvo mediante citometría de flujo. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 2 horas.

La pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial producto del efecto desacoplante inducido por los derivados de alquilhidroxibenzoatos, fue evaluado a través de la medición de fluorescencia ocupando safranina O. Esta sonda, es capaz de acumularse en la mitocondria, formando una empalizada, ordenándose alrededor de este organelo en función del potencial de membrana existente [78].

Como se muestra en las **Figuras 14 y 15**, una vez incorporados los compuestos se observa un aumento drástico en la intensidad de fluorescencia. Esto se debe a la pérdida del ordenamiento de la safranina O alrededor de la membrana mitocondrial producto de la pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial. La rapidez con que se alcanza el máximo es dependiente de la concentración de cada compuesto analizado, como también de la línea celular analizada. Interesantemente, la rapidez con que la línea MCF7 alcanza el máximo es mucho mayor a la línea tumoral MDA-MB-231.

Este resultado sugiere que los compuestos en estudio generan un desacoplamiento de la CTE, desencadenando una pérdida del potencial de transmembrana, cuya rapidez es mayor en la línea MCF7.

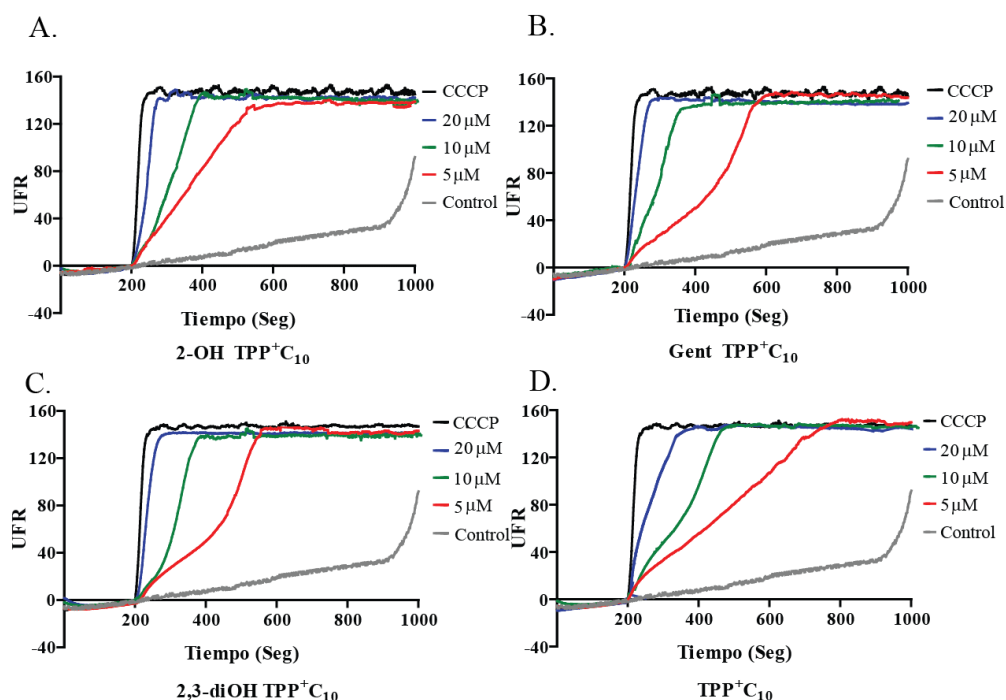


Figura 14: Determinación de la pérdida potencial de transmembrana mitocondrial a través de safranina O en células MCF7. (A) 2-OH TPP⁺C₁₀ (B) Gent TPP⁺C₁₀ (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ (D) TPP⁺C₁₀. 4 mg de proteína de MCF7 fueron previamente incubadas con safranina O 5 μM, glutamato 4 mM, malato 4mM y digitonina 8μg/mL por 5 minutos. Luego fueron adicionadas concentraciones crecientes de los compuestos analizados. La intensidad de fluorescencia fue obtenida mediante un espectrofluorímetro. Se utilizó CCCP 0,5 μM. El control corresponde a células tratadas con DMSO.

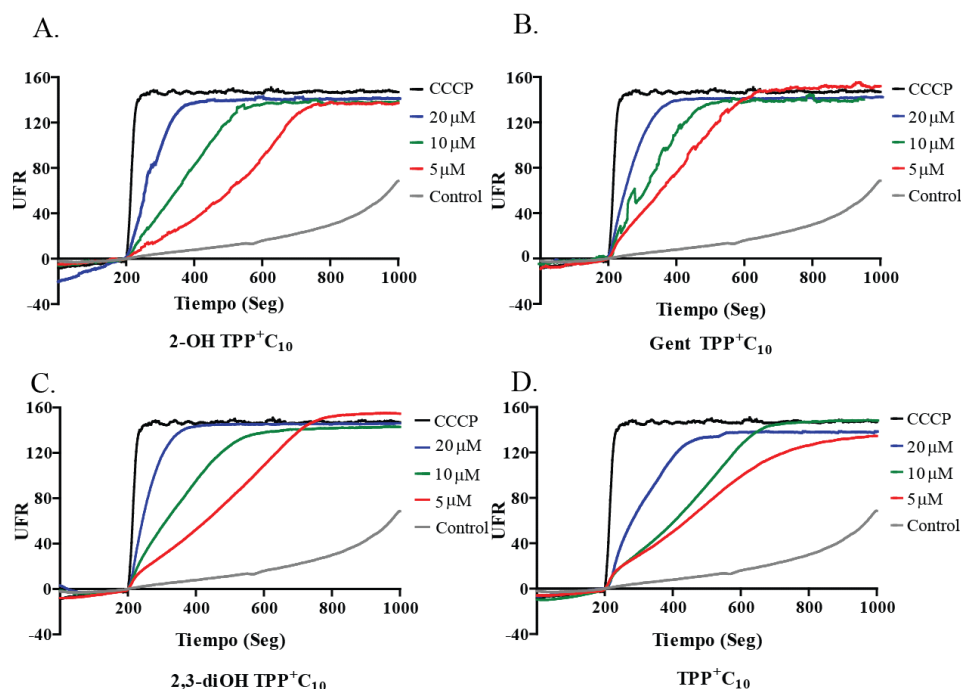


Figura 15: Determinación de la pérdida potencial de transmembrana mitocondrial a través de safranina O en células MDA-MB-231. (A) 2-OH TPP⁺C₁₀ (B) Gent TPP⁺C₁₀ (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ (D) TPP⁺C₁₀. 4 mg de proteína de MDA-MB-231 fueron previamente incubadas con safranina O 5 μM , glutamato 4 mM, malato 4 mM y digitonina 8 μg/mL por 5 minutos. Luego fueron adicionadas concentraciones crecientes de los compuestos analizados. La intensidad de fluorescencia fue obtenida mediante un espectrofluorímetro. Se utilizó CCCP 0,5 μM. El control corresponde a células tratadas con DMSO

Producto de una pérdida del potencial de transmembrana el complejo V mitocondrial puede jugar un rol ATPásico. Es por ello que, luego de producirse el desacoplamiento, reflejado en el aumento de la intensidad de fluorescencia, se adicionó ATP 5 mM. Como se muestra en la **Figura 16**, producto del efecto desacoplante de los derivados en estudio y de CCCP, luego de adicionar dicho nucleótido, no hay un efecto compensatorio del complejo ATPsintasa en la restitución del potencial de transmembrana.

En forma adicional, para diferenciar el comportamiento inhibitorio de la CTE de un efecto desacoplante, se realizó el mismo estudio utilizando rotenona, un inhibidor del complejo I mitocondrial (**Figura 16**). Con este compuesto se alcanza de igual forma el máximo en la intensidad de fluorescencia, pero dado su mecanismo, al adicionar ATP el potencial de transmembrana es parcialmente restituido en la línea MCF7, proceso que no ocurre en MDA-MB-231.

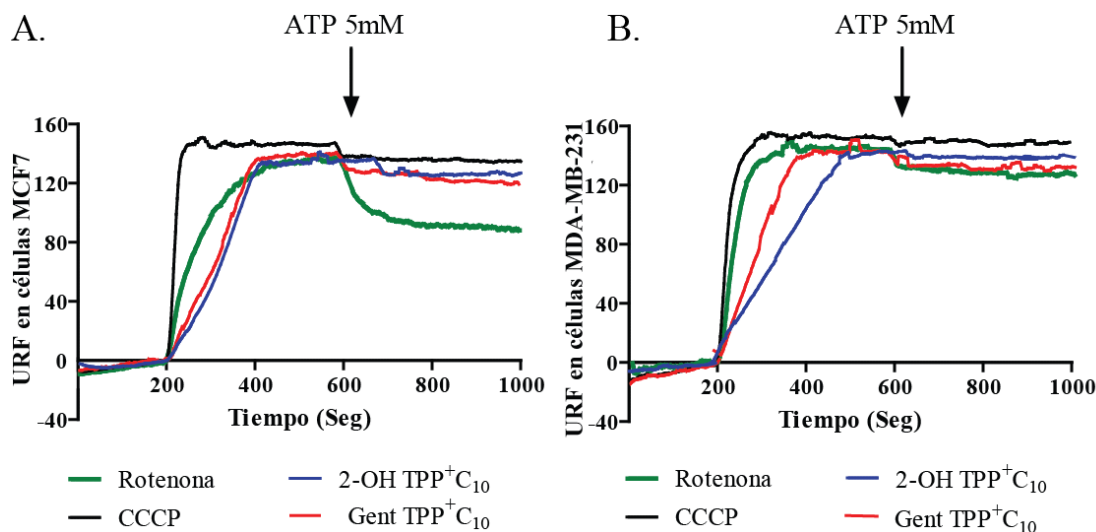


Figura 16: Determinación de la acción ATPásica sobre la pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial en células (A) MCF7. (B) MDA-MB-231. 4 mg de proteína de cada línea celular fueron previamente incubadas con safranina O 5 μ M, glutamato 4 mM, malato 4 mM y digitonina 8 μ g/mL por 5 minutos. Se utilizó una concentración de 10 μ M de los derivados estudiados, rotenona 5 μ M y ATP 5 mM. La intensidad de fluorescencia fue obtenida mediante un espectrofluorímetro. Se utilizó CCCP 0,5 μ M. El control corresponde a células tratadas con DMSO

5.8. EFECTO DE LOS DERIVADOS DE ALQUILHIDROXIBENOATOS SOBRE PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS EN CÉLULAS TUMORALES MCF7 Y MDA-MB-231

5.8.1. MEDICIÓN DE LA CAÍDA DE NAD(P)H PRODUCTO DEL EFECTO DESACOPLANTE

La pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial desencadena un aumento de la velocidad del transporte de electrones a nivel de la CTE, con el fin de revertir este efecto. NADH es el sustrato del complejo I mitocondrial, pero además participa en otras funciones como, regeneración de glutatión (GSH) y biosíntesis de nucleótidos, es por ello que una disminución del contenido total genera un desbalance metabólico general dentro de la célula [79].

Como se aprecia en las **Figuras 17 y 18**, producto de la acción de los compuestos analizados el contenido total de NAD(P)H disminuye tanto en las células MCF7, como MDA-MB-231 de manera dependiente de la concentración, alcanzando un valor cercano al obtenido con el desacoplante CCCP.

Es interesante hacer notar, que el contenido total de NAD(P)H disminuye también en la línea MDA-MB-231, producto del desacoplamiento mitocondrial, aun cuando es altamente glicolítica, debido a una fuerte inhibición de la función mitocondrial de síntesis de ATP.

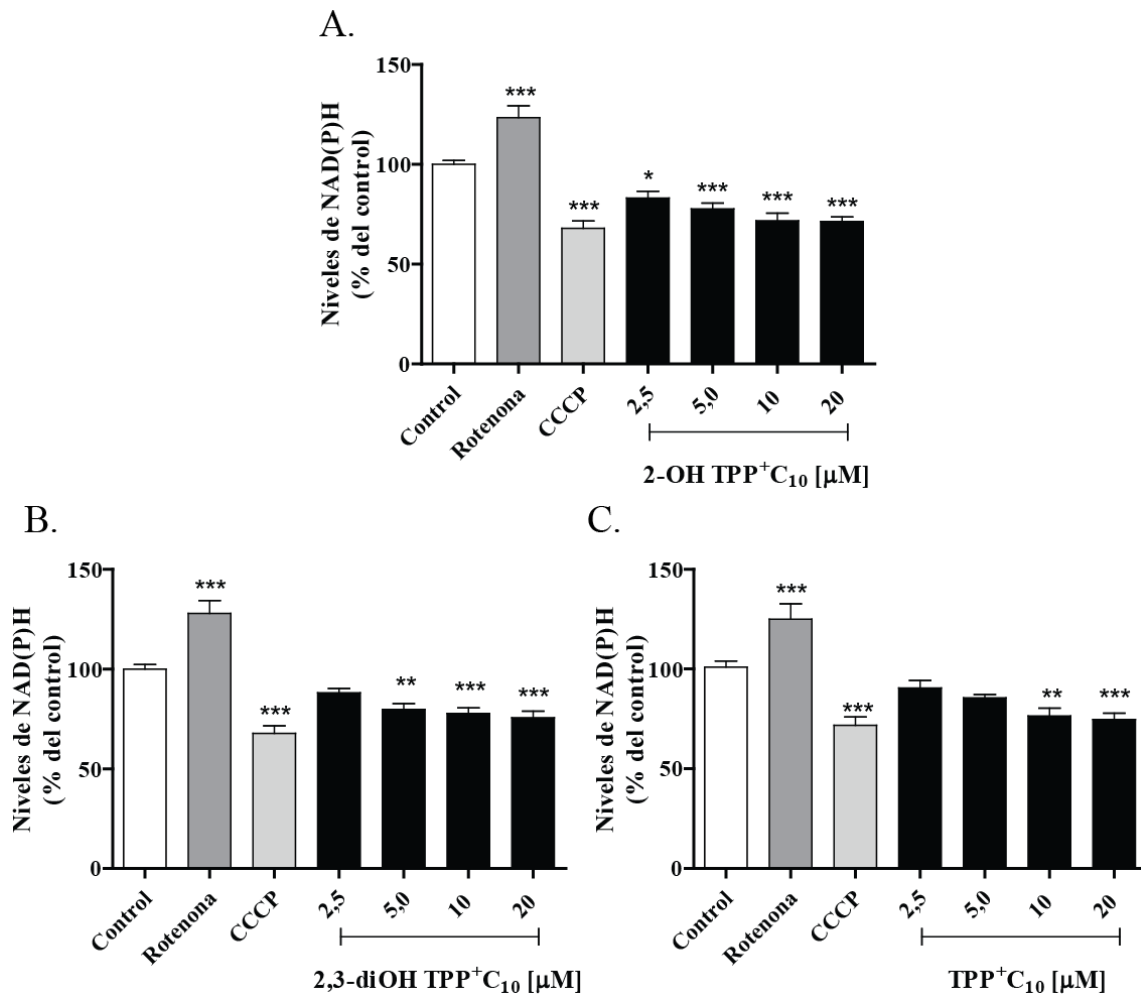


Figura 17: Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre los niveles de NAD(P)H en células MCF7 (A) 2-OH TPP⁺C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y (C) TPP⁺C₁₀. La fluorescencia de NAD(P)H se registró a 340_{Ex}/428_{Em} nm mediante un espectrofluorímetro. Se utilizó rotenona 5 μM y CCCP 1 μM. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 1 hora.

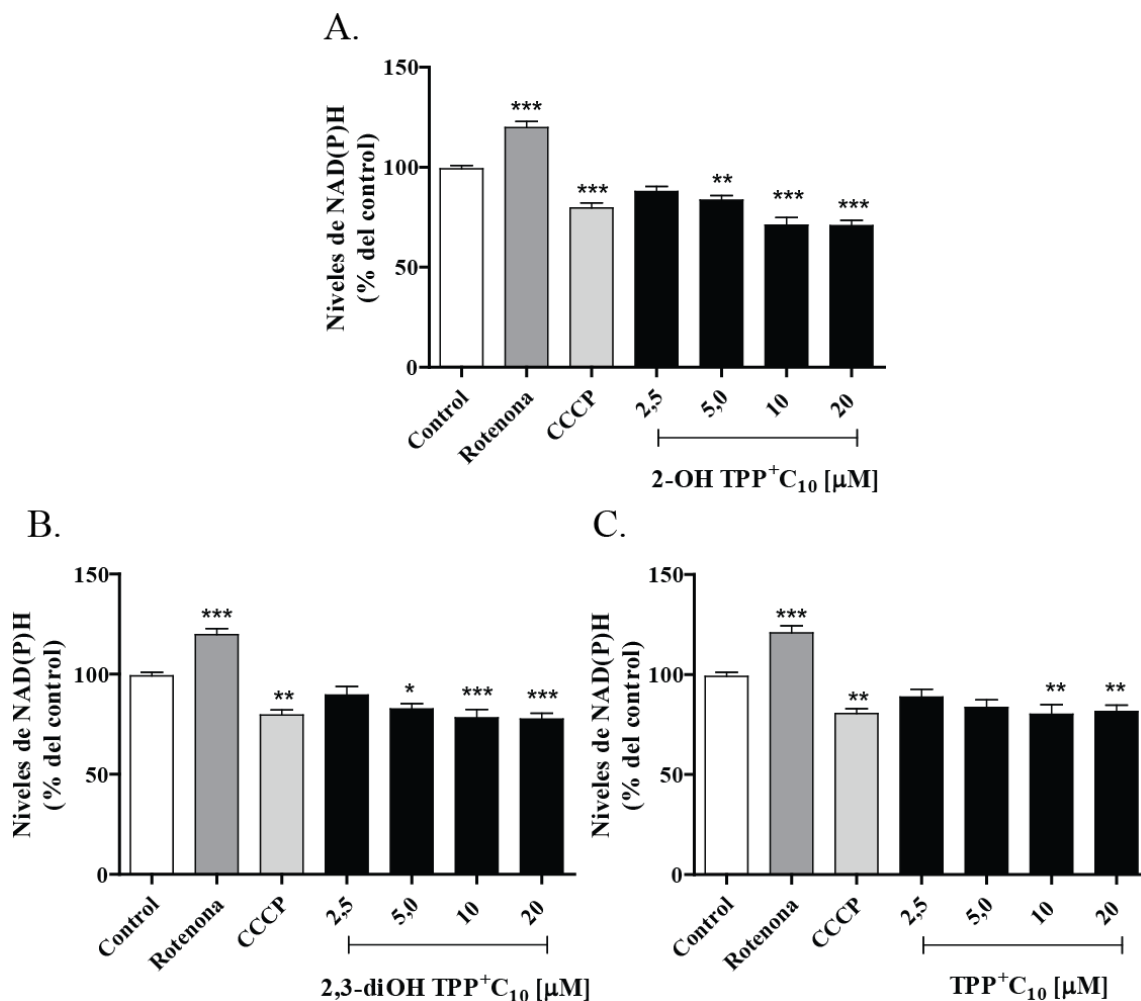


Figura 18: Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre los niveles de NAD(P)H en células MDA-MB-231. (A) 2-OH TPP⁺C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y (C) TPP⁺C₁₀. La fluorescencia de NAD(P)H se registró a 340_{Ex}/428_{Em} nm mediante un espectrofluorímetro. Se utilizó rotenona 5 μM y CCCP 1 μM. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 1 hora.

5.8.2. MEDICIÓN DE LA CAÍDA DE ATP PRODUCTO DE LA ACCIÓN DE LOS DERIVADOS EN ESTUDIO.

Según la teoría quimiosmótica de Mitchell, la síntesis de ATP mitocondrial necesita una fuerza protón-motriz para el funcionamiento del complejo V mitocondrial, ATPsintasa, la cual es proporcionada por el potencial de transmembrana mitocondrial generado [80]. Un efecto desacoplante impedirá el correcto funcionamiento de dicha enzima.

El nivel total de ATP intracelular fue medido usando el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay luego de un tratamiento de 4 horas con los compuestos estudiados en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. Una de las principales diferencias entre estas líneas es el perfil metabólico que presentan. Lo cual se debe a que, la línea metastásica presenta un metabolismo altamente glicolítico dado por una fuerte inhibición de la síntesis mitocondrial de ATP.

Luego de un tratamiento de 4 horas con cada compuesto se aprecia que en las células MCF7 existe una disminución en el contenido total de ATP dependiente de la concentración, (**Figura 19**). La máxima disminución de ATP fue conseguida a 20 μ M de cada compuesto, con 2-OH TPP⁺C₁₀ se obtuvo un valor del $71,79 \pm 1,66$ % con respecto al control, Gent TPP⁺C₁₀ $68,22 \pm 1,83$ %, TPP⁺C₁₀ $61,26 \pm 1,80$ % y 2,3-diOHTPP⁺C₁₀ $66,58 \pm 1,59$ %.

En las células tumorales MDA-MB-231 luego del tratamiento realizado, no se apreciaron disminuciones significativas en el contenido total del ATP con respecto al control, (**Figura 20**).

Para comprobar que la caída de ATP es producto del desacoplamiento mitocondrial producido y no por una permeabilización de la membrana plasmática, fueron realizados los respectivos controles, midiendo la incorporación de yoduro de propidio a través de citometría de flujo, **Figuras 21 y 22**. Los resultados muestran que los

compuestos no afectan la integridad de la membrana plasmática en las líneas celulares estudiadas, en un periodo de cuatro horas de tratamiento.

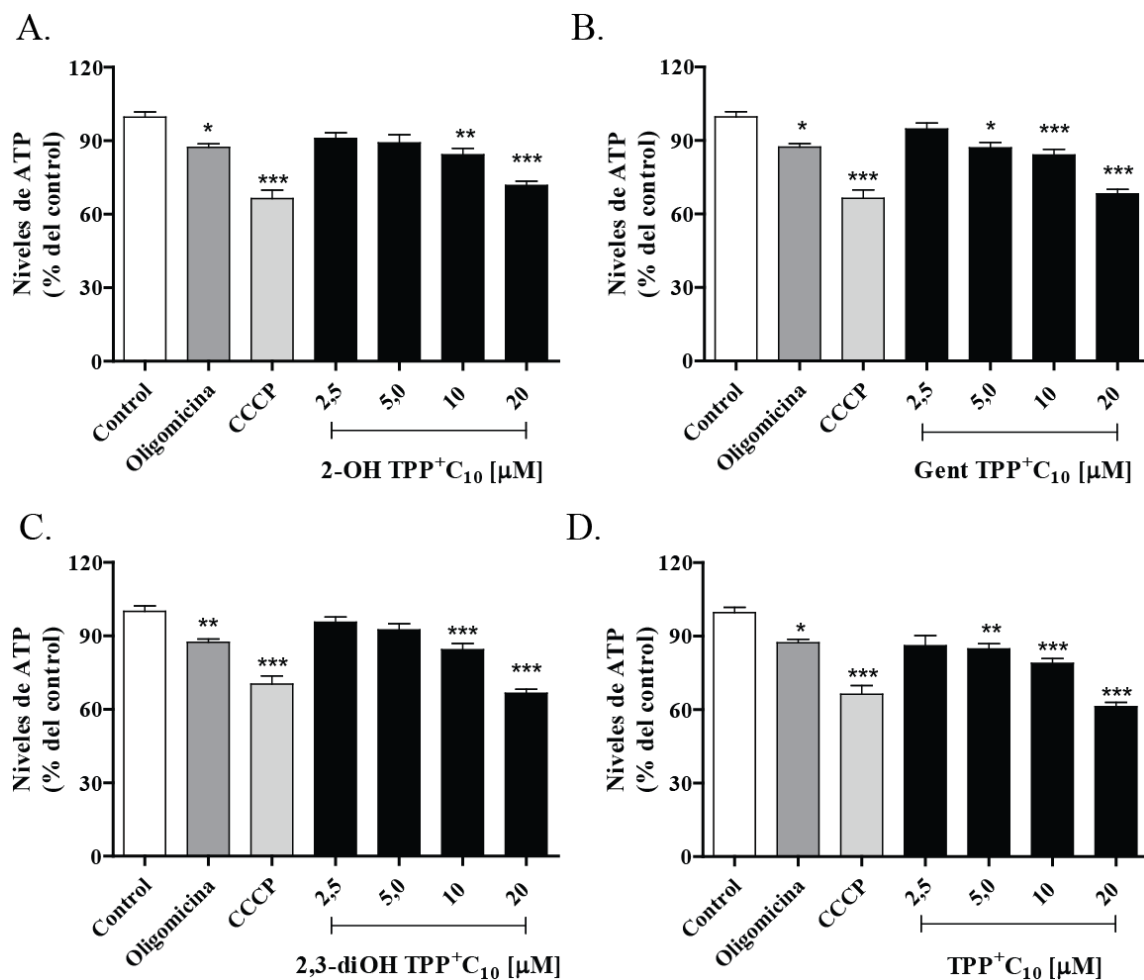


Figura 19: Efecto de los derivados sobre el contenido de ATP en células MCF7 (A) 2-OH TPP⁺C₁₀, (B) Gent TPP⁺C₁₀, (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y (D) TPP⁺C₁₀. Los niveles de ATP intracelular se obtuvieron mediante el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay previa incubación de 4 horas con los compuestos en estudio. Se utilizó oligomicina 1 mg/mL y CCCP 1 μM. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 4 horas.**

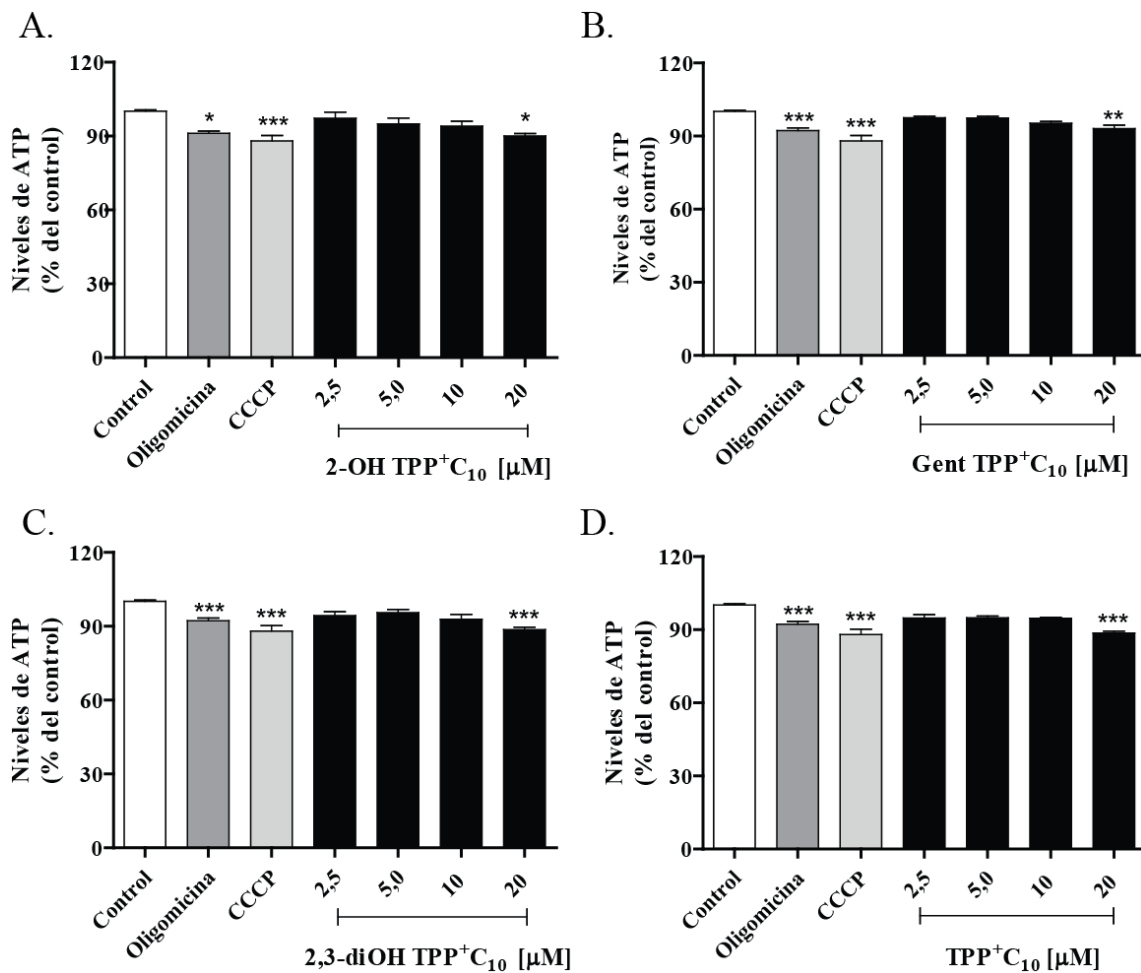


Figura 20: Efecto de los derivados sobre el contenido de ATP en células MDA-MB-231. (A) 2-OH TPP⁺C₁₀, (B) Gent TPP⁺C₁₀, (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y (D) TPP⁺C₁₀. Los niveles de ATP intracelular se obtuvieron mediante el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay previa incubación de 4 horas con los compuestos en estudio. Se utilizó oligomicina 1 mg/mL y CCCP 1 μM. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 4 horas.

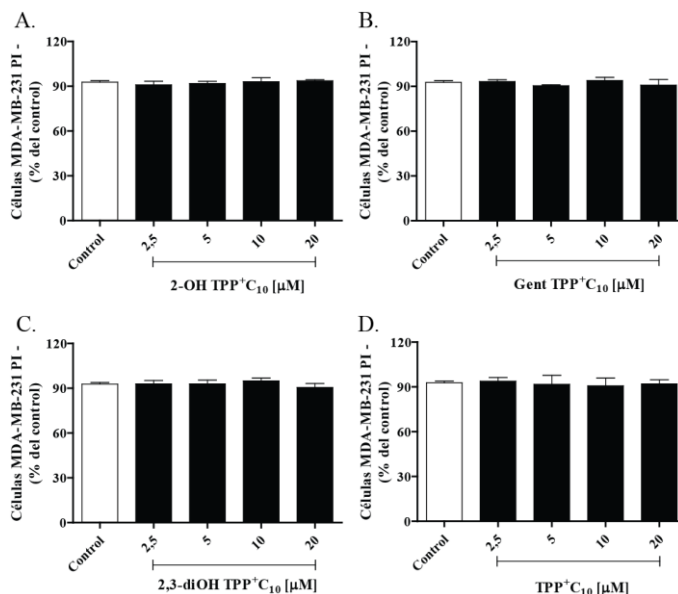


Figura 21: Incorporación de PI a 4 horas en células MCF7 (A) 2-OH TPP⁺C₁₀, (B) Gent TPP⁺C₁₀, (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y (D) TPP⁺C₁₀. Los datos de incorporación de PI se obtuvieron mediante citometría de flujo previa incubación con los compuestos en estudio durante 4 horas. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 4 horas.

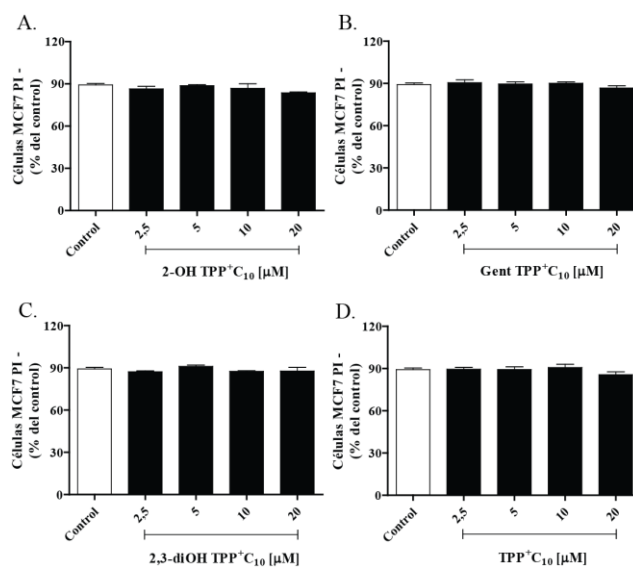


Figura 22: Incorporación de PI a 4 horas en células MDA-MB-231. (A) 2-OH TPP⁺C₁₀, (B) Gent TPP⁺C₁₀, (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y (D) TPP⁺C₁₀. Los datos de incorporación de PI se obtuvieron mediante citometría de flujo previa incubación con los compuestos en estudio durante 4 horas. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 4 horas.

5.8.3. LA CAÍDA DEL NIVEL DE ATP INDUCIDA POR Gent TPP⁺C₁₀ ES COMPENSADA POR LA ACCIÓN DE ADENILATO KINASA Y AMPK

Adenilato kinasa y la proteína kinasa activada por AMP (AMPK), son dos enzimas censoras del estado metabólico celular. La primera cumple un rol dual, monitoreando el estado metabólico celular y ejecutando mecanismos de señalización. Esta enzima kinasa es capaz de catalizar la reacción de transferencia de grupos fosforilos, $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$, en estados de estrés metabólicos, como también regular la economía metabólica a través de la regulación de la razón de nucleótidos en diferentes compartimentos celulares y a través de enzimas metabólicas sensibles a AMP [81].

Por su parte AMPK es activada por el incremento de la razón AMP:ATP o ADP:ATP. Este evento ocurre cuando el estado energético celular está comprometido producto de estrés celular, lo cual puede ser desencadenado por un acelerado consumo de ATP o por una interferencia en la producción de este nucleótido. Esta kinasa actúa restaurando la homeostasis por activación de procesos catabólicos [82]. Dado que, el producto generado por adenilato kinasa es AMP, es principalmente este nucleótido el que se encuentra en mayor proporción comparado con ADP o ATP en un estado de estrés metabólico, y es él quien principalmente activa a AMPK [83].

Para comprobar cómo estas dos enzimas compensan la caída de ATP producto de un estrés metabólico se utilizó P¹,P⁵-Di(Adenosina-5')Pentafosfato (Ap5a), un inhibidor de la enzima adenilato kinasa [84], y dorsomorfina, inhibidor específico de AMPK [85]. De los derivados de alquilhidroxibenzoatos se seleccionó Gent TPP⁺C₁₀, por ser el compuesto con mayor actividad.

La **Figura 23** muestra cómo la caída de ATP inducida por Gent TPP⁺C₁₀ es parcialmente compensada por la actividad adenilato kinasa en la línea MCF7. Al inhibir mediante Ap5A hay una ligera disminución en relación al compuesto estudiado a 10 μ M y 20 μ M. Probablemente esto ocurre debido a que el inhibidor fue adicionado una hora

antes del término del tratamiento en forma conjunta con digitonina, debido a la alta impermeabilidad que presenta la sal de pentafosfato en la membrana citoplasmática. En el caso de MDA-MB-231, no se registran variaciones en el tratamiento conjunto de Gent TPP⁺C₁₀ y Ap5A.

En la **Figura 24** se aprecia una disminución significativa de la cantidad de ATP con el uso conjunto del inhibidor de AMPK y el compuesto dihidroxilado estudiado. Luego de 4 horas de tratamiento con Gent TPP⁺C₁₀ 10μM la cantidad de ATP con respecto al control es de $84,05 \pm 2,42\%$, en cambio si el tratamiento se realiza en conjunto con dorsomorfina, la cantidad de ATP disminuye a $61,77 \pm 2,64\%$; en el caso de la concentración Gent TPP⁺C₁₀ 20 μM el tratamiento en conjunto permite una caída desde $68,94 \pm 1,47 \%$ a $38,89 \pm 1,58 \%$ con respecto al control.

Especialmente interesante resulta la caída de ATP en la línea MDA-MB-231 inducida por el Gent TPP⁺C₁₀ 20μM en presencia de dorsomorfina, pues cuando se analiza el compuesto por separado, no hay cambios significativos con respecto al control, pero en el tratamiento conjunto el porcentaje desciende a un $76,61 \pm 2,20\%$.

Los controles realizados, donde se comprueba que las concentraciones utilizadas de Ap5A, dorsomorfina y digitonina no disminuyen el ATP se adjuntan en material anexo, al igual que el control de viabilidad realizado a una hora con digitonina mediante el ensayo de MTT.

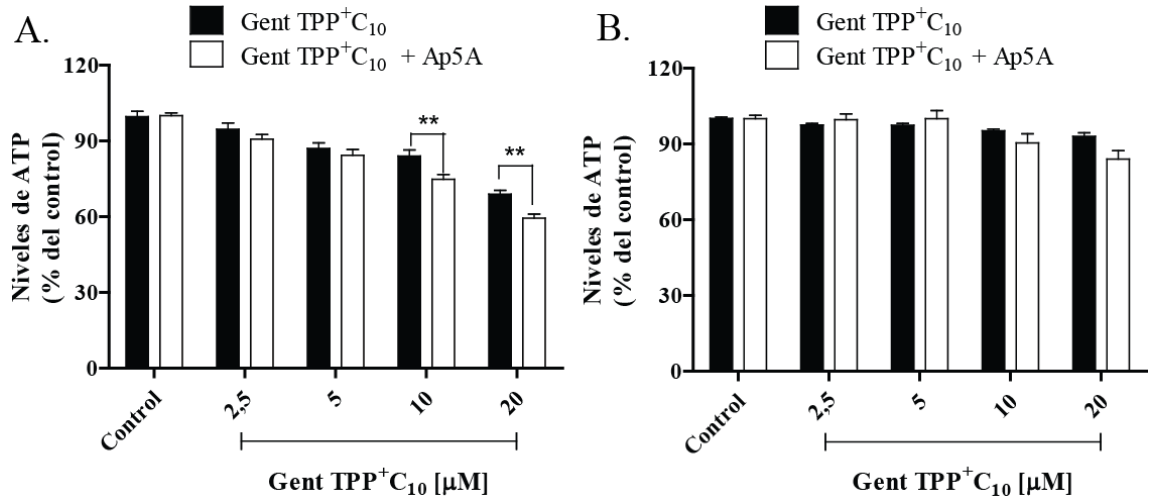


Figura 23: Efecto compensatorio de adenilatokinasa en la caída de ATP inducida por Gent TPP⁺C₁₀ en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Los niveles de ATP se midieron mediante el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Luego de 3 horas de tratamiento con Gent TPP⁺C₁₀ y Ap5A 5 µM, se incorporó digitonina 0,625 µg/mL hasta completar las cuatro horas de tratamiento. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO, Ap5A y digitonina según lo descrito. ** $p \leq 0,01$ con respecto al control.

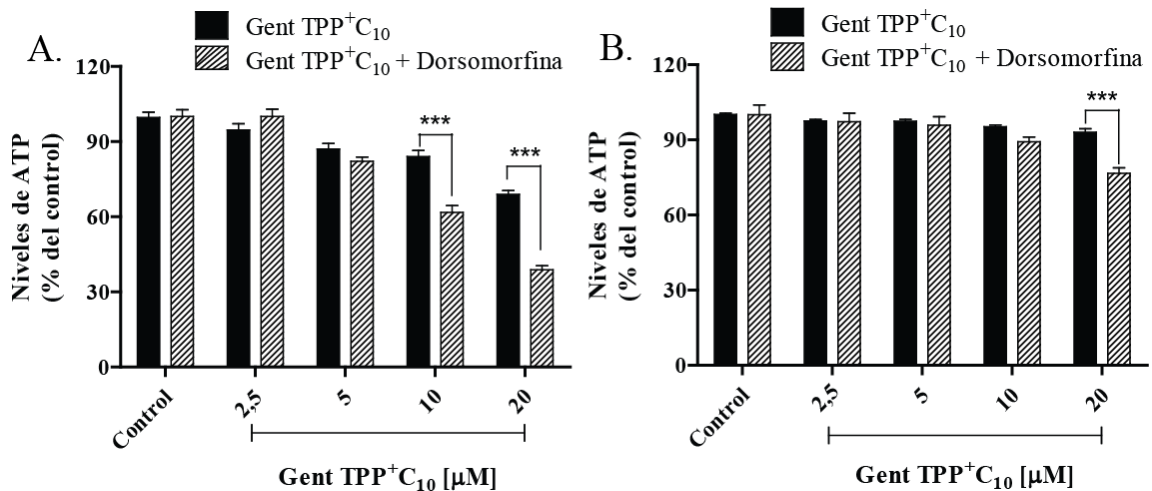


Figura 24: Efecto compensatorio de AMPK en la caída de ATP inducida por Gent TPP⁺C₁₀ en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. En forma simultánea se adicionó Gent TPP⁺C₁₀ y dorsomorfina 1 µM por 4 horas. El control corresponde a células incubadas con DMSO y dorsomorfina 1 µM durante 4 horas. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

Para comprobar el efecto compensatorio de AMPK fueron determinados los valores de IC₅₀ en el tratamiento conjunto de Gent TPP⁺C₁₀ y dorsomorfina 1 μM mediante la técnica de MTT en células MCF7. Este valor fue comparado con los valores de IC₅₀ obtenidos mediante el uso del compuesto dihidroxilado de manera independiente. La **Tabla 2** muestra una disminución significativa del valor de obtenido a 24 horas cuando se compara la acción de Gent TPP⁺C₁₀ con la presencia de dorsomorfina.

El control realizado para determinar la concentración correcta de dorsomorfina a utilizar, se adjunta como material anexo.

MCF7	24 horas	48 horas
Gent TPP⁺C₁₀	9,41 ± 1,05	2,35 ± 0,43
Gent TPP⁺C₁₀ + dorsomorfina	2,94 ± 0,35	2,98 ± 0,29

Tabla 2: Determinación del efecto compensatorio de AMPK en la viabilidad celular. Células de la línea MCF7 fueron incubadas concentraciones crecientes de Gent TPP⁺C₁₀ (0,1-50 μM) y dorsomorfina 1 μM. El efecto antiproliferativo se estimó mediante el ensayo de MTT. Los valores fueron calculados desde la curva sigmoideal dosis-respuesta. Los resultados representan el promedio de IC₅₀ (μM) de al menos 3 experimentos independientes ± SEM.

5.9. EVALUACIÓN DEL TIPO DE MUERTE INDUCIDA POR LOS ALQUILHIDROXIBENZOATOS-TPP⁺ EN CÉLULAS MCF7 Y MDA-MB-231

Para evaluar el tipo de muerte inducida en células tumorales humanas por los derivados de alquilhidroxibenzoatos, se estudió la exposición de fosfatidilserina, un marcador de apoptosis, mediante tinción con Anexina V (AV) y la permeabilización de membrana plasmática a través de yoduro de propidio (PI).

Los resultados expresados en la **Figura 25** indican que luego de una exposición de 48 horas con los compuestos en estudio, a concentraciones cercanas al IC₅₀ obtenidas por MTT (2,5 y 5 μ M) se favorece la expresión de marcadores celulares de tipo apoptótico en células MCF7.

En la cuantificación, mostrada en la **Figura 25 B, C y D** se representa la apoptosis total, como todas aquellas poblaciones de células que expresan el marcador de apoptosis. El porcentaje de necrosis, indicada como la población que es permeable a PI pero no presenta exposición de fosfatidilserina, no supera del 8% del total de la población estudiada en cada uno de los compuestos, por lo que no se aprecian diferencias frente al control.

El mismo estudio fue realizado en la línea metastásica MDA-MB-231, donde las concentraciones utilizadas fueron de 10 y 20 μ M por un periodo de 48 horas. La cuantificación expresada en la **Figura 26** muestra un gran porcentaje de células vivas, y un porcentaje de apoptosis total que tiene su máximo con Gent TPP⁺C₁₀ cercano al 18%. Es por ello que se compara en la **Figura 27** la muerte producida por los compuestos estudiados, utilizando las mismas concentraciones en un tratamiento realizado a 24 horas. En ella se aprecia claramente que existe una mayor muerte a 24 horas, lo que sugiere que los compuestos en estudio inducen en esta línea una muerte temprana, la cual no es apreciable a las 48 horas.

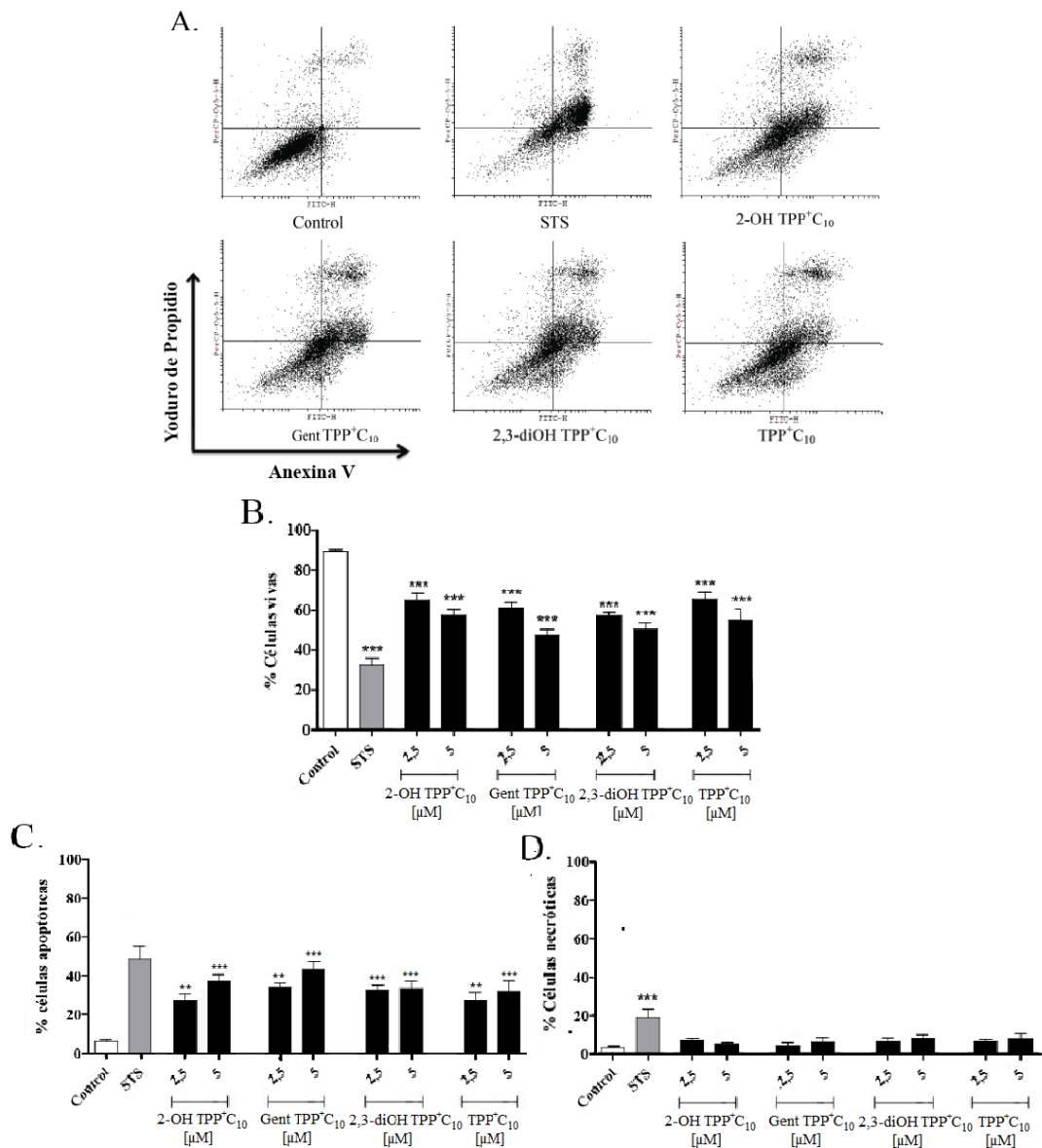


Figura 25: Efecto sobre el tipo de muerte celular en MCF7. (A) Efecto sobre la muerte celular en MCF7. (B) Células vivas (C) Apoptosis total y (D) población PI+/AV-. Las células fueron incubadas durante 48 horas con los compuestos en estudio. Se utilizó estaurosporina (STS) 10 μ M. El tipo de muerte se determinó mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V y PI. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 48 horas

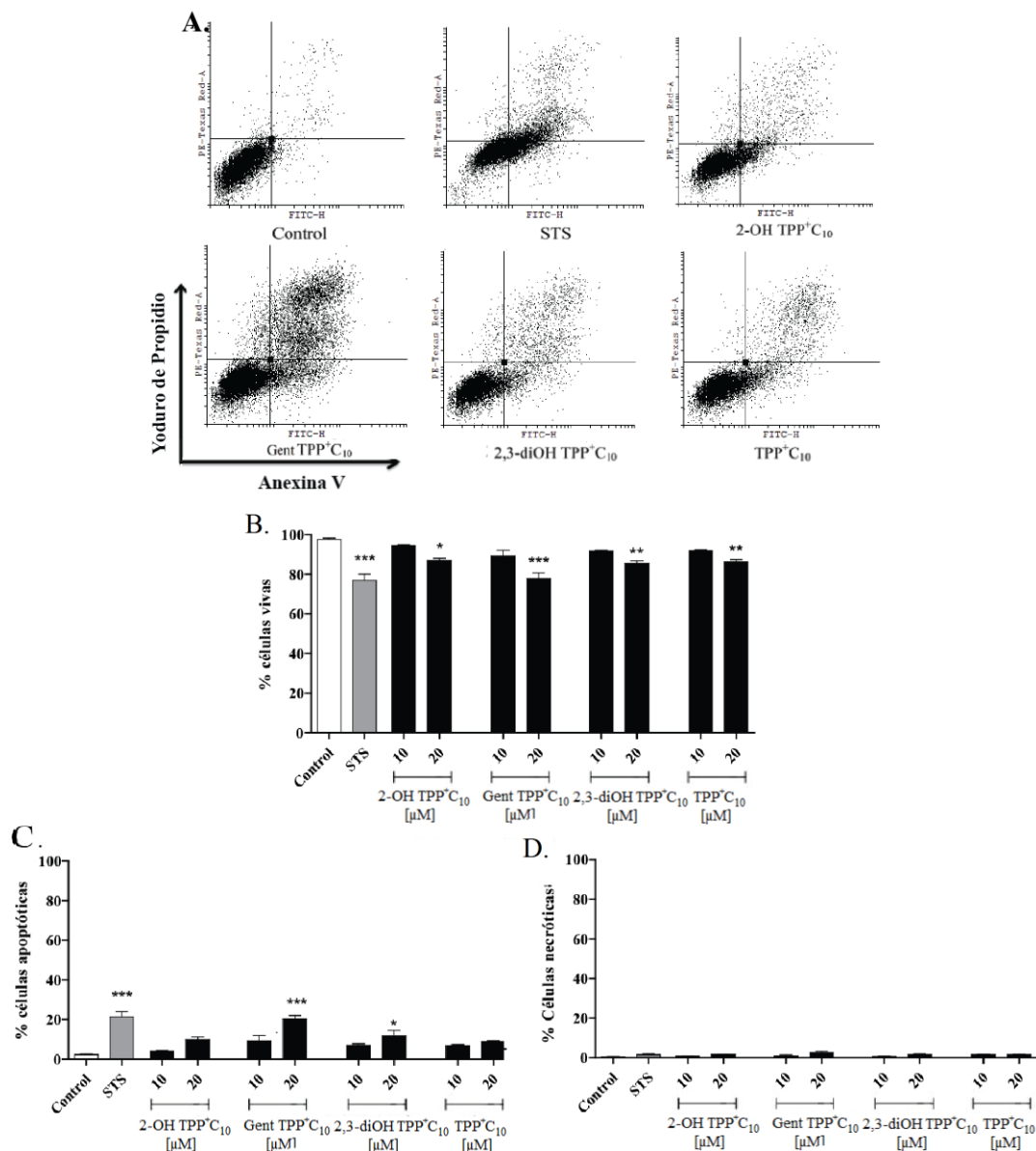


Figura 26: Efecto sobre el tipo de muerte celular en MDA-MB-231. (A) Efecto sobre la muerte celular en MDA-MB-231. (B) Células vivas (C) Apoptosis total y (D) población PI+/AV-. Las células fueron incubadas durante 48 horas con los compuestos en estudio. Se utilizó estaurosporina (STS) 10 μ M. El tipo de muerte se determinó mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V y PI. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 48 horas.

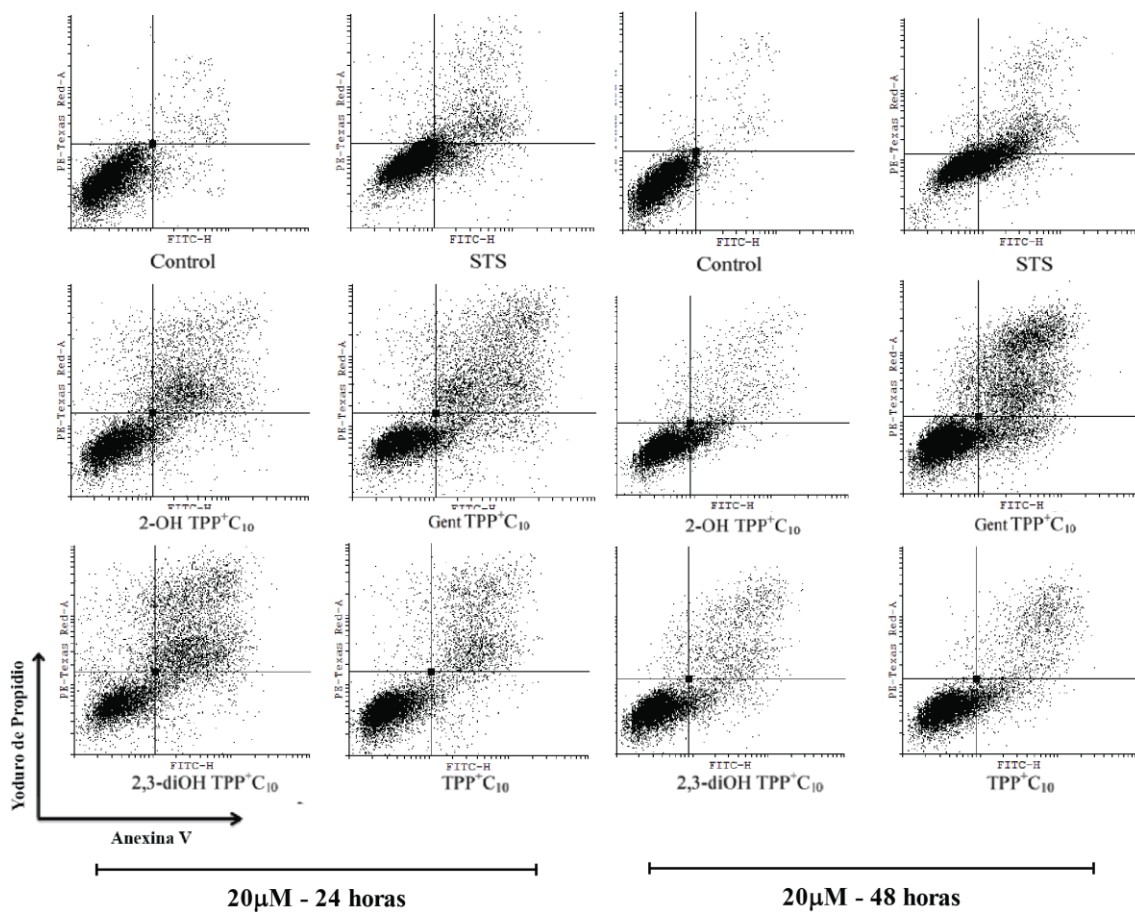


Figura 27: Efecto sobre el tipo de muerte celular en MDA-MB-231 (A) 24 horas y (B) 48 horas. El tipo de muerte se determinó mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V y PI utilizando una concentración de 20 µM para cada derivado estudiado. Se utilizó estaurosporina (STS) 10µM. El control corresponde a células incubadas con DMSO.

5.10. 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀ PRESENTAN SELECTIVIDAD FRENTE A CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS HUMANAS

La selectividad de los compuestos se analizó mediante la comparación de la línea epitelial mamaria MCF 10F con su variante tumoral MCF7, por medio de la cuantificación de la inhibición de la proliferación a través de MTT, medición de tipo de muerte mediante exposición de fosfatidilserina e incorporación de PI y determinación del ATP total.

Por medio del ensayo de MTT realizado con los cuatro derivados de alquilhidroxibenzoatos en la línea MCF 10F, se observó que Gent TPP⁺C₁₀ y 2-OH TPP⁺C₁₀ presentan una marcada selectividad cuando se compara el porcentaje de inhibición de la proliferación en concentraciones cercanas al IC₅₀ del obtenido con la variante tumoral MCF7. Con Gent TPP⁺C₁₀ 2,5 μM a las 48 horas de tratamiento, se obtuvo una inhibición de la proliferación en torno a un 36,4% en MCF7 y un 92,6% en MCF 10F. En el caso de 2-OH TPP⁺C₁₀ 2,5 μM, los porcentajes de inhibición alcanzan 37,8% y 94% respectivamente, **Figura 28**.

Con los compuestos TPP⁺C₁₀ y 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ no se logra apreciar una diferencia significativa en el porcentaje de inhibición alcanzando al comparar las dos líneas celulares, a las diferentes concentraciones analizadas.

Luego de seleccionar los dos compuestos que presentaron mayor selectividad mediante MTT, 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀, se comprobó que mediante el marcaje con Anexina V y la incorporación de PI existe una diferencia significativa entre la población viva obtenida a las concentraciones analizadas. El porcentaje de células vivas en MCF 10F a una concentración de 5 μM es $82,01 \pm 4,56\%$ y $76,84 \pm 1,22\%$, para 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀ respectivamente, mientras que en la variante tumoral la población viva alcanza un $48,27 \pm 3,21\%$ y $54,38 \pm 2,62\%$, respectivamente. Similares selectividades se obtienen a concentración 2,5 μM para ambos compuestos estudiados, **Figura 29**.

Al analizar el contenido total de ATP luego de un tratamiento de 4 horas con los compuestos 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀ se observa que no existe una diferencia significativa en la caída del ATP total en la línea MCF 10F, pues la cantidad de ATP total alcanza un $86,79 \pm 2,30\%$ y $85,64 \pm 3,06\%$ con respecto al control utilizando 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺ respectivamente, ambos a una concentración de 20 μ M, **Figura 30**. La selectividad se aprecia aun cuando las células son incubadas con el inhibidor de AMPK, en donde se observa que mediante el tratamiento en conjunto con Gent TPP⁺C₁₀ 20 μ M y dorsomorfina 1 μ M, la caída de ATP en MCF 10F y MCF7 alcanzan a $81,28 \pm 1,58\%$ y $38,89 \pm 1,58\%$, respectivamente en relación al control, **Figura 31**. Similares resultados se aprecian cuando las células son incubadas con el inhibidor Ap5A, **Figura 30**.

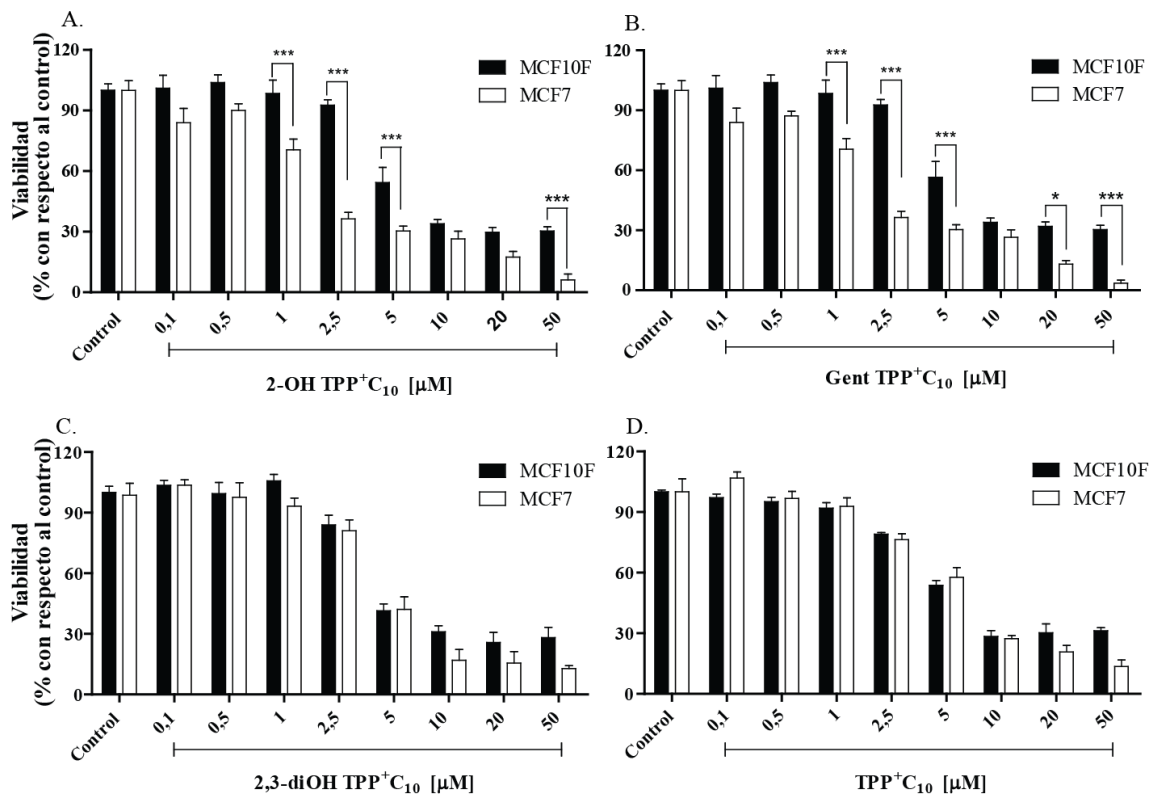


Figura 28: Selectividad de los derivados de alquilhidroxibenzoatos frente a la línea de epitelio mamario MCF 10F. (A) 2-OH TPP⁺C₁₀, (B) Gent TPP⁺C₁₀, (C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y (D) TPP⁺C₁₀. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de los compuestos analizados (0,1-50 μM) por 48 horas. El efecto antiproliferativo se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados representan el promedio. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO.

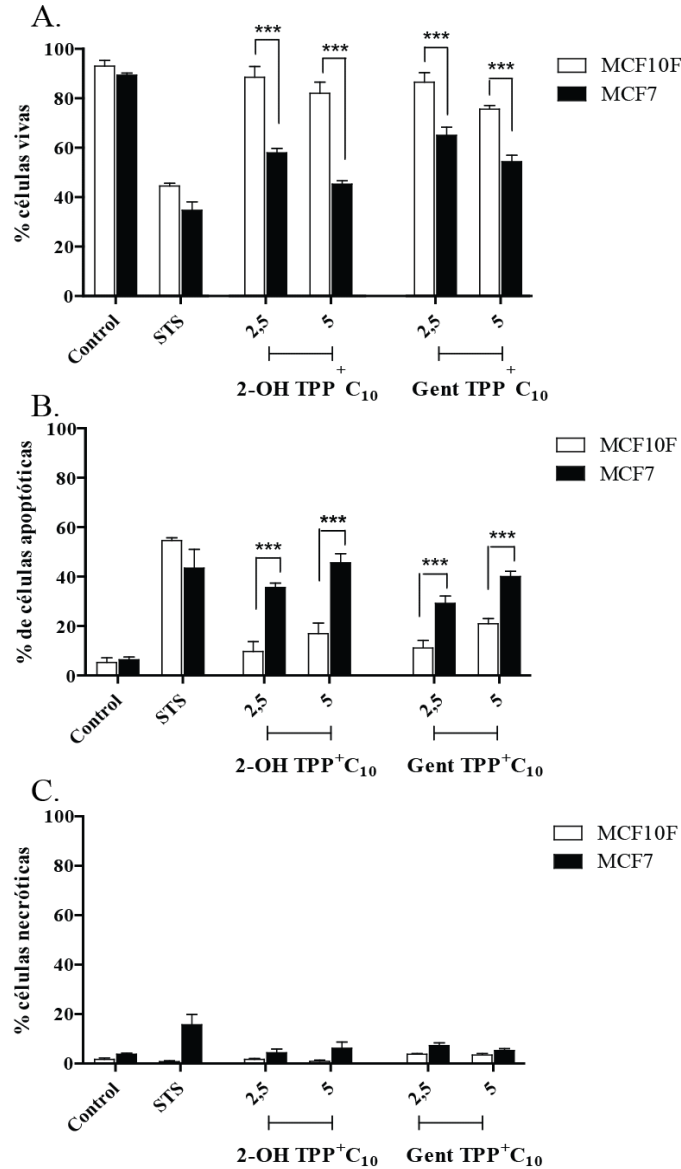


Figura 29: Comparación de la muerte inducida por los derivados de alquilhidroxibenzoatos en células MCF 10F y MCF7. (A) Células vivas, (B) Apoptosis total y (C) población PI+/AV-. Las células fueron tratadas durante 48 horas con los compuestos en estudio. Se utilizó estaurosporina (STS) 10µM. El tipo de muerte se determinó mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V y PI. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. *** = $p \leq 0,001$ con respecto al mismo tratamiento entre diferentes líneas. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 48 horas.

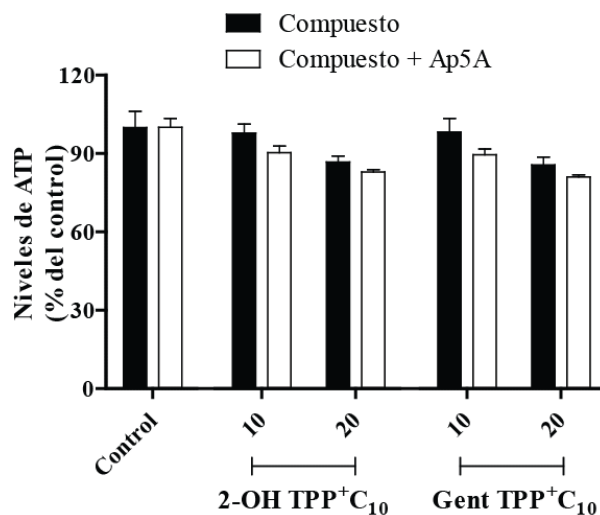


Figura 30: Efecto compensatorio de adenilatokinasa en la caída de ATP inducida por Gent TPP⁺C₁₀ en células MCF 10F y MCF7. Los niveles de ATP se midieron mediante el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Luego de 3 horas de tratamiento con Gent TPP⁺C₁₀ se incorporó Ap5A 5 μM y de digitonina 0,625 μg/mL hasta completar las 4 de tratamiento. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO, Ap5A y digitonina según lo ya descrito.

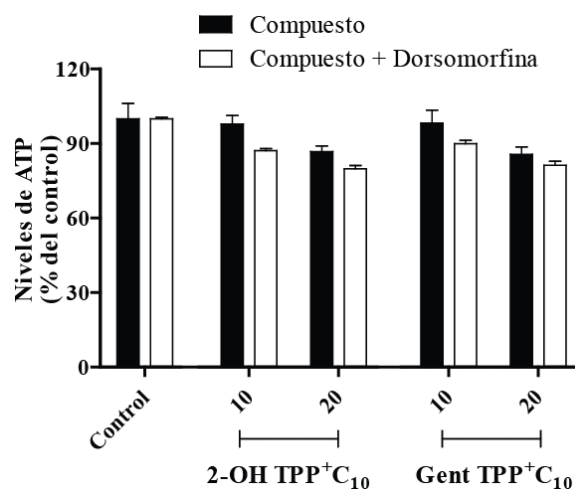
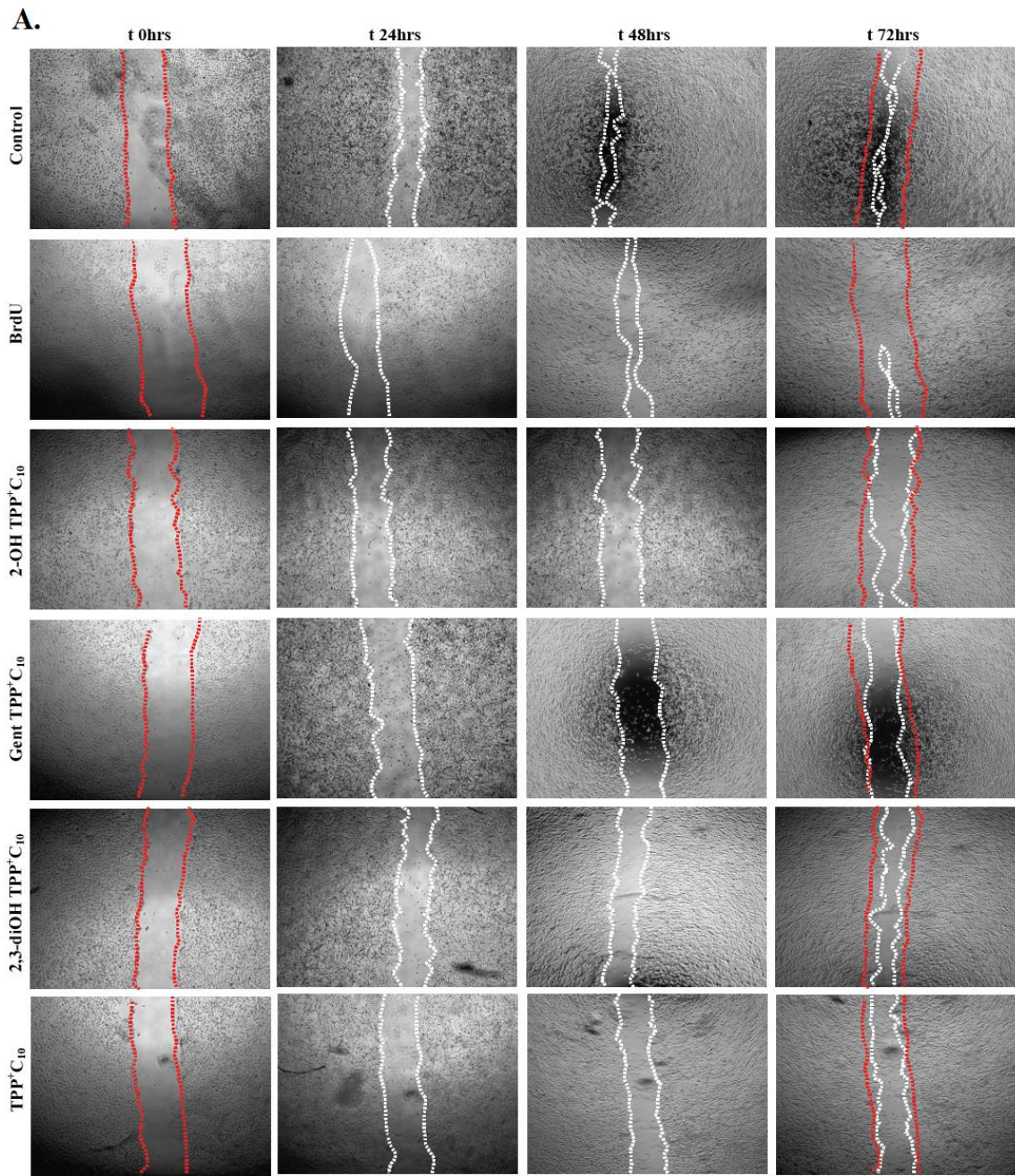


Figura 31: Efecto compensatorio de AMPK en la caída de ATP inducida por Gent TPP⁺C₁₀ en células MCF 10F y MCF7. En forma simultanea se adicionó Gent TPP⁺C₁₀ y Dorsomorfina 1 μM por 4 horas. El control corresponde a células incubadas con DMSO y Dorsomorfina 1 μM durante 4 horas. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3.

5.11. LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS AFECTAN LA MIGRACIÓN EN CÉLULAS TUMORALES METASTÁSICAS MDA-MB-231

El ensayo de la herida permite comprobar cómo la capacidad migratoria es afectada al inducir una alteración a nivel mitocondrial. Se utilizó la línea MDA-MB-231, la cual posee características metastásicas. Se utilizaron concentraciones bajas de los compuestos en estudio para asegurar que no exista una inhibición significativa de la viabilidad celular al tiempo estudiado.

Como se muestra en la **Figura 32**, luego de un tratamiento de 72 horas, se comprueba que los derivados mono- y dihidroxilados son capaces de inhibir significativamente la migración con respecto al control, no así el compuesto TPP⁺C₁₀ derivado del ácido gálico. El porcentaje de cierre de la herida con respecto al tiempo inicial de las células tratadas con DMSO fue de un 35,15%, en cambio utilizando la concentración máxima utilizada, el porcentaje de cierre de herida de 2-OH TPP⁺C₁₀ alcanzó el 69,59% , Gent TPP⁺C₁₀ 73,00%, 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ 69,10%. Sumado a lo anterior, se comprueba que los compuestos dihidroxilados presentaron una mayor eficiencia en la inhibición del cierre de herida, pues a la concentración 2,5 μM presentan un efecto significativo con respecto al control.



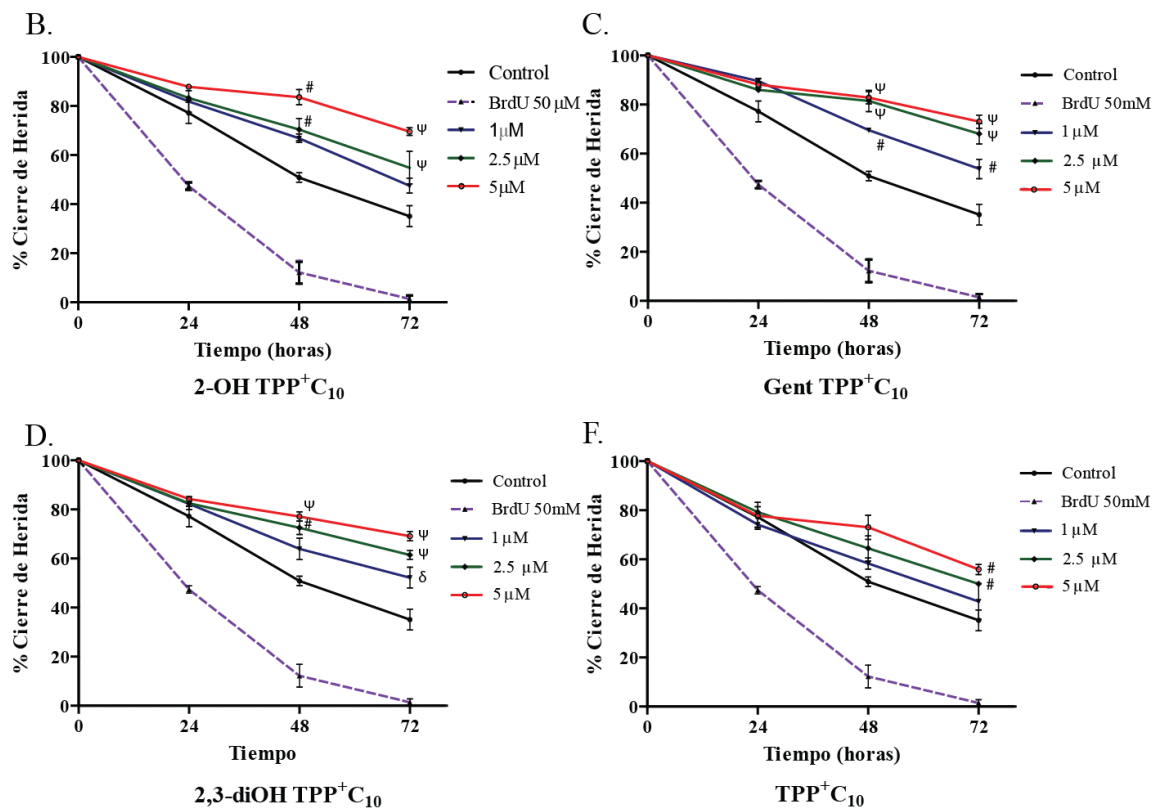


Figura 32: Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la migración en células MDA-MB-231 (A) Esquema representativo, (B) 2-OH TPP⁺C₁₀, (C) Gent TPP⁺C₁₀, (D) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y (E) TPP⁺C₁₀. Las células fueron expuestas a concentraciones 1, 2,5 y 5 μM de los compuesto en estudio por 72 horas. El ensayo de migración se realizó mediante el ensayo de herida. Cada concentración está normalizada por su propio control a tiempo 0. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. δ = $p \leq 0,05$; # = $p \leq 0,01$; Ψ = $p \leq 0,001$. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 72 horas.

6. DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado una alta actividad citotóxica de los cationes lipofílicos derivados de ácido gálico en diferentes células de cáncer de mama murinas [61], Es por ello que el estudio de estos compuestos, sumado a nuevos derivados mono y dihidroxilados en células de cáncer de mama humanas permitió demostrar una alta actividad citotóxica, sin importar el estadio del cual provengan las células tumorales.

Los cationes lipofílicos derivados de alquilhidroxibenzoatos estudiados poseen una potente actividad citotóxica en células de cáncer de mama humanas, la cual es independiente del modelo celular estudiado, pues para cada compuesto el orden de magnitud de los valores obtenidos de IC_{50} se mantiene. Esto refleja que los compuestos presentan actividad citotóxica independientemente del perfil metabólico o la presencia de receptores de crecimiento y hormonales en las células tumorales analizadas, el cual es altamente glicolítico en las líneas celulares triple negativas MDA-MB-231 y BT-549, y de un aspecto más oxidativo en la línea MCF7 y AU565, caracterizadas además por la presencia de los receptores hormonales para estrógeno y progesterona, y el receptor de crecimiento, HER2, respectivamente.

Los resultados muestran que los nuevos derivados del ácido 2-hidroxibenzoico presentan una actividad mayor que su predecesor derivado del ácido gálico, en especial destacan los compuestos 2-OH TPP⁺C₁₀ y Gent TPP⁺C₁₀ los cuales presenta una diferencia estadísticamente significativa frente a los otros derivados estudiados (**Tabla 1**).

Al analizar la variación de los valores de inhibición media (IC_{50}), obtenidos mediante los ensayos de proliferación celular, se observa que éste disminuye con el tiempo, efecto que es especialmente significativo entre las 24 y 48 horas en las líneas MCF7, AU656 y BT-549 ($p < 0,001$). Esto demuestra que el efecto antiproliferativo

ejercido por los derivados de alquilhidroxibenzoatos en estudio es de tipo citotóxico, y no de carácter citostático, pues la viabilidad celular disminuye en función del tiempo de exposición.

Es interesante notar que el compuesto Gent C₁₀ no presenta una actividad antiproliferativa significativa, lo que cambia radicalmente cuando el grupo trifenilfosfonio es incorporado a la cadena. Esto demuestra que la porción catiónica es esencial para generar la actividad del compuesto total, pues es capaz de generar un tropismo a la mitocondria [37, 40].

El mecanismo principal por el cual actúan desacoplantes clásicos, como por ejemplo; CCCP, FCCP, 2,4-dinitrofenol, es la entrega de protones en la matriz mitocondrial (mecanismo protonóforo) [86]. Por lo que estas moléculas son capaces de capturar un protón desde el espacio intermembrana y transferirlo a la matriz mitocondrial, actuando como lanzadera de protones entre estos compartimentos [61]. Esta propiedad se fundamenta en que dichos desacoplantes presentan la característica de ser ácidos débiles lipofílicos con un pKa en el rango de pH fisiológico, los cuales pueden permear entre membranas lipídicas en forma neutra o aniónica [87], esta última forma se caracteriza por una deslocalización de la carga negativa, facilitando así su permeabilidad a través de la membrana [88].

El mecanismo desacoplante, ya descrito para TPP⁺C₁₀, es a través de la neutralización de carga producto de la porción catiónica entregada por la incorporación del grupo trifenilfosfonio, y una actividad protonófora debido a que el núcleo farmacóforo presenta una característica de ácido débil [61].

El estado protonado o desprotonado de un ácido débil está relacionado con el pH del medio en el cual se encuentre y el valor de pKa de cada protón ácido presente. Esta relación puede ser predicha a través de la ecuación de Henderson-Hasselbach, la cual ha sido empleada para determinar la concentración de sondas como 5,5-dimetil-2,4-

oxazolidindiona (DMO) incorporada en cada sección mitocondrial [89, 90], y la actividad de protonóforos como n-dodecil-oxicarbonil-fluoresceína (C12-FL) [87]

El potencial de transmembrana mitocondrial es producto de la diferencia de pH existente entre el espacio transmembrana, donde alcanza un valor de $7,78 \pm 0,17$ y la matriz mitocondrial, el cual es $6,88 \pm 0,09$ [91].

En el caso del compuesto Gent TPP⁺C₁₀, el cual en las pruebas in vitro presentó la mayor actividad, los valores de pKa aparente son $8,73 \pm 0,43$ y $10,78 \pm 0,18$; dadas estas condiciones este compuesto puede desprender sólo un protón. Las constantes aparentes de los protones ácidos de los otros compuestos son, $8,15 \pm 0,30$ para 2-OH TPP⁺C₁₀; $7,85 \pm 0,35$ y $11,70 \pm 0,10$ para 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ y $7,93 \pm 0,25$; $11,19 \pm 0,15$ y $13,41 \pm 0,25$ TPP⁺C₁₀.

Según la ecuación de Henderson-Hasselbach se puede predecir teóricamente que la razón protonado/desprotonado para Gent TPP⁺C₁₀, en el espacio intermembrana es de 10,71; en cambio en la matriz mitocondrial es de 85,11; lo que expresa que en el lado externo de la membrana interna, por cada mol de la fracción ionizada, existen 85,11 moles de la fracción no ionizada; en cambio en el cara interna de la membrana interna por cada mol de fracción ionizada, se encuentran sólo 10,71 moles de la fracción no ionizada, esto quiere decir que el equilibrio en la matriz mitocondrial se desplaza drásticamente hacia la forma ionizada del grupo hidroxilo, liberando el H⁺. Favoreciendo con esto la actividad protonófora del compuesto.

En el caso del compuesto TPP⁺C₁₀, el cual en conjunto con 2,3-diOH TPP⁺C₁₀ presenta una menor actividad, la razón protonado/desprotonado en el espacio intermembrana es de 13,48; en cambio en la matriz mitocondrial es de 1,6. Este demuestra teóricamente que la capacidad de neutralizar el gradiente de protones generado por el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria es menor, es decir que la cantidad de moles que presentan capacidad amortiguadora es menor que con Gent TPP⁺C₁₀.

Consecuentemente, teóricamente podemos afirmar que el compuesto más activo es Gent TPP⁺C₁₀, seguido de 2-OH TPP⁺C₁₀, terminando con TPP⁺C₁₀, y 2,3-diOH TPP⁺C₁₀. Esto concuerda con la actividad observada *in vitro* de los derivados de alquilhidroxibenzoatos en estudio.

Del mismo modo, usando este razonamiento se puede predecir la actividad de otros derivados de alquilhidroxibenzoatos actualmente en estudio. Por ejemplo, en el caso del compuesto derivado del ácido protocatéquico, caracterizado por la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 4 del anillo bencénico, cuyas constantes aparentes son $8,09 \pm 0,20$ y $11,70 \pm 0,10$; se puede deducir que debería tener una actividad similar al compuesto analizado 2-OH TPP⁺C₁₀, debido a su capacidad equivalente de neutralizar las cargas bajo el efecto de lanzadera de protones. Sin embargo, compuestos como 3-hidroxibenceno, el cual posee un pKa de $9,15 \pm 0,10$ la actividad debería decaer, pues el equilibrio siempre está desplazado a la forma protonada en el rango de pH fisiológico de los dos compartimentos mitocondriales.

Estudios previos han demostrado que este tipo de compuestos son capaces de dirigirse selectivamente a la mitocondria, alterando el funcionamiento normal de este organelo [61]. Este efecto se comprueba mediante la medición del consumo de oxígeno tanto en células, como en suspensiones de mitocondrias humanas y murinas (**Figuras 6-9**). Los derivados de alquilhidroxibenzoatos estudiados son capaces de desencadenar un aumento en el consumo de oxígeno en células MCF7 y MDA-MB-231 previa inhibición por oligomicina (**Figura 6 y 7**). El mismo efecto es observado tanto en mitocondrias de tumores humanos como murinos, derivados de las líneas MCF7 y TA3/Ha respectivamente, previa inhibición de la ATPsintasa (**Figuras 8 y 9**). Dado que, luego de la incorporación de un inhibidor conocido de la cadena de electrones, como lo es rotenona [73], el consumo de oxígeno cae abruptamente. Esto sugiere, que el efecto desencadenado por los compuestos es principalmente debido a un efecto desacoplante generado entre la cadena transportadora de electrones y el complejo V mitocondrial.

Se ha demostrado que un aumento en el consumo de oxígeno es ocasionado principalmente por un efecto desacoplante, o un aumento de las especies radicalarias derivadas de oxígeno, producto de la acción de algún agente exógeno. Mediante la medición de la producción de anión superóxido mitocondrial y la pérdida de la actividad de los compuestos analizados producto de un inhibidor de la cadena transportadora de electrones, confirma que el efecto desencadenado es debido al efecto desacoplante generado. (**Figuras 6, 7, 11 y 12**).

Es interesante señalar que la magnitud del efecto desacoplante producido, es directamente proporcional a la actividad citotóxica de cada compuesto, siendo este parámetro un claro predictor del efecto antiproliferativo desencadenado (**Tabla 1, Figuras 6,7**).

El principal problema que limitó el uso de desacoplantes clásicos en terapéutica, como es el caso de CCCP, FCCP o 2,4dinitrofenol, fue el estrecho margen de concentraciones que estos presentaban hasta alcanzar el efecto máximo [74, 92]. Es por ello que es posible demostrar la seguridad de los compuestos derivados de alquilhidroxibenzoatos a través del estudio del rango de concentraciones necesaria para alcanzar dicho efecto, el cual es demostrado por la actividad del protonóforo clásico CCCP. En el caso de los compuestos en estudio, este efecto es alcanzado sólo a concentraciones que oscilan entre 20 veces el IC₅₀ obtenido a 48 horas en el caso de la línea tumoral MCF7, y 10 veces en la línea tumoral MDA-MB-231 (**Figuras 11 y 12**). Lo que demuestra que existe un amplio rango de concentraciones que permite modular la actividad desacoplante.

Entre las características de las células cancerosas se ha documentado la pérdida de la masa y función mitocondrial, especialmente en líneas altamente glicolíticas como es el caso de la línea MDA-MB-231 [55, 76, 77]. Al analizar el efecto desacoplante generado en esta línea, se observa en las figuras 6 y 7 que el cambio en el consumo de oxígeno es aún mayor que en una línea caracterizada por presentar un metabolismo más oxidativo como es el caso de MCF7 [93]. Este resultado, demuestra que no existe una pérdida de la

función y masa mitocondrial, sino una inhibición directa del sistema de fosforilación oxidativa.

La consecuencia inmediata del efecto desacoplante es la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, este es esencial para las diversas funciones que cumple el organelo dentro del metabolismo celular, en los cuales se incluye la síntesis de ATP, el rol homeostático del calcio y la producción de ROS. En las **Figuras 13, 14 y 15** se demuestra cómo los compuestos en estudio son capaces de disminuir el gradiente de protones generado entre las membranas mitocondriales. Efecto que se caracteriza por ser dependiente de la concentración.

Se ha demostrado que el complejo V mitocondrial es capaz de hidrolizar ATP ante la pérdida del potencial de membrana, con el fin de mantener la integridad de este organelo. La **Figura 16** muestra que mediante la acción de un agente desacoplante de la CTE, este complejo mitocondrial no es capaz de restituir el potencial perdido. Además para diferenciar la acción de un agente desacoplante de uno inhibidor de la CTE, se comprobó que al utilizar rotenona la ATPsintasa es capaz de restituir parcialmente el potencial de membrana al hidrolizar ATP, lo cual no es posible al utilizar los compuestos en estudio.

Por otra parte, se ha documentado la participación del factor de inhibición de la fracción F_1 de la ATPsintasa en líneas tumorales altamente glicolíticas y metastásicas, dentro de las cuales se incluyen una serie de líneas triple negativas de cáncer de mama [20, 94]. La **Figura 16** muestra que luego de agregar un compuesto inhibidor de la CTE hay una pérdida del potencial de membrana, el cual es parcialmente restituido en la línea MCF7 debido a la generación del transporte inverso de electrones por la hidrólisis del ATP catalizada por la actividad ATPásica de la ATPsintasa, y no en la línea triple negativa MDA-MB-231, es por ello que postulamos que esta línea presenta una inhibición de la ATPsintasa mediante el inhibidor IF_1 , lo que juega un rol importante en su metabolismo exacerbadamente glicolítico.

Tal como el oxígeno molecular es sustrato del complejo citocromo c oxidasa de la CTE, NADH es sustrato del complejo I mitocondrial [79]. Las **Figuras 17 y 18** muestran el aumento de los niveles de NAD⁺, como producto de un efecto desacoplante generado por el funcionamiento exacerbado de la CTE, por ello se aprecia una disminución significativa de este dinucleótido nicotín-amídico en estado reducido. Este efecto, desencadena un desbalance redox dentro de la célula, una disminución del glutatión reducido y una pérdida de sustrato en la biosíntesis de ácidos nucleicos [95].

La generación de ATP es una función esencial de la mitocondria y clave en la actividad celular. Para la síntesis de este nucleótido es clave la existencia del potencial de membrana, es por ello que producto de un efecto desacoplante se esperaría una disminución del ATP total intracelular. Una disminución significativa se logra apreciar solamente en la línea MCF7, y no en la línea MDA-MB-231, esto se explica por el fenotipo de cada línea celular, pues se ha observado que en la síntesis de ATP de la línea MCF7 participa activamente la función fosforilativa, no así en la línea metastásica [93].

La **Figura 19** muestra que, el compuesto más activo Gent TPP⁺C₁₀ logró una caída de ATP correspondiente a $68,22 \pm 1,83\%$, con respecto al control en la línea MCF7, esta disminución si bien es significativa, no logra ser un parámetro que defina el tipo de muerte celular. Es por ello, que se analizó la posible participación de mecanismos compensatorios en la generación de ATP.

Adenilato kinasa y AMPK son dos enzimas que se activan al existir un desbalance entre AMP-ADP-ATP. Ambas ejercen su acción aumentando el derivado de adenina trifosforilado usando ADP o AMP respectivamente como sustrato. Para comprobar el rol que ejercen cada una de ellas, se utilizó en forma conjunta con el compuesto que presentó más actividad (Gent TPP⁺C₁₀) e inhibidores específicos de estas enzimas metabólicas, Ap5A para adenilato kinasa [84] y dorsomorfina para AMPK [85]. Particularmente interesante resultó la inhibición de esta última enzima reguladora pues la caída de ATP llegó a un $38,89 \pm 1,58 \%$ con respecto al control, lo que demuestra la activación de

mecanismos compensatorios capaces de generar ATP al existir un estrés metabólico (**Figura 23 y 24**).

Además, en la línea MCF7 se aprecia una diferencia significativa ($p < 0,001$) en el valor de IC_{50} obtenido a las 24 horas con respecto a la concentración necesaria a las 48 y 72 horas. Al utilizar en forma conjunta Gent TPP⁺ C₁₀ con un inhibidor de AMPK, se produce una caída en el IC_{50} obtenido a las 24 horas, obteniendo como resultado el valor presentado a las 48 y 72 horas (**Tabla 1 y 2**). Este resultado sugiere que el derivado analizado es capaz de desencadenar un estrés metabólico, el cual es parcialmente compensado por la acción de AMPK, pero el cual no es suficiente para mantener la integridad celular en un plazo más amplio de tiempo.

La evaluación del tipo de muerte desencadenado por los compuestos en estudio, se realizó mediante el marcaje de fosfatidilserina, un marcador apoptótico, y la evaluación de la permeabilidad celular mediante yoduro de propidio. Este experimento mostró que como consecuencia final de las alteraciones metabólicas inducidas por los compuestos en estudio se desencadena una muerte principalmente de tipo apoptótica (**Figura 25 y 26**).

Los resultados expresados de este experimento, son informados como apoptosis total, pues dado el diseño, el cual está realizado sólo a 48 horas, no permite discriminar una apoptosis temprana, en donde se evidencia la exposición de fosfatidilserina sin una pérdida en la integridad de la membrana plasmática, de un estado tardío donde ya se evidencia la permeabilidad de dicha membrana. [96]

En la **Figura 25**, se observa que en células MCF7 el tipo de muerte inducido por los compuestos es de características apoptóticas, pues se aprecia una amplia exposición de fosfatidilserina, utilizando cada uno de los compuestos. Sin embargo, en el caso de la línea MDA-MB-231, a las 48 horas, no se aprecia una muerte significativa pese a utilizar concentraciones similares a los valores de IC_{50} obtenidos por el ensayo de viabilidad realizado con MTT. Esto se debe a que, como se muestra en la **Figura 27**, el experimento fue realizado a 24 horas, este tipo de células experimenta una muerte temprana. Es por

ello que este resultado no es apreciable a las 48 horas, puesto que dado que se utilizó un citómetro de flujo, las células ya muertas no presentan un tamaño y complejidad suficiente como para ser analizadas correctamente por este equipo.

La selectividad que presentan estos compuestos se comprobó mediante la comparación de la línea MCF7 frente a células de tipo epitelial MCF 10F, la cual corresponde a una línea celular epitelial de mama no transformada espontáneamente inmortalizada, por lo que representa un óptimo modelo de estudio ya que presentan un metabolismo similar [97]. A través de los ensayos de proliferación celular, tipo de muerte inducida y la cuantificación de la caída del ATP generado.

Como primera evaluación se utilizó el ensayo de MTT, el cual evidenció una mayor selectividad de los dos compuestos más activos, 2-OH TPP⁺ C₁₀ y Gent TPP⁺ C₁₀, pues se aprecia una selectividad estadísticamente significativa ($p < 0,001$) a concentraciones cercanas al IC₅₀ obtenido en la línea MCF7 medido a 48 horas, (1-5 μM) (**Figura 28**).

Además, se comprobó la selectividad de los compuestos 2-OH TPP⁺ C₁₀ y Gent TPP⁺ C₁₀ al analizar la disminución del ATP inducida. La disminución en la línea MCF 10F es muy inferior a la desencadenada en MCF7, siendo una diferencia significativa incluso cuando la presencia de los inhibidores de AMPK y adenilato kinasa (Figura 29 y 30). Lo anterior se refuerza, mediante el análisis del tipo de muerte inducida, pues se aprecia que a las concentraciones que en la línea MCF7 ejercen una inhibición del 50% de la viabilidad celular en comparación a las células control, en la línea epitelial no se observa una cantidad significativa de muerte celular. Por todo lo anterior se concluye, que los dos compuestos más activos de los alquilhidroxibenzoatos derivados presentan una importante selectividad frente a líneas tumorales, ejerciendo un efecto significativamente menor frente a pares normales.

Pese a los concluyentes resultados presentados, se debe mencionar que el modelo *in vitro* utilizado, no es el más óptimo para el análisis de la selectividad de los compuestos

estudiados, puesto que se hipotetizó que la selectividad de estos compuestos se basa en la capacidad de dirigirse selectivamente a la mitocondria de células tumorales, ya que estas presentan una mayor potencial de transmembrana que las presentadas por sus pares normales, esta sería la condición clave para generar una preferencia de los cationes lipofílicos por mitocondrias tumorales. En los experimentos *in vitro* desarrollados esta preferencia no se presenta, dado que por condición analizada sólo es posible estudiar una línea celular a la vez y no desarrollar las condiciones necesarias para generar una preferencia por un tipo celular. Todas estas condiciones se pueden desarrollar, casi en forma exclusiva en experimentos de tipo *in vivo*, pues hay un acercamiento real, en donde se puede evaluar la preferencia celular de estos compuestos frente a las células tumorales. Sin embargo, la hipótesis presentada se basa en diversos estudios previos que han demostrado ampliamente que la incorporación de cationes lipofílicos deslocalizados, y en especial con el grupo trifenilfosfonio presentan un tropismo selectivo frente a mitocondrias tumorales. [37]

Se ha demostrado que compuestos desacoplantes son capaces de disminuir la migración en líneas metastásica debido a la disminución de ATP [98]. Es por ello que se demostró que los alquilhidroxibenzoatos estudiados son capaces de ejercer este efecto en la línea celular metastásica MDA-MB-231. Utilizando concentraciones menores al IC_{50} , para evidenciar una disminución en la capacidad migratoria y no un efecto citotóxico. En la **Figura 32**, se aprecia que existe una disminución en la migración celular, la cual de carácter significativo con los compuestos más activos, 2-OH TPP⁺ C₁₀ y Gent TPP⁺ C₁₀ ($p < 0,01$). Este efecto podría desencadenarse por la disminución del ATP generada a largo plazo producto del efecto desacoplante generado, dado que el ATP procedente de la vía glicolítica es altamente dependiente de la correcta función de la fosforilación oxidativa.

El mecanismo completo por el cual estos derivados ejercen su acción citotóxica no queda completamente dilucidado pues, la muerte celular no se genera por una disminución crítica del ATP o un desbalance redox. Sin embargo, se ha demostrado que una disminución crítica del potencial de membrana favorece la liberación de factores

apoptóticos claves como lo es citocromo c, elemento esencial en la formación del apoptosoma para la activación de caspasas. Además, la caída del potencial de transmembrana mitocondrial, se debería traducir en la pérdida de la función mitocondrial en la homeostasis del calcio, generando un aumento de este catión en el espacio citosólico, lo cual genera la activación de diversos procesos que desencadenan en la muerte celular.

7. CONCLUSIÓN

Los derivados de alquilhidroxibenzoatos en estudio presentan una alta actividad citotóxica en células de cáncer mamario humanas. La cual resulta ser independiente del perfil metabólico o la presencia de receptores de crecimiento y hormonales.

La generación del catión lipofílico deslocalizado producto de la adición del grupo trifenilfosfonio, logra dirigir los compuestos hacia la mitocondria aumentando considerablemente su actividad. Esto queda de manifiesto al comparar la actividad del compuesto Gent C₁₀, el cual presenta una escasa actividad antineoplásica, frente a Gent TPP⁺C₁₀.

Mediante el estudio de los nuevos derivados, se comprobó que los nuevos derivados mono- y di-hidroxibenzoicos generados presentan una mayor actividad que la molécula parental derivada del ácido gálico, puesto que se demostró que la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 2 del ácido benzoico logra aumentar la actividad citotóxica, debido a que se optimiza el efecto desacoplante producto de la modificación del valor de pKa del protón más ácido. En especial destaca el compuesto Gent TPP⁺C₁₀, el cual presenta la mayor actividad de los derivados analizados.

EL mecanismo por el cual estos compuestos ejercen su actividad citotóxica es a través del desencadenamiento de un efecto desacoplante de la cadena transportadora de electrones de la ATPsintasa. Lo cual provoca una disminución del potencial de transmembrana, generando un desbalance redox producto de una disminución de NAD(P)H, y un estrés metabólico por la disminución de ATP; siendo esta última parcialmente compensada por la actividad de AMPK y adenilato kinasa. Además el estrés metabólico generado en células tumorales metastásica, es capaz de disminuir la migración celular. Generando en último término, una muerte de tipo apoptótica.

CONCLUSIÓN

Dada la selectividad demostrada al comparar el efecto ejercido mediante la línea epitelial normal humana MCF 10F, se comprueba que el compuesto Gent TPP⁺C₁₀ presenta la mayor actividad citotóxica frente a células cancerosas, es por ello que es un candidato óptimo para ser ensayado en modelos *in vivo*.

8. ANEXOS

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

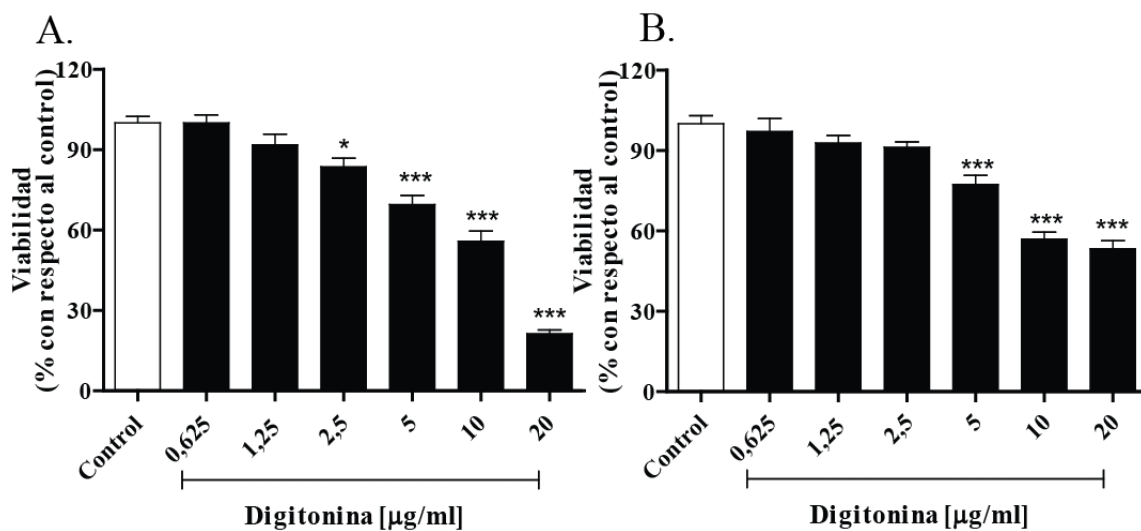


Figura suplementaria 1: Efecto de digitonina sobre la viabilidad en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de digitonina (0,625-20 µM) durante 1 hora. El efecto sobre la viabilidad celular se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 1 hora.

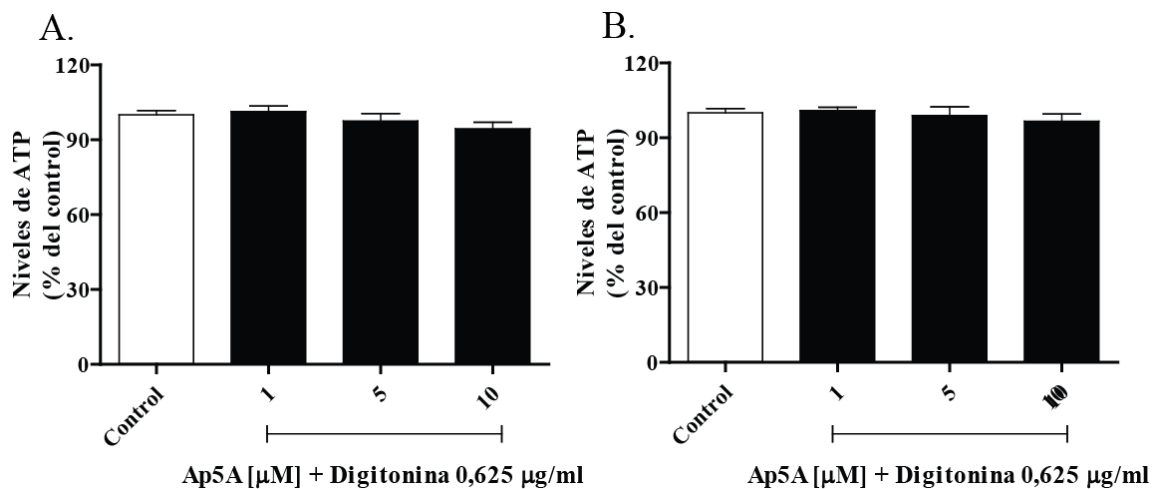


Figura suplementaria 2: Efecto de Ap5A sobre el contenido de ATP en células (A) MCF7 (B) MDA-MB-231. Los niveles de ATP se midieron mediante el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Luego de 3 horas de tratamiento con concentraciones crecientes Ap5A (1-10 µM) se adicionó digitonina 0,625 µg/mL hasta completar cuatro horas de tratamiento. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO y digitonina según lo descrito.

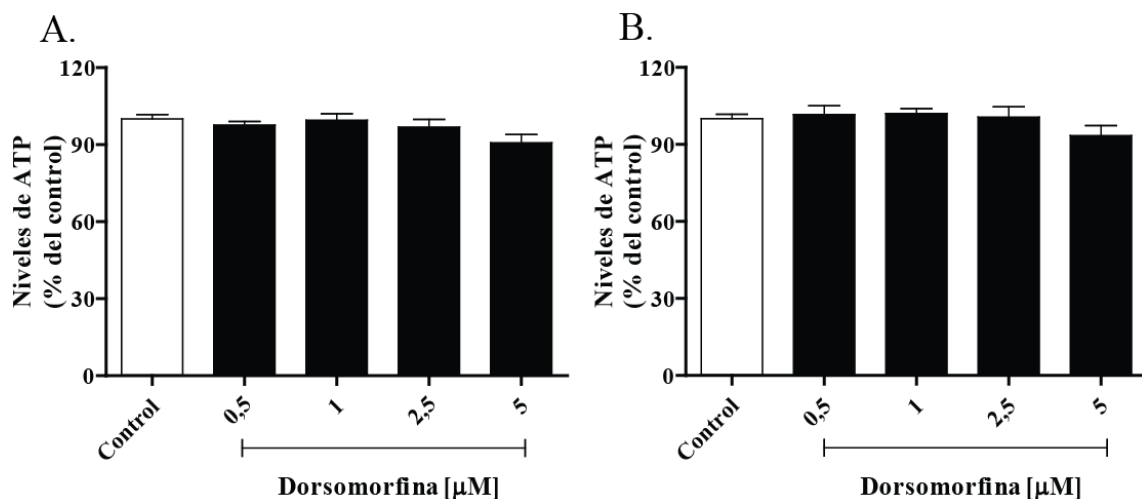


Figura suplementaria 3: Efecto de dorsomorfina sobre el contenido de ATP en células (A) MCF7 (B) MDA-MB-231. Los niveles de ATP intracelular se obtuvieron mediante el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay previa incubación de 4 horas con concentraciones crecientes de dorsomorfina (0,5-5 µM). Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 4 horas.

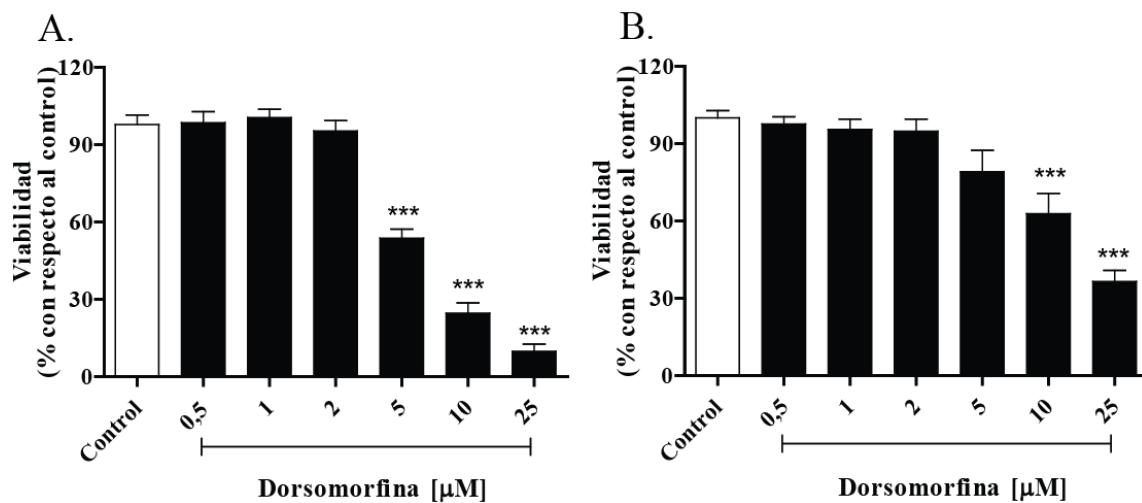


Figura suplementaria 4: Efecto de dorsomorfina sobre la viabilidad en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de dorsomorfina (0,5-25 μM) durante 48 horas. El efecto sobre la viabilidad celular se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 48 horas.

9. REFERENCIAS

1. Ferlay, J., et al. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. 2013 [citado 2013 1/1/2015]; <http://globocan.iarc.fr>.
2. Bray, F., et al., *Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. *Int J Cancer.*, 2013 **132**(5): p. 1133-45.
3. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(5): p. 325-37.
4. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
5. Gogvadze, V., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?* *Trends Cel Biol.*, 2008. **18**(4): p. 165-173. .
6. Moreno-Sanchez, R., et al., *Energy metabolism in tumor cells*. *FEBS J*, 2007. **274**(6): p. 1393-418.
7. Ferreira, L.M., A. Hebrant, and J.E. Dumont, *Metabolic reprogramming of the tumor*. *Oncogene*, 2012. **31**(36): p. 3999-4011.
8. Elstrom, R., D. Bauer, and M. Buzzai, *Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(11): p. 3892-9.
9. Hsu, P.P. and D.M. Sabatini, *Cancer cell metabolism: Warburg and beyond*. *Cell*, 2008. **134**(5): p. 703-7.
10. Gordan, J.D., C.B. Thompson, and M.C. Simon, *HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation*. *Cancer Cell.*, 2007. **12**(2): p. 108-13.
11. Bensaad, K., et al., *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. *Cell*, 2006. **126**(1): p. 107-20.
12. Wanka, C., et al., *Synthesis of cytochrome C oxidase 2: a p53-dependent metabolic regulator that promotes respiratory function and protects glioma and colon cancer cells from hypoxia-induced cell death*. *Oncogene*, 2012. **31**(33): p. 3764-76.
13. Hollstein, M.C., et al., *Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations*. *Cancer Res.*, 1991. **51**(15): p. 4102-6.
14. Staal, G., et al., *Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas*. *Cancer Res.*, 1987. **47**(19): p. 5047-51.
15. Rempel, A., P. Bannasch, and D. Mayer, *Differences in expression and intracellular distribution of hexokinase isoenzymes in rat liver cells of different transformation stages*. *Biochim Biophys Acta.*, 1994. **1219**(3): p. 660-8.
16. Bustamante, E. and P.L. Pedersen, *Mitochondrial hexokinase of rat hepatoma cells in culture: solubilization and kinetic properties*. *Biochemistry*, 1980. **19**(22): p. 4972-7.
17. Arora, K. and P. Pedersen, *Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(33): p. 17422-17428.
18. Bustamante, E. and P.L. Pedersen, *High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977. **74**(9): p.

- 3735–3739.
19. Wilson, J.E., *Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function*. Journal of Experimental Biology, 2003. **206**(12): p. 2049-2057.
 20. Sanchez-Cenizo, L., et al., *Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25308-13.
 21. Cabezon, E., et al., *Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25460-4.
 22. Gledhill, J.R., et al., *How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15671-6.
 23. Gomes, L.C., G. Di Benedetto, and L. Scorrano, *During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(5): p. 589-98.
 24. Faccenda, D., et al., *IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling*. Cell Death Differ, 2013. **20**(5): p. 686-97.
 25. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57–70.
 26. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 621-32.
 27. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev., 2007;. **87**(1): p. 99–163.
 28. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
 29. Fogg, V.C., N.J. Lanning, and J.P. Mackeigan, *Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death*. Chin J Cancer., Fogg VC, Lann2011ing NJ, Mackeigan JP. **30**(8): p. 526-39.
 30. Kitada, S., I. Pedersen, and A. Schimmer, *Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3459–3474.
 31. Kirkin, V., S. Joos, and M. Zornig, *The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1644**(2-3): p. 229-49.
 32. Coultas, L. and A. Strasser, *The role of the Bcl-2 protein family in cancer*. Seminars in Cancer Biology, 2003. **13**(2): p. 115-123.
 33. Levine, A.J., *P53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323–331.
 34. Cao, X.H., et al., *ROS-Ca(2+) is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis*. Chem Biol Interact, 2011. **190**(1): p. 16-27.
 35. Hoye, A.T., et al., *Targeting Mitochondria*. Acc Chem Res, 2008. **41**(1): p. 87-97.
 36. Ross, M.F., et al., *Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology*. Biochemistry (Mosc). 2005. **70**(2): p. 222-30.
 37. Modica-Napolitano, J. and J. Aprile, *Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **49**(1-2): p. 63-70.
 38. Teicher, B.A., S.A. Holden, and K.N. Cathcart, *Efficacy of Pt(Rh-123)₂ as a radiosensitizer with fractionated X rays*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1987. **13**(8): p. 1217-24.
 39. Grinius, L., et al., *Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles*. Biochim Biophys Acta, 1970. **216**(1): p. 1–12.
 40. Murphy, M.P., *Targeting lipophilic cations to mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 1028-31.

41. Cheng, G., et al., *Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death*. *Cancer Res*, 2012. **72**(10): p. 2634-44.
42. Cheng, G., et al., *Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 285.
43. Bergeron, K.L., et al., *Arylphosphonium salts interact with DNA to modulate cytotoxicity*. *Mutat Res*, 2009. **673**(2): p. 141-8.
44. Kinnamon, K., et al., *In search of anti-Trypanosoma cruzi drugs: new leads from a mouse model*. *J Med Chem*, 1977. **20**(6): p. 741-744.
45. Blank, B., et al., *Synthesis and hypoglycemic activity of phenacyltriphenylphosphoranes and phosphonium salts*. *J Med Chem*, 1975. **18**(9): p. 952-954.
46. Modica-Napolitano, J.S. and K.K. Singh, *Mitochondrial dysfunction in cancer*. *Mitochondrion*, 2004. **4**(5-6): p. 755-62.
47. Gourley, P.L., et al., *Mitochondrial correlation microscopy and nanolaser spectroscopy - new tools for biophotonic detection of cancer in single cells*. *Technol Cancer Res Treat*, 2005. **4**(6): p. 585-92.
48. Dubois, R., C. Lin, and J. Beisler, *Synthesis and antitumor properties of some isoindolylalkylphosphonium salts*. *J Med Chem*, 1978. **21**(3): p. 303-306.
49. Wang, J., et al., *⁶⁴Cu-Labeled triphenylphosphonium and triphenylarsonium cations as highly tumor-selective imaging agents*. *J Med Chem*, 2007. **50**(21): p. 5057-5069.
50. Kim, Y., et al., *Effects of targeting moiety, linker, bifunctional chelator, and molecular charge on biological properties of ⁶⁴Cu-labeled triphenylphosphonium cations*. *J Med Chem*, 2008. **51**(10): p. 2971-2984.
51. Boyle, P., *Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations*. *Ann Oncol*, 2012. **23 Suppl 6**: p. vi7-12.
52. Phipps, A. and C. Li, *Breast Cancer Epidemiology*. 2010, EE.UU.: Springer. 33.
53. Harvey, J.M., et al., *Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(5): p. 1474-81.
54. Cleator, S., W. Heller, and R.C. Coombes, *Triple-negative breast cancer: therapeutic options*. *The Lancet Oncology*, 2007. **8**(3): p. 235-244.
55. Pelicano, H., et al., *Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential*. *Breast Cancer Res.*, 2014. **16**(5): p. 434.
56. Chen, J.Q., et al., *Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(10): p. 1540-70.
57. Chaudhri, R.A., et al., *Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor-alpha36 (ERalpha36)*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(10): p. 7169-81.
58. Ding, Y., et al., *Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 1271.
59. Hevir, N., et al., *Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines*. *Chem Biol Interact*, 2011. **191**(1-3): p. 206-16.
60. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(6): p. 515-27.

61. Jara, J.A., et al., *Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice.* J Med Chem, 2014. **57**(6): p. 2440-54.
62. Grootveld, M. and B. Halliwell, *2,3-Dihydroxybenzoic acid is a product of human aspirin metabolism.* Biochem Pharmacol. , 1988. **37**(2): p. 271-80.
63. Gupta, V., et al., *Salicylic acid induces mitochondrial injury by inhibiting ferrochelatase heme biosynthesis activity.* Mol Pharmacol, 2013. **84**(6): p. 824-33.
64. Doi, H. and T. Horie, *Salicylic acid-induced hepatotoxicity triggered by oxidative stress.* Chem Biol Interact, 2010. **183**(3): p. 363-8.
65. Klampfer, L., et al., *Sodium Salicylate Activates Caspases and Induces Apoptosis of Myeloid Leukemia Cell Lines.* Blood, 1999. **93**(7): p. 2386-94.
66. Bau, J.T. and E.U. Kurz, *Sodium salicylate is a novel catalytic inhibitor of human DNA topoisomerase II alpha.* Biochem Pharmacol, 2011. **81**(3): p. 345-54.
67. Sharma, S., N. Khan, and S. Sultana, *Modulatory effect of gentisic acid on the augmentation of biochemical events of tumor promotion stage by benzoyl peroxide and ultraviolet radiation in Swiss albino mice.* Toxicol Lett, 2004. **153**(3): p. 293-302.
68. Sharma, S., N. Khan, and S. Sultana, *Study on prevention of two-stage skin carcinogenesis by Hibiscus rosa sinensis extract and the role of its chemical constituent, gentisic acid, in the inhibition of tumour promotion response and oxidative stress in mice.* Biochem Biophys Res Commun., 2000. **274**(1): p. 197-202.
69. Hinz, B., et al., *Salicylate metabolites inhibit cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E(2) synthesis in murine macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(1): p. 197-202.
70. Sappey, C., et al., *NF-kappa B transcription factor activation by hydrogen peroxide can be decreased by 2,3-dihydroxybenzoic acid and its ethyl ester derivative.* Arch Biochem Biophys., 1995. **321**(1): p. 263-70.
71. Moreadith, R.W. and G. Fiskum, *Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin.* Anal Biochem. , 1984 **137**(2): p. 360-7.
72. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem. , 1951. **193**(1): p. 265-75.
73. Testa, C.M., T.B. Sherer, and J.T. Greenamyre, *Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures.* Brain Res Mol Brain Res, 2005. **134**(1): p. 109-18.
74. Lou, P.H., et al., *Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range.* Biochem J, 2007. **407**(1): p. 129-40.
75. Mracek, T., et al., *ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1837**(1): p. 98-111.
76. Cuezva, J.M., M. Krajewska, and M. López de Heredia, *The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression.* Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6674-81.
77. Boland, M.L., A.H. Chourasia, and K.F. Macleod, *Mitochondrial dysfunction in cancer.* Front Oncol, 2013. **3**: p. 292.
78. Zanotti, A. and G.F. Azzone, *Safranine as membrane potential probe in rat liver mitochondria.* Arch Biochem Biophys., 1980. **201**(1): p. 255-65.
79. Lehninger, A., *Biochemistry, the Molecular Basis of Cell Structure and Function.* 1975, Worth Publishers, Inc.
80. Mitchell, P., *Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.* 1966. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(12): p. 1507-38.

81. Dzeja, P. and A. Terzic, *Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(4): p. 1729-72.
82. Hardie, D.G., *AMP-activated/SNFI protein kinases: conserved guardians of cellular energy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 774-85.
83. Gowans, G.J., et al., *AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation*. Cell Metab, 2013. **18**(4): p. 556-66.
84. Kurebayashi, N., T. Kodama, and Y. Ogawa, *PI,P5-Di(adenosine-5')pentaphosphate(Ap5A) as an inhibitor of adenylate kinase in studies of fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle*. J Biochem., 1988. **88**(3): p. 871-6.
85. Ma, T., et al., *Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid beta*. J Neurosci, 2014. **34**(36): p. 12230-8.
86. Dzink-Fox, J., E. Leadbetter, and W. Godchaux, *Acetate acts as a protonophore and differentially affects bead movement and cell migration of the gliding bacterium Cytophaga johnsonae (Flavobacterium johnsoniae)*. Microbiology, 1997. **143**(12): p. 3693-701.
87. Shchepinova, M.M., et al., *Dodecyl and octyl esters of fluorescein as protonophores and uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria at submicromolar concentrations*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1837**(1): p. 149-58.
88. Antonenko, Y.N., et al., *Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers*. J Biol Chem, 2011. **286**(20): p. 17831-40.
89. Lawrence, H., *Mitochondrial Dysfunction: Methods in Toxicology, Volume 2* Vol. 2. 1993: Academic Press 526.
90. Addanki, A., F. Cahill, and J. Sotos, *Determination of intramitochondrial pH and intramitochondrial-extramitochondrial pH gradient of isolated heart mitochondria by the use of 5,5-dimethyl-2,4-oxazolidinedione. I. Changes during respiration and adenosine triphosphate-dependent transport of Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, and Zn⁺⁺*. J Biol Chem., 1968. **243**(9): p. 2337-48.
91. Porcelli, A.M., et al., *pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(4): p. 799-804.
92. Tainter, M.L. and D.A. Wood, *A case of fatal dinitrophenol poisoning*. JAMA, J. Am. Med. Assoc., 1934. **102**(14): p. 1147-1149.
93. Moreno-Sanchez, R., et al., *Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **50**: p. 10-23.
94. Sanchez-Arago, M., et al., *Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers*. Oncogenesis, 2013. **2**: p. e46.
95. Teodoro, J.S., A.P. Rolo, and C.M. Palmeira, *The NAD ratio redox paradox: why does too much reductive power cause oxidative stress?* Toxicol Mech Methods, 2013. **23**(5): p. 297-302.
96. Poon, I.K., M.D. Hulett, and C.R. Parish, *Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance*. Cell Death Differ, 2010. **17**(3): p. 381-97.
97. Singhal, H., et al., *Endocrine characteristics of human breast epithelial cells, MCF-10F*. Horm Res., 1999. **52**(4): p. 171-7.

98. Zhao, J., et al., *Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells*. *Oncogene*, 2013. **32**(40): p. 4814-24.