

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**



“Síntesis y caracterización del efecto anti-proliferativo *in vitro* frente a cáncer de mama triple negativo de sales de fosfonio derivadas de 5,8-dihidroxi-4,4-dimetilnaftalen-1(4H)-ona.”

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Química área de especialización Tópicos de Química Medicinal y Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico.**

**por:**

**Felipe Andrés Muñoz Córdova**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Ramiro Araya Maturana**

**Dr. Julio César Cárdenas Matus**

Santiago-Chile

Abril de 2017

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

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**Felipe Andrés Muñoz Córdova**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización Tópicos de Química medicinal, y Título de Químico Farmacéutico , en el examen público rendido el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2017.

**Directores de tesis:**

Dr. Ramiro Juan Araya Maturana \_\_\_\_\_

Dr. Julio César Cárdenas Matus \_\_\_\_\_

**Comisión evaluadora de Tesis:**

Dra. Carla Delporte Vergara \_\_\_\_\_

Dr. David Pessoa Mahana \_\_\_\_\_

Dr. Hernan Pessoa Mahana \_\_\_\_\_

A Don Telo y Catita, mis padres

A mi hermana pequeña

A mi polola Gabriela.

Al Dream team de huasos Colchaguinos

## **Financiamiento.**

La parte Química de la tesis fue realizada en el laboratorio de síntesis Orgánica de MIBI, en dependencias de la Facultad de ciencias químicas de la Universidad de Chile; y fue financiada por los proyectos FONDECYT 1140753 (RAM) y anillo ATC 1107 (RAM).

La parte biológica de la tesis fue realizada en el Laboratorio de Metabolismo Celular y Bioenergética perteneciente al Instituto de Ciencias Biomédicas de la facultad de medicina de la Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1160332 (JCC) y FONDAP 15150012 (JCC).

## Tabla de contenido.

Financiamiento.....	iii
Tabla de Figuras .....	vi
Abreviaciones.....	vii
Resumen.....	viii
Summary.....	ix
Resumen gráfico.....	x
1. Introducción .....	1
1.1 Epidemiología del cáncer en Chile.....	1
1.2 La mitocondria como blanco farmacológico en el cáncer.....	1
1.3 Compuestos que incorporan sales de trifenilfosfónio: una opción selectiva para desarrollo de fármacos antitumorales.....	2
1.4 El Cáncer de mama triple-negativo.....	5
1.5 La Idea.....	6
2. Hipótesis .....	7
3. Objetivo General .....	7
4. Objetivos específicos .....	7
5. Métodos .....	8
5.1 Análisis de espectros y caracterización de los productos de síntesis.....	8
5.2 Métodos parte biológica.....	8
5.2.1 Cultivos celulares.....	8
5.2.2 Ensayo de MTT.....	8
5.2.3 Determinación de la muerte celular.....	9
5.2.4 Mediciones del metabolismo celular en tiempo real.....	9
5.2.5 Determinación de los niveles intracelulares de ATP.....	10
5.2.6 Medición de $\Delta\Psi_m$ .....	11
5.2.7 Medición de proporción TMRM/NAO .....	11
5.2.8 Análisis de la progresión del ciclo celular.....	11
5.3 Expresión de resultados y análisis estadístico.....	12
6 Resultados.....	13
6.1 Resultados Parte I: Síntesis y caracterización química de los nuevos productos .....	13
6.1.1 Optimización de la síntesis de bromoacilhidroquinonas utilizando microondas .....	14

6.1.2	Obtención de las hidroquinonas bicíclicas, a partir de las bromoacilhidroquinonas.....	15
6.1.3	Obtención de sales de fosfonio de las hidroquinonas bicíclicas usando microondas. ....	17
6.1.4	Procedimientos experimentales químicos.....	18
6.2	Resultados parte II: Evaluación biológica de los productos sintetizados.	30
6.2.1	Tamizado de los compuestos sintetizados según su efecto sobre la proliferación celular.....	30
6.2.2	Caracterización del efecto anti proliferativo del compuesto D <sub>4</sub> . ....	32
6.2.3	Caracterización del efecto de D <sub>4</sub> sobre la bioenergética celular. ....	39
7	Discusión.....	47
8	Conclusiones. ....	52
10	Bibliografía.....	54

## Tabla de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Resumen gráfico del efecto biológico del compuesto D <sub>4</sub> .....	x
<b>Figura 2.</b>	Parámetros medidos de la respiración mitocondrial.....	10
<b>Figura 3.</b>	Valores de IS para cada molécula estudiada. ....	31
<b>Figura 4.</b>	El efecto del compuesto D <sub>4</sub> sobre la proliferación de células tumorales MDA-MB-231 y MDA-MB-468 es una propiedad emergente de la molécula. ....	32
<b>Figura 5.</b>	El compuesto D <sub>4</sub> afecta selectivamente la distribución del ciclo celular de células tumorales MDA-MB-321 y MDA-MB-468, aumentando el peak sub-G1 y produciendo detención del ciclo celular en la fase G1 .....	33
<b>Figura 6.</b>	El compuesto D <sub>4</sub> induce apoptosis en células de cáncer de mama MDA-MB-468, y MDA-MB-231; sin efectos significativos sobre células normales de mama MCF10A.....	35
<b>Figura 7.</b>	A) Datos representativos del experimento de doble marcaje AnexinV-fitC® versus PI abcam para 48hrs de estímulo con compuesto D <sub>4</sub> en células normales y tumorales.....	36
<b>Figura 8.</b>	Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MDA-MB-468 tienen una razón TMRM/NAO más alta que las células normales MCF10A .....	38
<b>Figura 9.</b>	El compuesto D <sub>4</sub> afecta la respiración asociada a la síntesis de ATP de células normales MCF10A, sin afectar los niveles de ATP intracelular ni el potencial de membrana mitocondrial .....	40
<b>Figura 10.</b>	El compuesto D <sub>4</sub> aumenta el consumo de oxígeno no asociado a la síntesis de ATP y disminuye fuertemente el consumo de oxígeno asociado a la síntesis de ATP, afectando también los niveles intracelulares de ATP y el potencial de membrana mitocondrial en células MDA-MB-231.....	41
<b>Figura 11.</b>	El compuesto D <sub>4</sub> aumenta el consumo de oxígeno no asociado a la síntesis de ATP y disminuye fuertemente el consumo de oxígeno asociado a la síntesis de ATP, afectando también los niveles intracelulares de ATP y el potencial de membrana mitocondrial en células MDA-MB-468.....	42
<b>Figura 12.</b>	El compuesto D <sub>4</sub> aumenta la tasa de acidificación (ECAR) del medio extracelular en células MCF10A, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, a tiempo de 6 horas ..	44
<b>Figura 13.</b>	La reprogramación metabólica hacia la OXPHOS acentúa el efecto del compuesto D <sub>4</sub> sobre la respiración celular y acentúa también el efecto sobre la proliferación de células MDA-MB-231 .....	46

## **Abreviaciones.**

**AA:** antimicina A

**AMP:** mono fosfato de adenosina

**AMPK:** proteína quinasa dependiente de **AMP**

**aKG:**  $\alpha$ -cetoglutarato

**ATP:** trifosfato de adenosina

**ECAR:** velocidad de acidificación del medio extracelular

**FCCP:** carbonil cianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona

**Gln:** glutamina

**Glu:** glucosa

**IS:** índice de selectividad

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

**OCR:** velocidad de consumo de oxígeno

**Oligo:** oligomicina

**OXPHOS:** fosforilación oxidativa

**PI:** yoduro de propidio

**Rot:** rotenona

$\Delta\Psi_m$ : potencial de membrana mitocondrial

$\Delta\Psi_p$ : potencial de membrana plasmática



## Resumen.

La mitocondria ha emergido como un prometedor blanco para eliminar selectivamente células tumorales en función de sus alteraciones bioquímicas y funcionales respecto a sus contrapartes no-tumorales, abriendo la posibilidad de obtener nuevas moléculas que desestabilicen la mitocondria tumoral para producir muerte celular selectiva en dichas células. En esta tesis, se sintetizaron 6 sales de fosfónio derivadas de la 5,8-dihidroxi-4,4-dimetilnaftalen-1(4H)-ona unidos al catión lipofílico trifenilfosfonio con diversos largos de cadena alquílica separando ambos grupos. Uno de ellos, el compuesto **D<sub>4</sub>**, exhibió un efecto anti-tumoral selectivo, produciendo detención de la progresión del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, e induciendo muerte celular en células de cáncer de mama humano.

Es reconocido que la unión de un catión trifenilfosfonio a compuestos puede otorgar una acumulación orgánulo-específica en la mitocondria dependiendo del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), produciendo una alteración selectiva de parámetros funcionales mitocondriales. Consistente con esto, el compuesto **D<sub>4</sub>** produjo un aumento de la respiración en presencia de oligomicina, disminución de la respiración asociada a la síntesis de ATP, caída del  $\Delta\Psi_m$  y una disminución de los niveles intracelulares de ATP en células tumorales MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Estos resultados sugieren que una crisis bioenergética podría ser la causante del efecto antiproliferativo producido por **D<sub>4</sub>**.

En conjunto nuestros resultados sugieren que el compuesto **D<sub>4</sub>**, es un prometedor compuesto líder con acción mitocondrial que puede ser utilizado para el diseño de nuevos derivados con un mejorado perfil de selectividad hacia células malignas.

## Summary

Mitochondria has emerged as a promising target to selectively kill cancer cells base on the many existing biochemical differences between cancer and normal cell mitochondria. The possibility of developing new molecules that could selectively produce mitochondrial destabilization in cancer cells has become very attractive. Here, we chemically synthesized a series of six phosphonium salts derivates of the 5,8-dihydroxy-4,4-dimethylnaphthalen-1(4H)-one using short and long alkyl chains to link the hydroquinone moiety with the lipophilic cation. From the synthesized compounds only compound **D<sub>4</sub>** showed selective antitumor activity against triple negative breast cancer cells, by producing cell cycle arrest in G1 phase and by causing apoptotic cell death, without significant effects on normal MCF10A cells.

It's well documented that triphenylphosphonium salts could be used as an organelle specific directing groups, because this kind of molecules selectively accumulate within mitochondria driven by the mitochondrial membrane potential. Thus, accumulation of this molecules could selectively affect mitochondrial functional parameters. As predicted, compound **D<sub>4</sub>** consistently produces an increase on the "proton leak driven respiration", and a strong decrease in the "ATP-linked respiration". This phenomenon was associated with a drop in the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and a decrease in the intracellular ATP levels in two triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MDA-MB-468) without affecting MCF10A normal cells at the studied concentrations.

Taken together our results suggest that compound **D<sub>4</sub>** is a promising lead compound with mitochondrial action that could be used for the design of new derivates with the aim of improving the selectivity against cancer cells.

## Resumen gráfico.

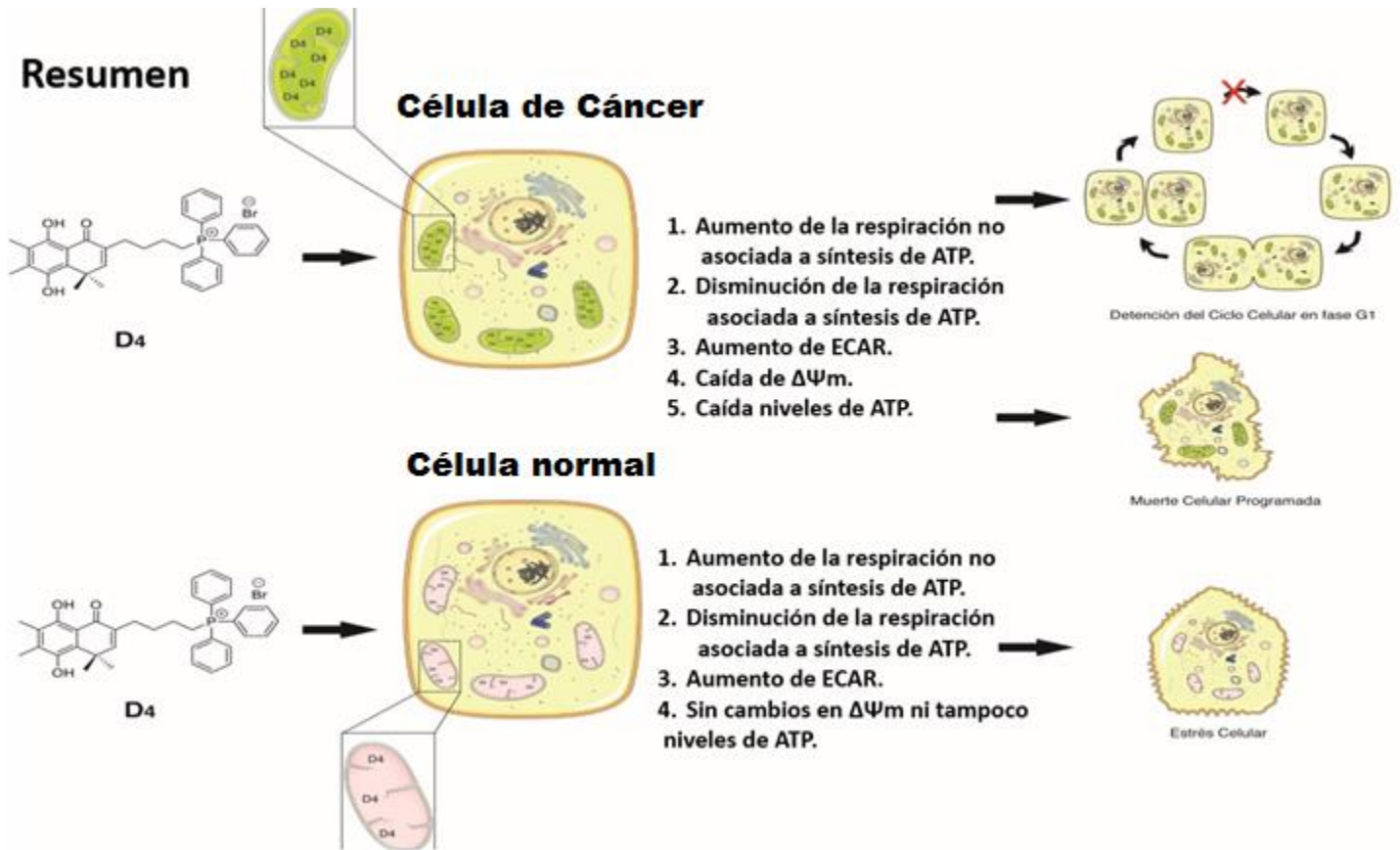


Figura 1. Resumen gráfico del efecto biológico del compuesto D<sub>4</sub>.

# **1. Introducción**

## **1.1 Epidemiología del cáncer en Chile.**

El cáncer es una de las patologías con mayor relevancia epidemiológica en el mundo, concitando en torno a sí, no solo el deterioro y probablemente la muerte de quien lo padece sino que también el deterioro psicológico de toda la esfera social de la persona afectada por el cáncer, siendo por eso una patología que traspasa los márgenes de la medicina.

En Chile, el cáncer es la segunda causa de muerte más frecuente solo detrás de las enfermedades cardiovasculares, al desglosar por género, el tipo de cáncer que más afecta a las mujeres chilenas es el cáncer de mama, seguido por el cáncer de vesícula biliar. En el caso de los hombres, el cáncer gástrico, seguido del cáncer de próstata<sup>1</sup> son los de mayor incidencia en Chile. Es ahí donde nace la necesidad de generar investigación científica respecto a patologías que están impactando la vida de tantas y tantos chilenos. La búsqueda de nuevos fármacos es una forma de generar conocimiento y cooperar en la construcción de nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer.

## **1.2 La mitocondria como blanco farmacológico en el cáncer.**

La mitocondria es la fuente de energía y fábrica biosintética a nivel celular, en este orgánulo confluyen diversos efectores moleculares capaces de condicionar el destino de la célula; por otra parte la mitocondria en condiciones tumorales es capaz de modificar funciones celulares por medio de la señalización retrograda hacia el citosol, también se ha visto que la mitocondria tumoral altera su función biosintética para propiciar la proliferación celular descontrolada<sup>2</sup>. Cada vez se documenta más la participación mitocondrial en diversas patologías siendo el cáncer una de ellas. Recientemente se ha descrito que procesos como la metástasis, están comandados por fenómenos

mitocondriales relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de la cadena transportadora de electrones promueven la invasión y colonización de otros órganos estableciendo tumores secundarios<sup>3</sup>, también por otra parte, la mitocondria tumoral participa en la evasión de la apoptosis en algunas líneas celulares tumorales<sup>4</sup>. Además, modificaciones en la morfología mitocondrial, como la excesiva fisión mitocondrial, han sido descritas como un fenotipo pro-tumorigénico<sup>5</sup>. Esta gran participación de la mitocondria durante la tumorigénesis la ha convertido en un promisorio blanco farmacológico para el desarrollo de moléculas que produzcan algún tipo de desestabilización mitocondrial como estrategia anti-tumoral. Uno de los grupos de moléculas más promisorios para estos fines son compuestos que incorporan cationes lipofílicas deslocalizadas, debido a su acumulación mitocondrial selectiva<sup>6</sup>.

### **1.3 Compuestos que incorporan cationes trifenilfosfónio: una opción para desarrollo de fármacos antitumorales selectivos.**

La incorporación del catión trifenilfosfónio ha sido ampliamente utilizada como estrategia para dirigir moléculas de interés a la mitocondria<sup>7</sup>. Esto es posible gracias a que la mitocondria, como compartimiento subcelular, está caracterizada por poseer una diferencia de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de entre -150 a -180 mV, siendo el orgánulo más negativamente cargado en la célula, debido a esto, está favorecida la entrada de una carga positiva a la mitocondria; pero no cualquier carga positiva es capaz de incorporarse en la mitocondria ya que las membranas de este orgánulo son relativamente impermeables a moléculas cargadas. En este sentido una carga localizada sobre un átomo puntual no es capaz de incorporarse en la mitocondria. Los cationes lipofílicos como el ion trifenilfosfónio, por el contrario, al poseer carga eléctrica deslocalizada en los tres anillos aromáticos, que están covalentemente unidos al fósforo, son capaces de atravesar membranas y de incorporarse en la mitocondria mediado por el  $\Delta\Psi_m$ <sup>6</sup>.

Hay dos etapas en el proceso de acumulación celular de los cationes lipofílicos deslocalizados; la primera es la acumulación intracelular mediada por el potencial de membrana plasmática ( $\Delta\Psi_p$ ), que conlleva a concentraciones intracelulares 10 veces mayores que las extracelulares, y posteriormente la acumulación mitocondrial mediada por  $\Delta\Psi_m$  generándose concentraciones de entre 100 y 500 veces mayores. Se estima que cada 60mV de diferencia de potencial la acumulación de estos compuestos se aumenta por factor de  $10^8$ .

Los alquiltrifenilfosfonio se incorporan rápidamente a las mitocondrias *in vivo*, diversos experimentos con ratones donde se les inyecta por vía intravenosa cadenas alquílicas de mayor o menor largo muestran que se encuentran incorporados en los tejidos y particularmente en las mitocondrias en tiempos tan cortos como 5 min, también hay un determinado patrón de acumulación selectiva en algunos tejidos como el hígado o los riñones del animal<sup>9</sup>.

Después de caracterizar la incorporación mitocondrial de estas moléculas, se estudiaron los efectos del largo de cadena alquílica con que se une el catión trifenilfosfonio con al núcleo activo que se está estudiando. En el caso de mitoQ, se encontró que las cadenas no afectan la actividad antioxidante pero sí afectan su acumulación ya que las cadenas más largas presentan mayores interacciones con las membranas celulares<sup>10</sup>.

Recientemente se ha descrito el impacto funcional del catión trifenilfosfonio en la mitocondria. La mayoría de los antioxidantes mitocondriales conocidos pueden inhibir la respiración celular a concentraciones de 1  $\mu$ M en células MES-13 (riñón de ratón), de la misma forma los cationes alquiltrifenilfosfonio de cadenas largas, como deciltrifenilfosfonio, producen el mismo efecto. Sin embargo, eso no ocurre con derivados de cadenas cortas como el butiltrifenilfosfonio<sup>11</sup>. Del mismo modo, se ha descrito en células C2C12 (mioblastos de ratón) que las cadenas largas unidas al catión lipofílico tienen propiedades inhibitorias sobre la respiración celular y también aumentan la respiración mitocondrial no asociada a la síntesis de ATP<sup>12</sup>. Por otra parte también se han reportado otros efectos de estas moléculas como alterar la

homeostasis del calcio mitocondrial<sup>13</sup>; así como también se han observado efectos sobre el ciclo de Krebs por parte de metiltrifenilfosfonio <sup>14</sup>.

El desarrollo de fármacos con este tipo de compuestos ha avanzado muy rápido desde la introducción de las primeras moléculas por MP. Murphy y V. Skulachev, quienes han liderado el diseño y evaluación biológica de los llamados “antioxidantes mitocondriales”. De forma interesante, la molécula SKQ1 está aprobada por la agencia rusa de regulación de drogas (ROSZDRAVDNADZOR) para su uso humano en la patología ocular conocida como degeneración macular, bajo el nombre comercial de Visomitin <sup>15</sup>.

Las terapias citoprotectoras caracterizadas por llevar a la mitocondria moléculas antioxidantes fueron las precursoras del desarrollo de este tipo de drogas. Posteriormente al emerger la mitocondria como un promisorio blanco farmacológico contra el cáncer surge la idea de llevar moléculas que pudieran tener un efecto citotóxico selectivo mediado por su acumulación en la mitocondria tumoral<sup>16</sup>. En esta línea, diversas moléculas anti-tumorales han sido descritas con promisorios resultados en experimentos *in vivo* como por ejemplo: Mito-chlor, derivado de clorambucil<sup>17</sup>, mitochromanol<sup>18</sup>, mito-cp<sup>19</sup>, mito-ves<sup>20</sup>. Mecanísticamente este tipo de compuestos provocan daño mitocondrial, ya sea por iniciar estrés redox, o por dañar el DNA mitocondrial, afectando especialmente líneas tumorales multirresistentes a drogas. Como por ejemplo un derivado mitocondrial de doxorubicina que revierte la resistencia de la línea celular MDA-MB-435 a la droga original<sup>21</sup>.

También se han generado derivados mitocondriotrópicos de flavonoides como la quercetina o el resveratrol, los cuales han mostrado una cierta toxicidad selectiva hacia células de rápida proliferación, lo cual se ha justificado mecanísticamente por la generación de ROS en el caso del derivado de resveratrol <sup>22-25</sup>.

El enfoque de la selectividad de las moléculas con destinación mitocondrial, en el contexto del cáncer, está dado por la acumulación selectiva en la mitocondria tumoral, teniendo esta premisa como fundamento, se han publicado numerosos

artículos que han descrito que las células de cáncer tienen un  $\Delta\Psi_m$  más negativo que sus contrapartes no tumorales<sup>4,16,26,27</sup>, también se ha descrito que el potencial de membrana plasmática es mayor en células tumorales<sup>28</sup>. De acuerdo a estos antecedentes las células de cáncer estarían más propensas a acumular moléculas de cationes lipofílicas y, por tanto, a quedar más expuestas a los efectos tóxicos que su incorporación genera.

#### **1.4 El Cáncer de mama triple-negativo.**

El cáncer de mama puede ser dividido en tres subgrupos con distintas pronosis clínicas; el primero está caracterizado por la expresión de receptores tales como, receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), denominándosele cáncer de mama respondiente a hormonas. El segundo grupo está caracterizado por poseer una amplificación del receptor HER-2/Neu, denominándose cáncer de mama respondiente a herceptina. El tercer grupo corresponden a aquellos que tiene ausencia de expresión de ninguno de los receptores antes mencionados, denominándose: "cáncer de mama triple negativos"<sup>29</sup>.

El cáncer de mama triple negativo es responsable del 15% de los cánceres, sin embargo este porcentaje más bien bajo no deja ver la verdadera trascendencia de este tipo de patología ya que este 15% corresponde a los casos con peores pronosis clínicas, de hecho el promedio de supervivencia de una mujer diagnosticada con cáncer de mama metastásico triple negativo es de 13 meses, y de ser mayor a este plazo este tipo de cáncer está asociado con las recurrencias más agresivas, este cuadro configura que hasta el día de hoy prácticamente todas las mujeres diagnosticadas con cáncer triple negativo metastásico mueran de esta enfermedad<sup>30</sup>.

Pese a que varias moléculas están bajo estudio<sup>30</sup>, aún es necesario estudiar nuevas moléculas que sean capaces de inhibir la proliferación y eliminar este tipo de cáncer.



## 1.5 La Idea.

Considerando la situación chilena respecto al cáncer de mama y la evidencia en literatura del uso de los cationes lipofílicos como agentes antitumorales, se decide sintetizar una serie de derivados del núcleo hidroquinona descrito previamente por nuestro grupo<sup>31</sup>, unidos al catión lipofílico trifenilfosfónio, utilizando cadenas alquílicas cortas (4 carbonos) y largas (8 y 9 carbonos), con el objeto de establecer una relación estructura-actividad antiproliferativa de esta nueva serie de moléculas con potencial acción mitocondrial sobre dos las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo metastásico MDA-MB-231 y MDA-MB-468.

Para este fin nuestro laboratorio dispone de una ruta sintética ya explorada para la obtención de estas moléculas<sup>32</sup>, el inconveniente de dicha ruta es que brinda bajos rendimientos y posee dos etapas sintéticas con duración prolongada, la primera de ellas es la reacción de reordenamiento de Fries la cual nos permite obtener los acil-derivados de hidroquinonas, teniendo un tiempo de reacción de 48 horas. La segunda etapa limitante de la ruta es la sustitución nucleofílica de reemplazo del átomo de bromo por la trifenilfosfina en la formación de sales de fosfónio; esta etapa tiene una duración de 7 días. La excesiva duración de ambas etapas, genera gastos por conceptos de calefacción, consumo de agua para refrigeración y utilización excesiva de equipamiento, además genera peligro por estar mucho tiempo en un ambiente sin supervisión de personal capacitado ya que una reacción cuyo tiempo está en el orden de días, obligatoriamente debe quedar sin supervisión por las noches o días no hábiles, lo que aumenta la probabilidad de accidentes. Por lo expuesto nos proponemos prioritariamente optimizar la ruta sintética, priorizando la obtención de mejores tiempos de reacción para ambas etapas.

## **2. Hipótesis**

Los derivados de la 5,8-dihidroxi-4,4-dimetilnaftalen-1(4H)-ona unidos al catión trifenilfosfonio producen alteraciones de las funciones mitocondriales y poseen efecto anti-proliferativo selectivo en células de cáncer de mama humano triple negativo metastásico.

## **3. Objetivo General**

1. Sintetizar una serie de sales de trifenilfosfonio, derivadas de 5,8-dihidroxi-4,4-dimetilnaftalen-1(4H)-ona, usando síntesis orgánica asistida por radiación de microondas, con objeto de optimizar los tiempos de síntesis.
2. Estudiar el efecto de su incorporación sobre la mitocondria y evaluar el efecto anti-proliferativo en un modelo de cáncer de mama triple negativo metastásico.

## **4. Objetivos específicos**

1. Sintetizar y caracterizar una serie de 6 sales de trifenilfosfonio derivadas de 5,8-dihidroxi-4,4-dimetilnaftalen-1(4H)-ona, caracterizándolas usando  $^{13}\text{C}$ -NMR y  $^1\text{H}$ -NMR.
2. Optimizar la reacción de reordenamiento de Fries en cuanto al tiempo de reacción usando síntesis orgánica asistida por microondas.
3. Optimizar la reacción  $\text{SN}_2$  para la formación de las sales de fosfonio utilizando síntesis orgánica asistida por microondas.
4. Evaluar el efecto sobre la proliferación de células normales de mama MCF10A y células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, MDA-MB-468.
5. Seleccionar el compuesto con efecto antiproliferativo selectivo hacia células tumorales y evaluar su efecto sobre parámetros bioenergéticos mitocondriales.

## 5 Métodos

La parte química de esta tesis fue realizada en dependencias de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. La parte biológica de esta tesis se realizó en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### 5.1 Análisis de espectros y caracterización de los productos de síntesis.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN fueron obtenidos a 300,13 y 75,45 MHz respectivamente, en un espectroscopio Bruker AVANCE DRX 300. Los puntos de fusión fueron determinados mediante un aparato digital de medición de punto de fusión *Electrothermal A9200*.

### 5.2 Métodos de la parte biológica.

#### 5.2.1 Cultivos celulares.

Todas las líneas celulares se obtuvieron de la “*American Tissue Culture Collection*” (ATCC). Las líneas celulares de cáncer de mama se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (MDA-MB-231, MDA-MB-468) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 IU/mL de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomycin. La línea celular epitelial de mama MCF10A se cultivó en medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal de caballo al 5%, 3,5 mg/mL de insulina, 100 IU/mL de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomycin. Todas las líneas celulares utilizadas se cultivaron en su respectivo medio de cultivo en una atmósfera húmeda (37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ ).

#### 5.2.2 Ensayo de MTT.

Ensayo colorimétrico dependiente de la actividad metabólica de las células que se utiliza como un indicador del número de células viables, donde el MTT se reduce a formazán, un compuesto de color púrpura. Se sembraron  $1 \times 10^4$  células/100  $\mu\text{L}$  en placas de 96-pocillos y se incubaron por

24horas. Posteriormente, se estimuló con concentraciones crecientes de cada compuesto para evaluar el efecto sobre la proliferación a 48 horas para cada línea celular. Después de completado el tiempo, las células se lavaron con PBS y posteriormente se agregó a cada pocillo una solución de MTT (0,5 mg/mL), incubándose a 37°C por 2 horas. Los cristales de formazán se disolvieron por adición de DMSO. La absorbancia se midió a 570 nm en un espectrofotómetro de placas.

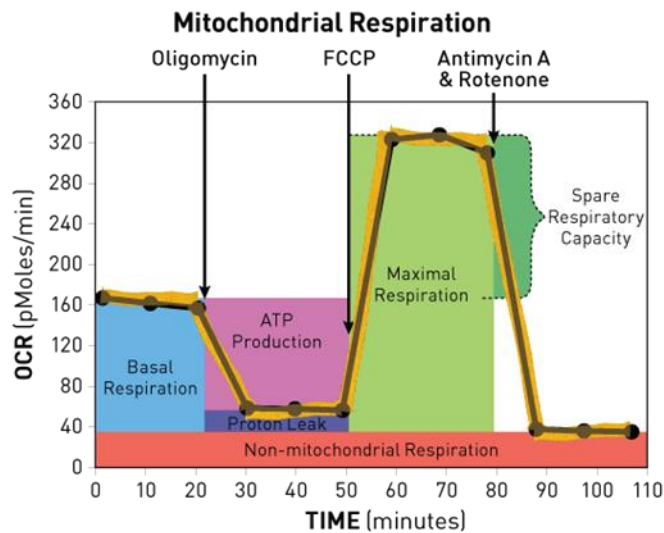
### **5.2.3 Determinación de la muerte celular.**

La muerte celular se determinó mediante el kit AnnexinV-FitC PI abcam de acuerdo a las instrucciones del fabricante; utilizando Citometría de flujo para su cuantificación. Las células fueron cultivadas en medio completo, sembradas en placas de 12-pocillos a razón de  $5 \times 10^4$  células por pocillo para cada línea celular; posteriormente son estimuladas con el compuesto **D<sub>4</sub>** por 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo el medio de cultivo de cada pocillo es traspasado a un tubo descartable de centrifuga de 2ml, para preservar las células muertas no adheridas para el experimento, las células adheridas son recuperadas mediante el uso de tripsina y agregadas al tubo descartable de centrifuga que contiene el respectivo medio de cultivo proveniente de cada pocillo, se centrifugan a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y las muestras fueron procesadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los *dot plots* de citometría son generados usando el programa *Wease!*<sup>TM</sup>.

### **5.2.4 Mediciones del metabolismo celular en tiempo real.**

Se sembraron  $2 \times 10^4$  células en placas de 96-pocillos (*Seahorse*, *Bioscience*) dependiendo de la línea celular 12 h antes del ensayo en medio completo o células mantenidas por más de 72 h en deprivación de glucosa según corresponda. Luego, se lavó 3 veces cada pocillo con medio condicionado sin suero fetal bovino y bicarbonato de sodio (pH 7,4) y se dejó

por 1 h en incubadora sin CO<sub>2</sub> a 37°C. Durante ese tiempo, se prepararon oligomicina, FCCP y antimicina más rotenona las cuales se inyectaron en los puertos A, B, y C, respectivamente en las concentraciones previamente ajustadas para cada línea celular. El metabolismo mitocondrial fue evaluado midiendo el consumo de oxígeno, expresado como OCR (*Oxygen Consumption Rate*) y también se determinó la acidificación extracelular haciendo uso del parámetro ECAR (*extracellular acidification rate*). En la figura 2 se observa una gráfica representativa del resultado obtenido por el equipo *SeaHorse*.



**Figura 2. Parámetros medidos de la respiración mitocondrial.** Figura extraída del manual de uso de XF Cell Mito Stress Test Kit (Seahorse Agilent)

### 5.2.5 Determinación de los niveles intracelulares de ATP.

Los niveles intracelulares de ATP se determinaron usando el kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) según las instrucciones del fabricante: Se sembraron  $1 \times 10^4$  células/100  $\mu$ L en placas de 96 pocillos. Después se retiró el medio por inversión, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 20  $\mu$ L de PBS + 20  $\mu$ L de buffer de reacción. La bioluminiscencia se determinó según el protocolo descrito en la literatura<sup>33</sup>.

### **5.2.6 Medición de $\Delta\Psi_m$ .**

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) fue medido mediante el uso de la sonda fluorescente TMRM (tetrametilrodamina) a una concentración de 5nM. Las células crecidas en medio completo fueron sembradas en placas de 12-pocillos. Al día siguiente fueron estimuladas con el compuesto seleccionado por 3 y 6 horas según corresponda. Finalizado el tiempo de estímulo, se retiró el sobrenadante y fueron cargados cada pocillo con 200  $\mu$ L de una solución de 5 nM de TMRM a 37°C por 30 min. Posteriormente las células fueron tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas en 200 $\mu$ L de PBS en tubos FACS e inmediatamente se leyó la fluorescencia mediante citometría.

### **5.2.7 Medición de proporción TMRM/NAO**

La medición de la razón TMRM/NAO fue realizada mediante el marcaje simultáneo con dos sondas fluorescentes con destinación mitocondrial; la primera TMRM, descrita anteriormente, y la segunda 10-nonyl acridine orange (NAO) que da cuenta de la masa mitocondrial. Las células fueron sembradas en placas de 12-pocillos por 24 horas, posteriormente el medio de cultivo fue reemplazado por 200 $\mu$ L de una solución que contiene TMRM 5nM y NAO 100nM, incubándose por 25 minutos. Una vez finalizado este tiempo, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas en 200  $\mu$ L de PBS para ser depositado en tubos FACS y leído por citometría.

### **5.2.8 Análisis de la progresión del ciclo celular.**

Las células cultivadas en medio completo fueron sembradas en placas de 12-pocillos por 24 horas. Luego, fueron estimuladas por el compuesto seleccionado por las siguientes 48 horas. Una vez finalizado este tiempo, el medio de cultivo y células adheridas fueron colectados mediante previo lavado con PB y centrifugación en un tubo descartable de centrifuga de 2 mL, a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C. Al *pellet* resultante se le agregó 600  $\mu$ L de metanol a 4°C gota a gota, bajo agitación constante. Las muestras fueron

almacenadas a 4°C por 48 horas para garantizar la permeabilización. El día de la lectura las muestras son centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, resuspendiendo las células en la solución de ensayo que contenía: 50 µg/mL de PI, 200 µg/mL de RNAasa y 0,1% de tritón X-100; incubándose por 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Luego, fueron traspasadas a tubos FACS y leídas por citometría. Los resultados fueron generados usando el programa Weasel y representados como el porcentaje de la población en cada fase del ciclo celular.

### **5.3 Expresión de resultados y análisis estadístico.**

Los datos experimentales se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de tres o más experimentos independientes, según sea indicado como (n). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA). El análisis de *t* de Student se utilizó para establecer diferencias significativas de las respuestas entre dos grupos, utilizando un  $p < 0,05$ . El análisis de ANOVA de una vía se utilizó para establecer las diferencias significativas entre más de dos grupos utilizando un  $p < 0,05$ . El análisis post-test de Dunnet se utilizó para comparar diferencias entre los grupos y el control. El análisis de ANOVA de dos vías se utilizó para establecer las diferencias significativas entre más de dos grupos y dos variables independientes utilizando un  $p < 0,05$ . El análisis post-test de Tukey se utilizó para comparar diferencias entre todos los grupos.

## 6 Resultados

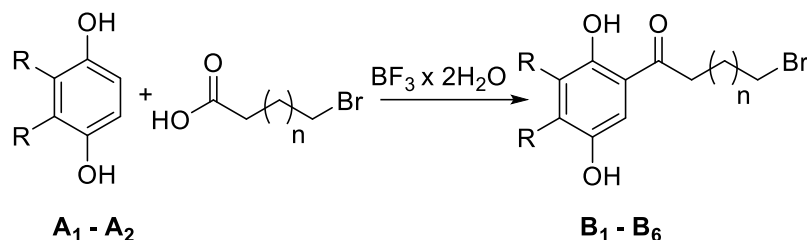
### 6.1 Resultados Parte I: Síntesis y caracterización química de los nuevos productos.

El calentamiento convencional con placa calefactora o baño termo regulado es la técnica de calentamiento más usada en química, su principal ventaja es que no requiere gran equipamiento, y su fundamento básico es transmitir energía térmica a la reacción desde una fuente generadora de calor. En el caso del calentamiento por microondas el calor no es transmitido desde una fuente generadora de calor sino que es generado por las moléculas que componen el sistema de reacción en función de su constante dieléctrica, principalmente por dos mecanismos; el primero y más importante es la rotación dipolar y se caracteriza por la liberación de energía en forma de calor por las moléculas al tratar de alinear sus dipolos en función de un campo eléctrico de una frecuencia conocida. El segundo dice relación con el aumento de la energía cinética de las moléculas dipolares y/o iónicas al moverse en función del campo electromagnético, este aumento de energía cinética genera mayor cantidad de choques entre las moléculas siendo esta energía disipada en forma de calor. Estos dos mecanismos hacen que una reacción calentada por microondas esté caracterizada por una mayor eficiencia en la generación y distribución del calor, pudiendo gracias a esto mejorar los rendimientos o tiempos de una reacción en relación a una realizada con calentamiento convencional<sup>34</sup>.



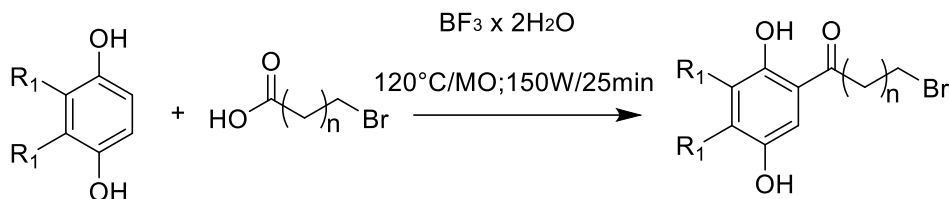
### 6.1.1 Optimización de la síntesis de bromoacilhidroquinonas utilizando microondas.

Previamente se ha estudiado en nuestro grupo de investigación, la obtención de acilhidroquinonas utilizando las condiciones que se muestran en el esquema 1<sup>32</sup>, Esta metodología consta en una primera etapa de un reordenamiento de Fries seguido por una sustitución nucleofílica con trifenilfosfina.



**Esquema 1.** Obtención de acilhidroquinonas

Con el objetivo de optimizar los resultados, en relación a los rendimientos y los tiempos de reacción utilizados, se realizó un estudio comparativo incorporando irradiación con microondas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1



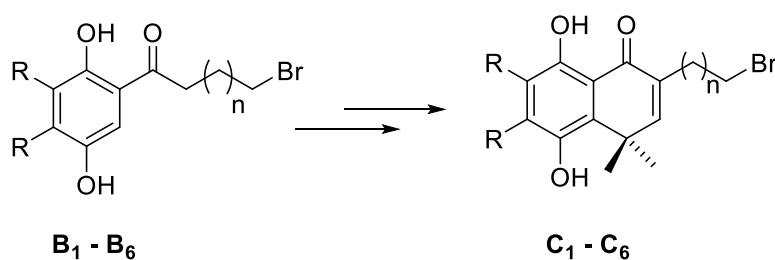
**Tabla 1.** Reordenamiento de Fries para la obtención de bromoacilhidroquinonas utilizando calentamiento convencional o irradiación con microondas

Compuesto	R	n	%rend., convencional	%rend., microondas
B1	H	3	29,3	23,4
B2	H	7	23,7	19,4
B3	H	8	32,5	21,4
B4	Me	3	-	20,6
B5	Me	7	-	20,0
B6	Me	8	-	19,5

De la tabla 1, se puede concluir que, aunque los rendimientos son similares, es posible disminuir drásticamente el tiempo de reacción al utilizar microondas en

lugar de calentamiento convencional. Utilizando las condiciones mejoradas, se sintetizaron las nuevas bromoacilhidroquinonas **B<sub>4</sub> - B<sub>6</sub>**, obteniendo resultados similares.

### 6.1.2 Obtención de las hidroquinonas bicíclicas, a partir de las bromoacilhidroquinonas



**Tabla 2. Metodología general para la obtención de las hidroquinonas bicíclicas C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.**

1) Ag<sub>2</sub>O en DCM, 90 min. 2) adición sobre 4-(2-metil-1-propen-1-il) morfolina en diclorometano se deja reaccionar por 12 horas. 3) hidrólisis ácida en etanol a reflujo por 3 horas.

Compuesto	R	n	% rendimiento
<b>C<sub>1</sub></b>	H	3	22,0
<b>C<sub>2</sub></b>	H	7	23,0
<b>C<sub>3</sub></b>	H	8	24,0
<b>C<sub>4</sub></b>	Me	3	21,5
<b>C<sub>5</sub></b>	Me	7	24,4
<b>C<sub>6</sub></b>	Me	8	46,7

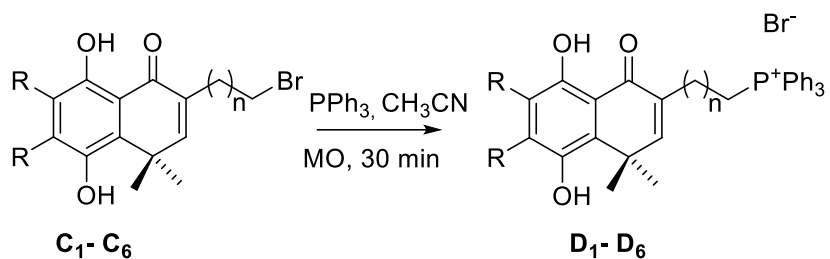
La formación de sales de fosfonio ocurre a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular. Existen variadas condiciones de reacción reportadas en la literatura, el primero es el utilizado previamente en nuestro laboratorio de síntesis<sup>32</sup>, el cual se basa en hacer la reacción del derivado bromado con trifenilfosfina en un solvente como tolueno, por un tiempo de 1 semana, aprovechando el desplazamiento de la reacción debido a la precipitación del producto iónico desde un solvente apolar incapaz de mantenerle en solución. Este mismo enfoque es el utilizado en otros trabajos donde se hace la reacción de derivados halogenados con trifenilfosfina en THF anhidro para la formación de sales de fosfónio en tiempos menores, del orden de 5 horas<sup>35</sup>. También se ha utilizado acetonitrilo y un exceso de trifenilfosfina

con objeto de favorecer el desplazamiento de la reacción a la formación de los productos calentando reflujo por 10 minutos<sup>36</sup>. Otro enfoque muy interesante que desconocíamos al hacer la parte sintética de la investigación es el uso de la propia trifenilfosfina como solvente para la reacción ya que por su bajo punto de fusión (80°C) al ser calentada con el derivado halogenado, pasa a cumplir el rol de solvente; posterior a eso tras 48 horas de reacción la mezcla solida es disuelta en diclorometano, y agregada sobre éter de petróleo, produciéndose la precipitación inmediata de la sal de fosfonio formada<sup>37</sup>.

Para el desarrollo de nuestra ruta sintética nos quedamos con el segundo enfoque descrito e identificamos sus beneficios y falencias; el principal beneficio es que gracias al bajo punto de ebullición del acetonitrilo, es sumamente fácil retirarlo del crudo de reacción una vez transcurrida esta. Siguiendo la misma línea el bajo punto de ebullición de este solvente es su principal desventaja ya que no permite alcanzar altas temperaturas de calentamiento lo que podría estar demorando la reacción.

La literatura nos dice que es posible lograr la sustitución del átomo de bromo por trifenilfosfina utilizando radiación de microondas, de este modo decidimos utilizar esta metodología. El reactor de microondas permite realizar la reacción en un tubo sellado regulando la presión, de esta manera la mezcla de reacción puede alcanzar temperaturas mayores que el punto de ebullición de la solución, con esto en mente se decidió hacer la reacción en un tubo sellado a 130 °C en CH<sub>3</sub>CN como solvente y utilizando un exceso de trifenilfosfina.

### 6.1.3 Obtención de sales de fosonio de las hidroquinonas bicíclicas usando microondas.

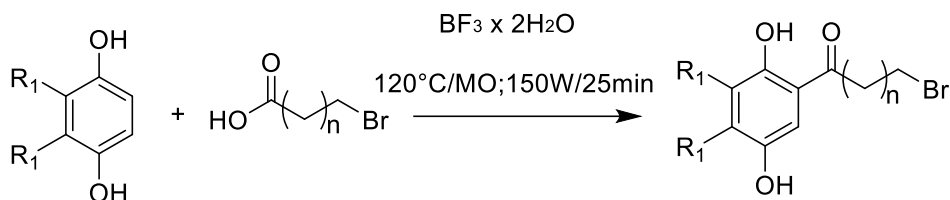


**Tabla 3.** Obtención de sales de fosonio de hidroquinonas bicíclicas

Compuesto	R	n	% rendimiento
D <sub>1</sub>	H	3	22,0
D <sub>2</sub>	H	7	29,0
D <sub>3</sub>	H	8	33,3
D <sub>4</sub>	Me	3	36,5
D <sub>5</sub>	Me	7	35,4
D <sub>6</sub>	Me	8	36,0

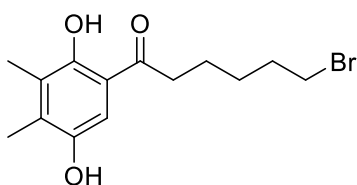
## 6.1.4 Procedimientos experimentales químicos.

### Método general para la Acilación de Fries asistida por microondas.



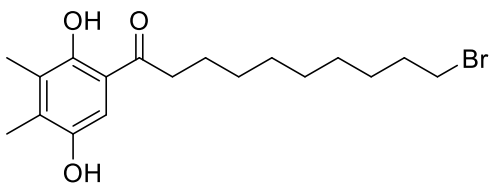
Se agrega 1 equivalente de hidroquinona, 1,5 equivalentes de ácido carboxílico y 4ml de trifluoruro de boro dihidratado (BF<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O) en un tubo de reacción. Se irradia con microondas con una potencia de 150W, durante 25 min a 120°C. Finalizada la reacción se agregan lentamente 20 mL de H<sub>2</sub>O, y una vez que deja de burbujear, se extrae con acetato de etilo. Posteriormente el extracto se lava con H<sub>2</sub>O y es secado con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El extracto seco se filtra, y el solvente es eliminado por evaporación a presión reducida. El crudo de reacción es purificado por cromatografía en columna usando una mezcla de acetato de etilo/hexano como eluyente.

### 6-bromo-1-(2,5-dihidroxi-3,4-dimetilfenil)hexan-1-ona (B<sub>4</sub>).



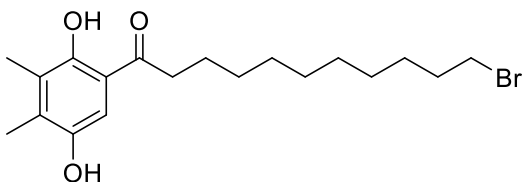
Se hace reaccionar 1g (7,23mmol) de 2,3-dimetilhidroquinona con 2,11g (10,8mmol) de ácido-6-bromohexanoico, obteniéndose 470 mg de **B<sub>4</sub>** (1,5mmol, 20,61 % de rendimiento). <sup>1</sup>H-RMN (300,13 MHz,) δ (CDCl<sub>3</sub>): 1,58-1,47 (m,2H); 1,76 (q, J = 7,2Hz, 2H); 1,91(q, J = 7,2 Hz, 2H); 2,20(s, 3H, Me); 2,23(s, 3H, Me); 2,92(t, J = 7,, 2H, COCH<sub>2</sub>); 3,43(t, J = 6,7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 4,7(s, 1H, 5-OH); 7,01(s, 1H, 6-H); 12,40(s, 1H, 2-OH). <sup>13</sup>C-RMN δ (CDCl<sub>3</sub>): 11,60; 13,05; 23,63; 27,83; 32,54; 33,59; 37,96; 111,23; 115,91; 127,17; 134,12; 145,43; 155,37; 205,51. Sólido café pálido; punto de fusión: 122,5 - 124,9 °C.

### 10-bromo-1-(2,5-dihidroxy-3,4-dimetilfenil)decan-1-ona (B<sub>5</sub>).



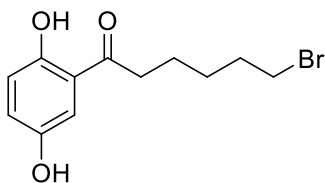
Se hace reaccionar 700 mg (5,1 mmoles) de 2,3-dimetilhidroquinona con 1,987g (7,59 mmoles) de ácido-10-bromodecanoico, obteniéndose 350 mg (0,942 mmol, 20% de rendimiento) **B<sub>5</sub>**. <sup>1</sup>H-RMN δ (CDCl<sub>3</sub>): 1,44-1,27(m, 10H); 1,72(q, *J* = 7,35Hz, 2H); 1,85(q, *J* = 6,87 Hz, 2H,); 2,20(s, 3H, Me); 2,23(s, 3H, Me); 2,89(t, *J* = 7,35Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO); 3,41 (t, *J* = 6,87Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Br); 4,58(s, 1H, 5'-OH); 7,03(s, 1H, 6'-H); 12,46(s, 1H, 2'-OH). <sup>13</sup>C-RMN δ(CDCl<sub>3</sub>): 11,60; 13,03; 24,71; 28,12; 28,70; 29,25; 29,27; 29,30; 32,79; 34,09; 38,28; 111,39; 115,97; 133,95; 145,38; 155,39; 206,16. Sólido café claro; punto de fusión: 89,6 - 91,5 °C

### 11-bromo-1-(2,5-dihidroxi-3,4-dimetilfenil)undecan-1-ona. (B<sub>6</sub>)



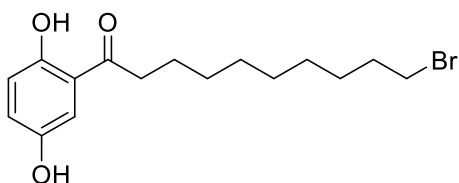
Se hace reaccionar 700mg (5,1mmol) de 2,3-dimetilhidroquinona con 2,015g (7,6mmol) de ácido-11-bromoundecanoico, obteniéndose 380 mg (0,9mmol) de **B<sub>6</sub>**, rendimiento del proceso: 19,46%. <sup>1</sup>H-RMN δ (CDCl<sub>3</sub>): 1,48-1,27(m, 12H); 1,71(q, *J* = 7,4Hz, 2H); 1,85(q, *J* = 7,0 Hz, 2H); 2,20(s, 3H, Me); 2,23(s, 3H, Me); 2,89(t, *J* = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO); 3,41(t, *J* = 6,9, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 4,59(s, 1H, 2-OH); 7,03(s, 1H, 6-H); 12,46(s, 1H, 5-OH). <sup>13</sup>C-RMN δ(CDCl<sub>3</sub>): 11,60; 13,03; 24,74; 28,15; 28,73; 29,31; 29,35; 29,38; 32,82; 34,11; 38,31; 111,40; 133,97; 145,39; 155,38; 206,21. Sólido café claro; punto de fusión: 88,2 - 90,6 °C

### 6-bromo-1-(2,5-dihidroxifenil)hexan-1-ona (B<sub>1</sub>).<sup>32</sup>



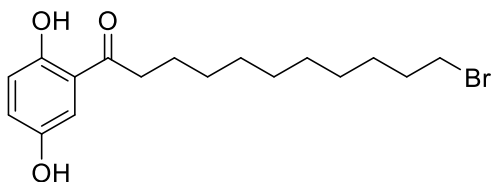
Se hace reaccionar 700mg (6,36 mmol) de hidroquinona con 1,86g (9,53 mmol) de ácido-6-bromohexanoico, obteniéndose 350 mg (0,942mmol) de **B<sub>1</sub>**, rendimiento del proceso: 23,4%. 1.80 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.91 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.95 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.42 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 4.84 (s, 1H), 6.88 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.01 (dd,  $J_1 = 3$  Hz;  $J_2 = 8.9$  Hz, 1H), 11.9 (s, 1H).

### 10-bromo-1-(2,5-dihidroxifenil)decan-1-ona (B<sub>2</sub>).<sup>32</sup>



Se hace reaccionar 700mg (6,35 mmol) de hidroquinona con 2,24 g (9,53 mmol) de ácido-6-bromohexanoico, obteniéndose 419 mg (1,22mmol) de **B<sub>1</sub>**, rendimiento del proceso: 19,38%. <sup>1</sup>H-NMR δ: 1.20-1.47 (m, 10H), 1.70 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.83 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.89 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.39 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 5.44 (s, 1H), 6.86 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J_1 = 3.0$  Hz,  $J_2 = 8.9$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 3$  Hz, 1H), 12.01 (s, 1H).

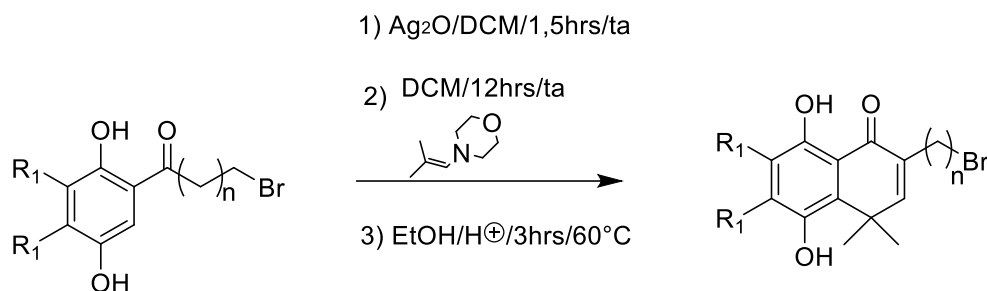
### 11-bromo-1-(2,5-dihidroxifenil)undecan-1-ona (B<sub>3</sub>).<sup>32</sup>



Se hace reaccionar 700mg (6,36 mmol) de hidroquinona con 2,53g (9,53 mmol) de ácido-6-bromoundecanoico, obteniéndose 486mg (1,36mmol) de **B<sub>3</sub>**, rendimiento del proceso: 21,43%. <sup>1</sup>H-NMR δ: 1.26-1.47 (m, 12H), 1.72 (q,  $J = 7.0$

Hz, 2H), 1.84 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.90 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 3.40 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 4.70 (s, 1H), 6.88 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.01 (dd,  $J_1 = 3.0$  Hz,  $J_2 = 8.9$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 3$  Hz, 1H), 11.94 (s, 1H).

### Método general para la obtención de Nafto-Hidroquinonas.



#### 1) Oxidación de la acilhidroquinona:

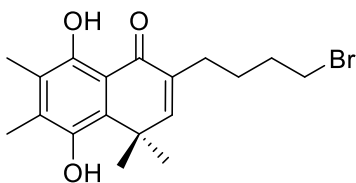
Un equivalente de hidroquinona y tres equivalentes de  $\text{Ag}_2\text{O}$  en 20 mL de DCM se dejan reaccionar con agitación a temperatura ambiente por 1,5 h. Luego se traspasa a un embudo de decantación de 100 mL, al cual se le ha agregado un tapón de algodón para filtrar las partículas sólidas de  $\text{Ag}_2\text{O}$ .

2) Con el sistema descrito la solución conteniendo la acilquinona se agrega gota a gota sobre una solución de 4-(2-metil-1-propen-1-il)morfolina en DCM, la cual se mantiene, con agitación magnética, en un matraz en hielo. El proceso completo de adición dura aproximadamente 30 min, la reacción se torna de un tono rojo-anaranjado, la mezcla de reacción se deja toda la noche. Posteriormente, el solvente se evapora a presión reducida.

3) El residuo se disuelve en 15 ml de EtOH y se agrega una gota de ácido clorhídrico concentrado para generar el medio ácido. La mezcla se calienta a reflujo por 3 h, tornándose de un color amarillo intenso. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se vierte sobre un vaso de precipitado de 100 mL con 50 ml de hielo, formándose un precipitado amarillo, el cual se filtra al vacío. El crudo de reacción es purificado por cromatografía en columna usando una mezcla de acetato de etilo hexano como eluyente.

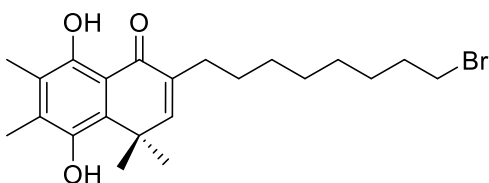


#### 2-(4-bromobutil)-5,8-dihidroxi-4,4,6,7-tetrametilnaftalen-1(4H)-ona (C<sub>4</sub>).



Se hace reaccionar 400mg (1,26 mmol) de **B<sub>4</sub>** con 896 mg (3,78mmol) de Ag<sub>2</sub>O en DCM, luego se agrega, sobre 266 mg (1,8 mmol) de 4-(2-metilprop-1-en-1-il) morfolina. Posteriormente se agrega HCl concentrado se calienta a reflujo y finalmente se purifica por columna obteniéndose **C<sub>4</sub>** 100 mg (0,35mmol, 21,45 % de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>): 1,59(s, 6H, 2XMe); 1,75-1,66(m, 2H); 1,85(q, *J* = 7,4 Hz, 2H); 2,23(s, 3H, Me); 2,26(s, 3H, Me); 2,42(t, *J* = 7,4 Hz, 2H); 3,59(t, *J* = 6,5, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 4,42(s, 1H, 5-OH), 6,59(s, 1H, 3-H); 13,39(s, 1H, 8-H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 11,64; 13,06; 25,50; 25,50; 25,78; 25,78; 27,05; 28,26; 28,37; 29,72; 32,31; 32,48; 33,68; 37,37; 44,94; 112,74; 123,34; 131,31; 131,69; 133,01; 133,05; 143,38; 155,19; 156,59; 190,49. Sólido amarillo; punto de fusión: 114,1 - 116,5 °C

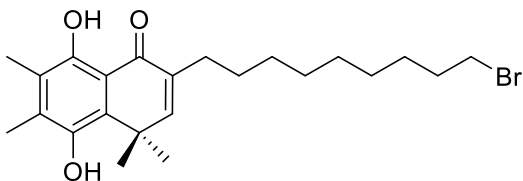
#### 2-(8-bromoocetil)-5,8-dihidroxi-4,4,6,7-tetrametilnaftalen-1(4H)-ona (C<sub>5</sub>).



Se hace reaccionar 300mg (0,73 mmol) de **B<sub>5</sub>** con 504 mg (2,18mmol) de Ag<sub>2</sub>O en DCM, luego se agrega sobre 155 mg (1,09 mmol) de 4-(2-metilprop-1-en-1-il) morfolina. Posteriormente se agrega HCl concentrado se calienta a reflujo y finalmente se purifica por columna obteniéndose 75 mg (0,2mmol, 24,42 % de rendimiento) de **C<sub>5</sub>**. <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>): 1,40-1,26(m, 8H); 1,48-1,40(m, 2H); 1,55-1,48(m, 2H); 1,59(s, 6H); 2,23(s, 3H, Me); 2,25(s, 3H, Me); 2,38(t, *J* = 7,1Hz, 2H), 3,41(t, *J* = 6,87 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 4,41(s, 1H, 5-OH); 6,56(s, 1H, 3-H); 13,46(s, 1H, 8-OH). <sup>13</sup>C-NMR δ (CDCl<sub>3</sub>): 11,64; 13,03; 25,53; 26,87; 28,38; 28,73; 28,86; 29,05; 29,24; 29,24; 29,26; 29,29; 29,86; 32,64; 32,81; 34,08;

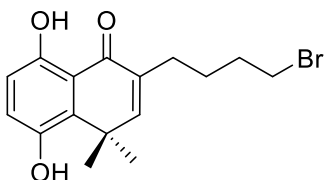
37,30; 45,21; 112,85; 123,26; 131,19; 131,80; 133,56; 143,37; 155,17; 156,32; 191,18. Sólido amarillo; punto de fusión: 75,3 - 76,9 °C.

### 2-(9-bromononil)-5,8-dihidroxi-4,4,6,7-tetrametilnaftalen-1(4H)-ona (C<sub>6</sub>).



Se hace reaccionar 300mg (0,79 mmol) de **B<sub>6</sub>** con 541 mg (2,37mmol) de **Ag<sub>2</sub>O** en DCM, luego se gotea, sobre 167,33 mg (1,185 mmol) de 4-(2-metilprop-1-en-1-il) morfolina en DCM, una vez transcurrido el paso anterior se hidroliza en EtOH, y se purifica por columna obteniéndose 158 mg (0,3546mmol) de **C<sub>6</sub>**; rendimiento del proceso: 46,70%. <sup>1</sup>H-RMN (300,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 1,39-1,26(M, 10H); 1,48-1,39(M, 2H); 1,56-1,48(m, 2H); 1,59(s, 6H); 2,23(s, 3H); 2,25(s, 3H); 2,38(t, *J* = 6,87Hz, 2H); 3,54(t, *J* = 6,54Hz, 2H); 4,41(s, 1H); 6,56(s, 1H); 13,46(s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR δ (CDCl<sub>3</sub>): 11,64; 13,03; 25,53; 26,89; 28,18; 28,40; 28,75; 28,88; 29,05; 29,31; 29,31; 29,35; 29,35; 29,40; 29,42; 29,86; 32,65; 32,84; 32,84; 34,09; 37,29; 45,22; 112,85; 123,26; 131,16; 131,80; 133,67; 143,36; 155,17; 156,38; 191,18. Sólido amarillo; punto de fusión: 63,3 - 64,4 °C.

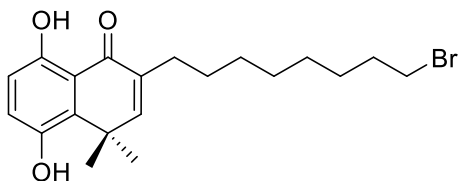
### 2-(4-bromobutil)-5,8-dihidroxi-4,4-dimetilnaftalen-1(4H)-ona (C<sub>1</sub>).



Se hace reaccionar 500mg (1,74 mmol) de **B<sub>1</sub>** con 1,2 g (5,224mmol) de **Ag<sub>2</sub>O** en DCM, luego se gotea sobre 247 mg (1,755 mmol) de 4-(2-metilprop-1-en-1-il) morfolina en DCM, una vez transcurrido el paso anterior se hidroliza en EtOH, y se purifica por columna obteniéndose 130 mg (0,3866mmol) de **C<sub>1</sub>**; rendimiento del proceso: 22,03% <sup>1</sup>H-RMN (300,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 1,60(s,6H); 1,77-1,64(m, 2H); 1,93-1,78(m, 2H); 2,42(t, *J* = 7,43, 2H); 3,59(t, *J* =

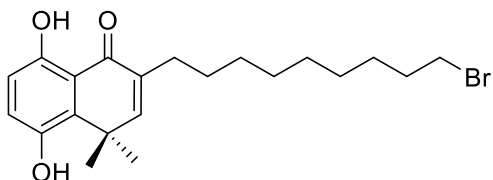
6,60Hz, 2H); 4,84(s, 1H); 6,64 (s, 1H); 6,78(d,  $J = 8,87\text{Hz}$ , 1H); 6,90(d,  $J = 8,80$ , 1H), 12,95(s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 25,05; 25,78; 27,05; 28,23; 28,34; 29,71; 32,30; 32,46; 33,65; 37,64; 44,91; 115,55; 124,05; 133,04; 134,52; 146,43; 146,43; 156,35; 156,35; 157,28; 157,28; 191,18. Sólido anaranjado; punto de fusión: 119,8 - 121,1 °C.

### 2-(8-bromooctil)-5,8-dihidroxi-4,4-dimetilnaftalen-1(4H)-ona (**C**<sub>2</sub>).



Se hace reaccionar 365 mg (1,063 mmol) de **B**<sub>2</sub> con 778 mg (3,35mmol) de **Ag**<sub>2</sub>**O** en DCM, luego se gotea sobre 225,51 mg (1,594 mmol) de 4-(2-metilprop-1-en-1-il) morfolina en DCM, una vez transcurrido el paso anterior se hidroliza en EtOH, y se purifica por columna obteniéndose 105 mg (0,265mmol) de **C**<sub>2</sub>; rendimiento del proceso: 23,0%.  $^1\text{H-RMN}$  (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 1,40-1,27(m,8H); 1,48-1,40(m,2H); 1,56-1,48(m, 2H); 1,60(s, 3H); 2,38(t,  $J = 6,74\text{Hz}$ , 2H); 3,41(t,  $J = 6,87\text{Hz}$ , 2H); 5,01(s, 1H); 6,62(s, 1H); 6,77(d,  $J = 8,80\text{Hz}$ , 1H); 6,90(d,  $J = 8,80$ , 1H); 13,03(s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$  ( $\text{DMSO-CDCl}_3$ ): 25,18; 26,86; 28,15; 28,37; 28,72; 28,84; 29,01; 29,24; 32,62; 32,80; 34,08; 37,54; 45,21; 115,50; 115,68; 123,75; 133,80; 134,96; 145,27; 156,92; 191,27. Sólido amarillo; punto de fusión: 82,5 - 84,6 °C.

### 2-(9-bromononil)-5,8-dihidroxi-4,4-dimetilnaftalen-1(4H)-ona (**C**<sub>3</sub>).



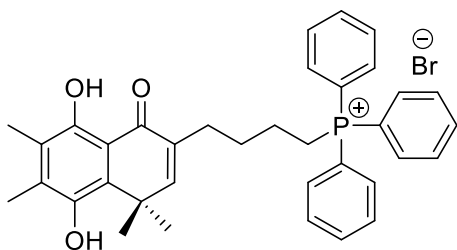
Se hace reaccionar 400 mg (1,12 mmol) de **B**<sub>3</sub> con 778 mg (3,35mmol) de **Ag**<sub>2</sub>**O** en DCM, luego se gotea sobre 237 mg (1,679 mmol) de 4-(2-metilprop-1-en-1-il) morfolina en DCM, una vez transcurrido el paso anterior se hidroliza en EtOH, y se purifica por columna obteniéndose 110 mg (0,268mmol) de **C**<sub>3</sub>;

rendimiento del proceso: 24,01%.  $^1\text{H-NMR}$  (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 1,38-1,24(m,10H); 1,46-1,38(m,2H); 1,56-1,48(m, 2H); 2,38(t,  $J = 6,74\text{Hz}$ , 2H); 3,41(t,  $J = 6,87$ , 2H); 5,01(s, 1H); 6,61(s, 1H); 6,77(d,  $J = 8,8\text{Hz}$ , 1H); 6,89(d,  $J = 8,8\text{Hz}$ , 1H); 13,04(s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 25,16; 26,88; 28,01; 28,17; 28,39; 28,39; 28,75; 28,87; 29,01; 29,01; 29,33; 29,39; 29,42; 32,64; 32,83; 34,11; 37,56; 45,23; 115,52; 115,67; 123,76; 133,83; 134,99; 145,35; 156,99; 191,32. Sólido amarillo; punto de fusión: 86,5- 88,1 °C.

### Método general para la obtención de sales de fosfonio derivadas de hidroquinonas bicíclicas.

La sustitución nucleofílica del átomo de bromo de la cadena lateral por la trifenilfosfina se realiza haciendo reaccionar 1 equivalente de Nafto-Hidroquinona con 2 equivalentes de trifenilfosfina en 3mL de MeCN, todo se mezcla en un tubo de vidrio que soporta presión que provee el fabricante del reactor de microondas. La reacción transcurre a 130°C bajo presión, el tiempo de reacción es de 30 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se evapora el solvente de reacción quedando un remanente de aspecto viscoso y amarillo fuerte. El crudo de reacción es purificado por cromatografía en placa preparativa, usando una mezcla de acetato de etilo, hexano, diclorometano y metanol como eluyente.

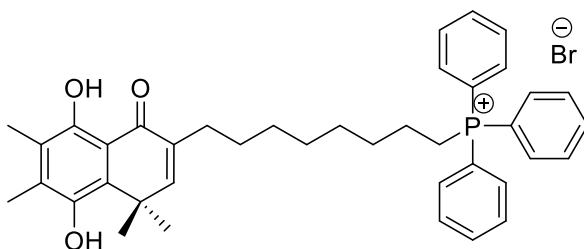
### Bromuro de (4-(5,8-dihidroxi-4,4,6,7-tetrametil-1-oxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)butil)trifenilfosfonio (D4).



Se hace reaccionar 65 (0,17mmol) de **C**<sub>4</sub> con 90mg (0,34mmol) de trifenilfosfina en 3mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  a 130°C en a 150W en un tubo sellado para microondas; obteniéndose 39mg (0,062mmol) de **D**<sub>4</sub>; 36,47% de rendimiento.

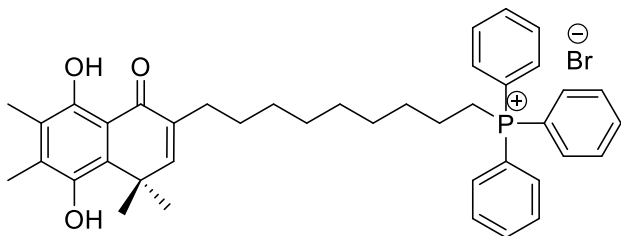
$^1\text{H}$ -RMN (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 1,45 (s, 6H); 1,72-1,55(m, 2H); 1,86 (q,  $J = 7,22$  Hz, 1H); 2,15 (s, 3H); 2,32 (s, 3H); 3,68-3,61 (m, 2H); 5,93 (s, 1H); 6,59 (s, 1H); 7,70-7,59 (m, 6H); 7,83-7,69 (m, 9H); 13,27(s, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 11,58; 14,48; 25,54; 27,57; 29,25; 29,46; 37,67; 53,47; 112,30; 117,56; 118,70; 122,73; 130,45; 130,61; 131,83; 133,43; 133,56; 133,67; 133,67; 135,12; 135,15; 136,91; 144,66; 154,86; 158,25; 191,17. Sólido amarillo-anaranjado; Punto de fusión:  $180^\circ\text{C}$  (d).

**Bromuro de (8-(5,8-dihidroxi-4,4,6,7-tetrametil-1-oxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)octil)trifenilfosfonio ( $\text{D}_5$ ).**



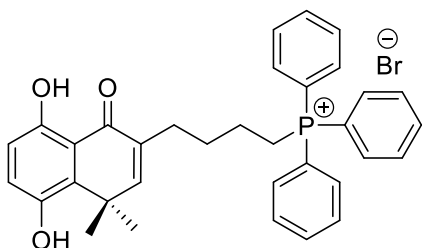
Se hace reaccionar 62,9mg (0,148mmol) de  $\text{C}_5$  con 80mg (0,280mmol) de trifenilfosfina en 3mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  a  $130^\circ\text{C}$  en a 150W en un tubo sellado para microondas; obteniéndose 36mg (0,052mmol) de  $\text{D}_5$ ; 35,51 % de rendimiento.  $^1\text{H}$ -RMN (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 1,33-1,19 (m, 8H); 1,50-1,39(m, 2H); 1,58 (s, 6H); 1,83-1,67(m, 2H); 2,18(s, 3H); 2,28(s, 3H); 2,31(t,  $J = 7,22$ Hz, 2H); 3,81-3,64(m, 2H); 4,98 (s, 1H); 7,75-7,65(m, 6H); 7,89-7,75(m, 9H); 13,45(s, 1H).  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 11,50; 13,61; 22,40; 22,52; 22,59; 23,07; 25,54; 25,60; 25,68; 28,19; 28,77; 28,94; 29,00; 29,71; 30,15; 30,35; 37,42; 112,74; 117,80; 118,94; 123,01; 130,43; 130,60; 133,61; 133,75; 135,01; 135,05; 143,75; 156,84; 191,30. Sólido amarillo intenso; punto de fusión:  $100^\circ\text{C}$  (d).

**Bromuro de (9-(5,8-dihidroxi-4,4,6,7-tetrametil-1-oxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)nonil)trifenilfosfonio (D<sub>6</sub>).**



Se hace reaccionar 64,5mg (0,147mmol) de **C<sub>6</sub>** con 78mg (0,294mmol) de trifenilfosfina en 3mL de CH<sub>3</sub>CN a 130°C en a 150W en un tubo sellado para microondas; obteniéndose 36mg (0,052mmol) de **D<sub>6</sub>**; 36,01% de rendimiento. <sup>1</sup>H-RMN (300,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 1,32-1,09(m, 10H); 1,45(q, *J* = 6,45Hz, 2H); 1,56(s, 6H); 2,06-1,75(m, 2H); 2,13(s, 3H); 2,40-2,26(m, 5H); 3,75-3,57(m, 2H); 6,52(s, 1H); 7,74-7,65(m, 6H); 7,87-7,74(m, 9H); 13,46(s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR 6 (CDCl<sub>3</sub>): 11,57; 14,20; 22,20; 22,53; 22,58; 22,67; 22,86; 22,86; 25,68; 28,17; 28,89; 28,94; 28,95; 29,08; 30,17; 30,37; 37,55; 112,61; 117,71; 118,86; 122,73; 130,46; 130,63; 133,51; 133,64; 135,09; 144,45; 154,91; 157,07; 191,41. Sólido amarillo intenso; punto de fusión: 180°C (d).

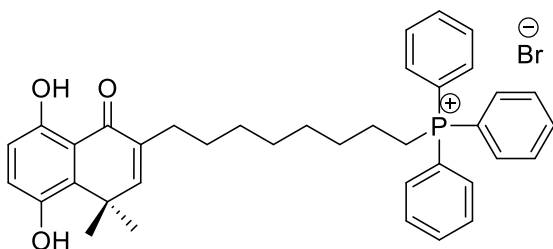
**Bromuro de (4-(5,8-dihidroxi-4,4-dimetil-1-oxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)butil)trifenilfosfonio (D<sub>1</sub>).**



Se hace reaccionar 70mg (0,21 mmol) de **C<sub>1</sub>** con 110mg (0,412mmol) de trifenilfosfina en 3mL de CH<sub>3</sub>CN a 130°C en a 150W en un tubo sellado para microondas; obteniéndose 27mg (0,044mmol) de **D<sub>1</sub>**; 21,95% de rendimiento. <sup>1</sup>H-RMN (300,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 1,51(s, 6H); 1,68(q, *J* = 7,22Hz, 2H); 1,88(q, *J* = 7,22Hz, 2H); 2,32(t, *J* = 7,22Hz, 2H); 3,74-3,58(m, 2H); 6,70(s, 1H);

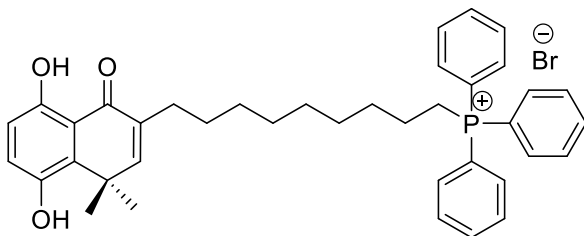
6,70(d,  $J = 8,94\text{Hz}$ , 1H); 7,16(d,  $J = 8,94\text{Hz}$ , 1H); 7,74-7,68(m, 6H); 7,85-7,74(m, 9H); 8,5(s, 1H); 12,68(s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ):24,74; 27,47; 33,28; 37,68; 115,29; 117,31; 118,45; 124,45; 130,44; 130,60; 133,45; 135,22; 135,25; 134,13; 147,30; 155,67; 158,51; 191,22. Sólido amarillo-anaranjado; Punto de fusión:  $170^\circ\text{C}$  (d).

**Bromuro de (8-(5,8-dihidroxi-4,4-dimetil-1-oxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)octil)trifenilfosfonio ( $\text{D}_2$ ).**



Se hace reaccionar 75mg (0,189 mmol) de  $\text{C}_2$  con 100mg (0,38mmol) de trifenilfosfina en 3mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  a  $130^\circ\text{C}$  en a 150W en un tubo sellado para microondas; obteniéndose 36mg (0,055mmol) de  $\text{D}_2$ ; 29,03% de rendimiento.  $^1\text{H-RMN}$  (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 1,22-1,07(m, 8H); 1,37-1,26(m, 2H); 1,51-1,39(m, 8H); 2,17(t,  $J = 7,29$ , 2H); 3,36-3,15(m, 2H); 6,45(s, 1H); 6,53(d,  $J = 8,59$ , 1H); 6,95(d,  $J = 8,59$ , 1H); 7,79-7,50(m, 15H); 8,45(s, 1H); 12,69 (s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 22,11; 22,22; 22,29; 24,80; 28,16; 28,40; 28,50; 28,67; 28,82; 30,16; 30,16; 30,40; 32,76; 37,46; 115,09; 117,20; 118,33; 124,00; 130,43; 130,60; 133,32; 135,29; 147,18; 155,55; 157,32; 191,32. Sólido amarillo intenso; punto de fusión:  $100^\circ\text{C}$  (d).

**Bromuro de (9-(5,8-dihidroxi-4,4-dimetil-1-oxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)nonil)trifenilfosfonio (D<sub>3</sub>).**



Se hace reaccionar 70mg (0,170mmol) de **C<sub>3</sub>** con 90mg (0,34mmol) de trifenilfosfina en 3mL de CH<sub>3</sub>CN a 130°C en a 150W en un tubo sellado para microondas; obteniéndose 38mg (0,057mmol) de **D<sub>3</sub>**; 33,3% de rendimiento. <sup>1</sup>H-RMN (300,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 1,24-1,06(m, 10H); 1,55-1,42(m, 8H); 1,73-1,61(m, 2H); 2,31(t, *J* = 7,01Hz, 2H); 3,53-3,37(m, 2H); 6,50(d, *J* = 8,80Hz, 1H); 6,53(s, 1H); 7,63(d, *J* = 8,80Hz, 1H); 7,85-7,65(m, 15H); 12,58 (s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR δ (CDCl<sub>3</sub>): 22,11; 22,22; 22,29; 24,84; 28,16; 28,40; 28,50; 28,67; 28,82; 30,16; 30,16; 30,40; 32,77; 37,46; 115,09; 117,20; 118,33; 124,01; 130,43; 130,60; 133,32; 135,29; 147,17; 155,55; 157,36; 191,35. Sólido amarillo intenso; punto de fusión: 100°C (d).



## 6.2 Resultados parte II: Evaluación biológica de los productos sintetizados.

### 6.2.1 Tamizado de los compuestos sintetizados según su efecto sobre la proliferación celular.

Como primera etapa de la parte biológica de la investigación, se estudió el efecto antiproliferativo de las sales de fosfonio sintetizadas. Esta etapa consiste en la realización de ensayos de MTT a 48 horas, con estímulo de nuestros compuestos a diferentes concentraciones, para conocer sus valores de IC<sub>50</sub> (**Tabla 4**), una vez obtenidos se comparan estos valores en células tumorales MDA-MB-231 y MDA-MB-468, respecto al control con células normales MCF10A obteniéndose el índice de selectividad (**figura 3**) que corresponde al cociente entre el IC<sub>50</sub> MCF10A y el IC<sub>50</sub> de cada línea tumoral. El valor IS nos entrega una primera aproximación experimental de la selectividad de cada molécula. Entre más alto el valor de IS más selectivo el compuesto en estudio; para esta etapa fijamos en que el mínimo valor de IS para clasificar un compuesto como promisorio es de IS=2.

**Tabla 4.** Valores de IC<sub>50</sub> de proliferación más desviación estándar, obtenidos de ensayos de MTT, para cada compuesto en las tres líneas celulares en las que se estudiaron. Cada valor de IC<sub>50</sub> fue obtenido de una curva con concentraciones crecientes de compuesto a estudiar (n=3), los datos se expresan en concentración micromolar.

Línea celular	IC <sub>50</sub> D <sub>1</sub>	IC <sub>50</sub> D <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> D <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub> D <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> D <sub>5</sub>	IC <sub>50</sub> D <sub>6</sub>
<b>MCF10A</b>	3,56 ± 0,2	1,56 ± 0,273	1,46 ± 0,142	2,61± 0,41	1,5± 0,321	1,67± 0,213
<b>MDA-MB-231</b>	3,01± 0,12	1,49 ± 0,17	1,56 ± 0,134	1,17± 0,431	1,1± 0,213	1,4 ± 0,2
<b>MDA-MB-468</b>	2,2 ± 0,377	1,35 ± 0,51	1,23 ± 0,291	0,97 ± 0,07	0,9 ± 0,154	0,86 ± 0,1

A

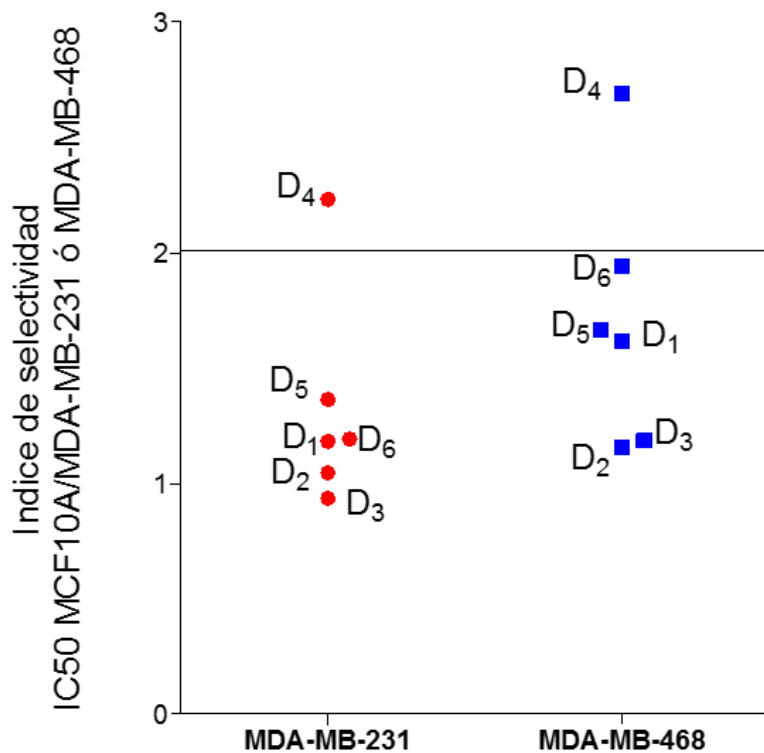
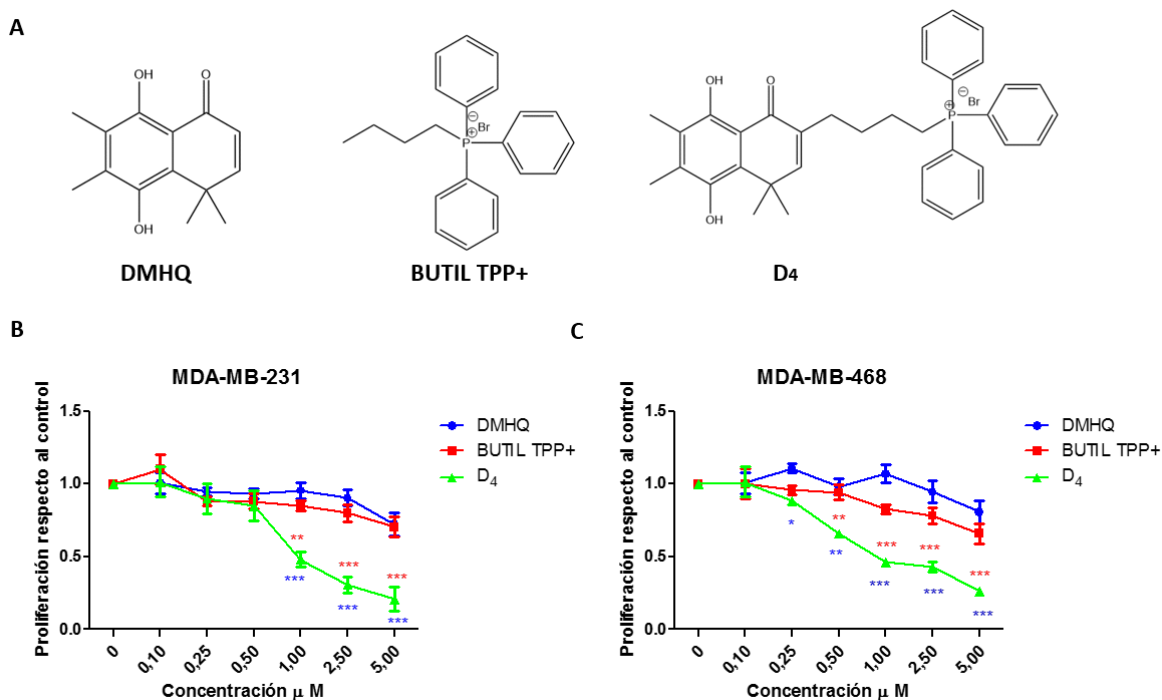


Figura 3. Valores de IS para cada molécula estudiada.

Como resultado de esta etapa, el compuesto **D4** fue seleccionado como el compuesto más prometedor de la serie de sales de fosfonio, por tener el IS más alto, superando el valor de corte de  $IS=2$ .

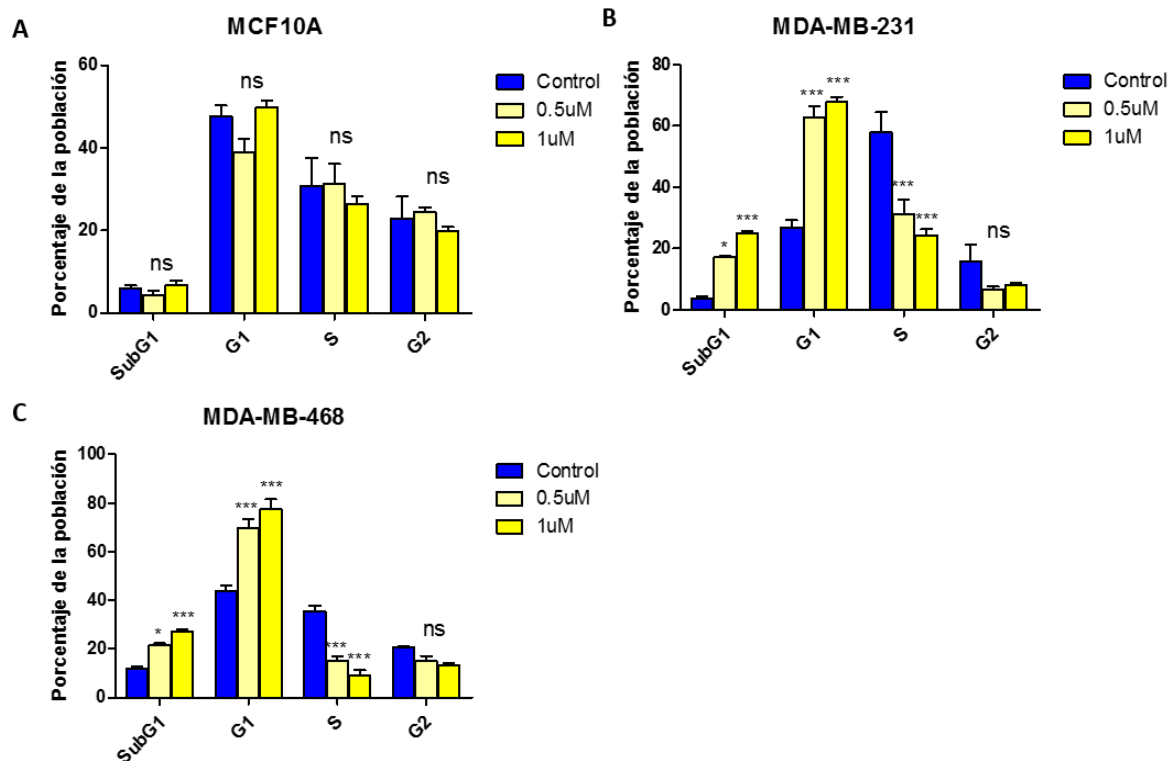
## 6.2.2 Caracterización del efecto anti proliferativo del compuesto D<sub>4</sub>.

Recientemente se han descrito efectos tóxicos de las cadenas alquílicas largas unidas a TPP<sup>+</sup>, por lo cual es importante usar como control la fracción alquilfosfonio del compuesto D<sub>4</sub> por separado, para cerciorarnos de que el efecto sobre la proliferación de células tumorales, depende de la estructura total del compuesto D<sub>4</sub>, y no de un efecto inespecífico de la fracción molecular de alquiltrifenilfosfonio. En nuestro caso, se estudió el efecto de D<sub>4</sub>, del bromuro de butiltrifenilfosfonio y de la hidroquinona DMHQ (figura 4).



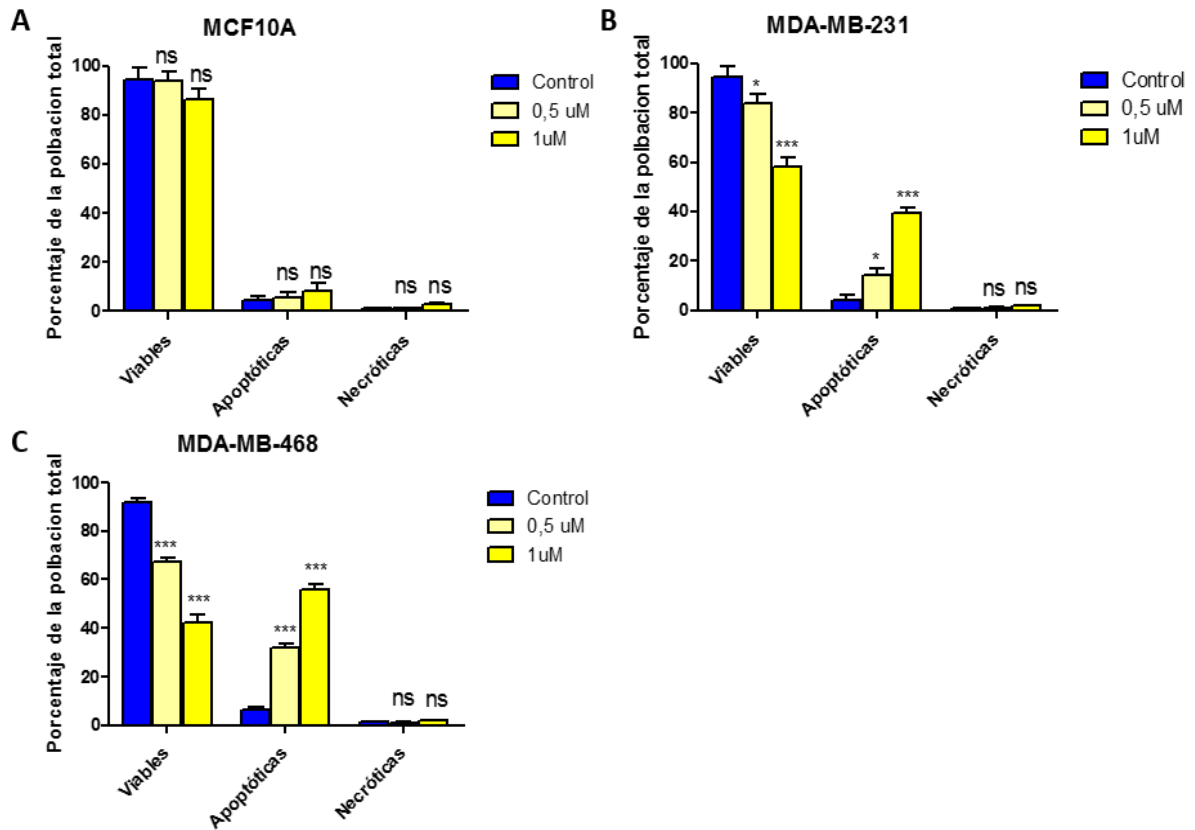
**Figura 4. El efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre la proliferación de células tumorales MDA-MB-231 y MDA-MB-468 es una propiedad emergente de la molécula.** A) Estructuras químicas de los compuestos DMHQ, BUTIL-TPP<sup>+</sup> y D<sub>4</sub>. B) Curvas de proliferación a 48h para cada compuesto en células MDA-MB-231. C) Curvas de proliferación a 48h para cada compuesto en células MDA-MB-468. Cada curva tiene concentraciones crecientes de compuesto estudiado, cada punto de la curva representa valores promedio para tres experimentos independientes (n=3) de ensayo MTT a 48h. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, n=3; \*=*p* < 0.05, \*\*=*p* < 0.01, \*\*\*=*p* < 0.001.

Previamente nuestro grupo ha descrito hidroquinonas análogas a DMHQ, cuyo efecto anti proliferativo se debe a una inhibición del complejo I mitocondrial que provoca la detención del ciclo celular en la fase G2/M<sup>38</sup>. Con estos antecedentes, se hace obligatorio evaluar el efecto del compuesto **D<sub>4</sub>** sobre el ciclo celular a concentraciones en las cuales se manifiesta el efecto en la proliferación de las células tumorales MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (**figura 5**).

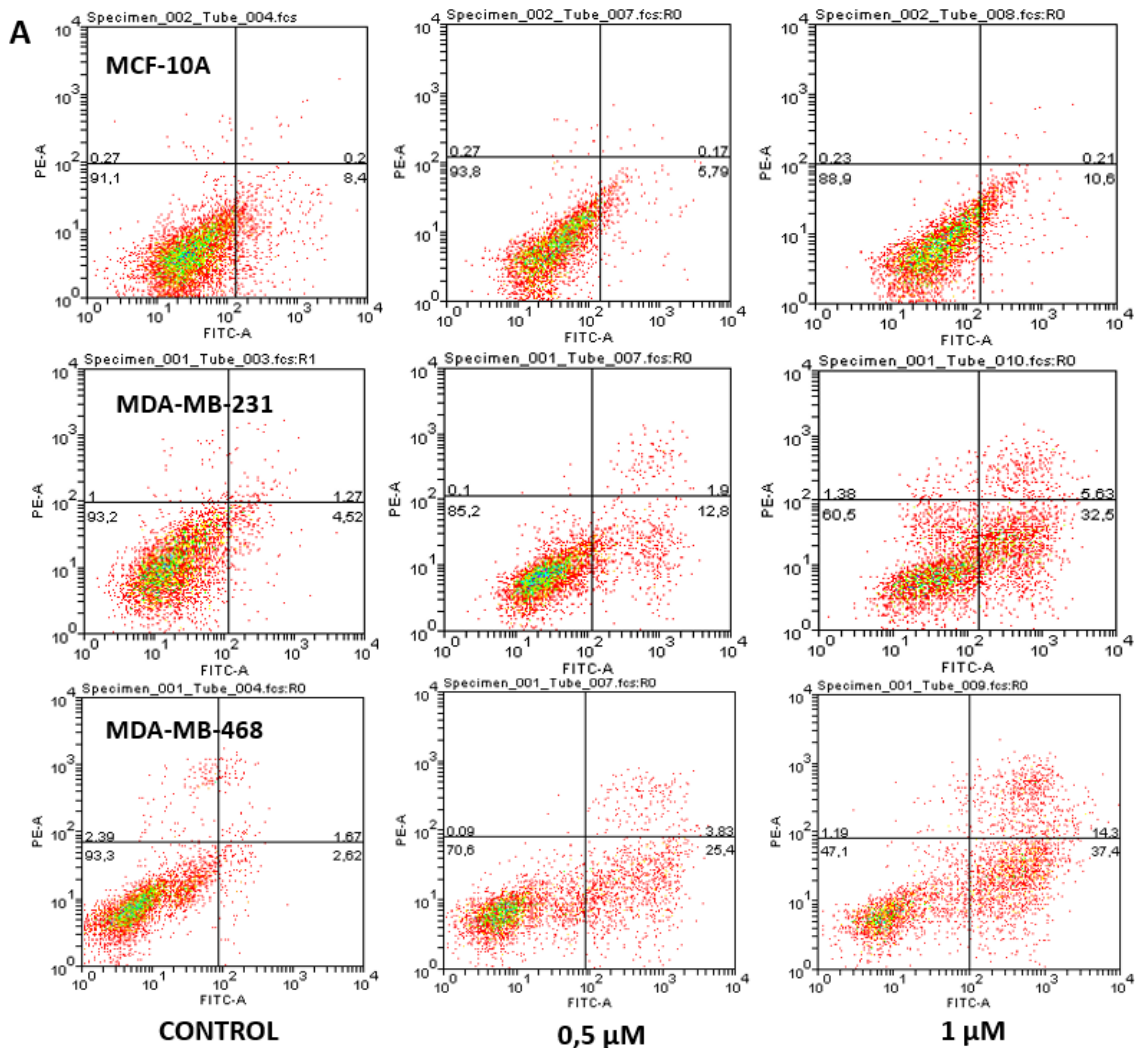


**Figura 5. El compuesto D<sub>4</sub> afecta selectivamente la distribución del ciclo celular de células tumorales MDA-MB-321 y MDA-MB-468, aumentando el peak sub-G1 y produciendo detención del ciclo celular en la fase G1.** A) Efecto de D<sub>4</sub> sobre el ciclo celular de células normales MCF10A. B) Efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre el ciclo celular células de cáncer de mama MDA-MB-468 y C) MDA-MB-231. Las células son cultivadas en placas de 12 pocillos a razón de 5x10<sup>4</sup> células por pocillo y procesadas para cuantificar cantidad de ADN mediante el uso de yoduro de propidio (PI) mediante FACS. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, n=3; \*=p< 0.05, \*\*=p < 0.01, \*\*\*=p < 0.001.

El aumento del peak de sub-G1, producido por el compuesto podría deberse a que una determinada población de células, estimuladas con el compuesto **D<sub>4</sub>**, están experimentando una muerte apoptótica tardía, ya que la porción sub-G1 representa a células con un contenido de DNA menor al de la población definida como G1<sup>39 40</sup>. Durante el proceso de muerte celular programada, la maquinaria celular se encarga de degradar el DNA, lo que podría corresponder a lo observado en los experimentos anteriores. De acuerdo a esto se decidió evaluar el efecto del compuesto **D<sub>4</sub>** sobre la muerte celular en los modelos celulares utilizados en el objetivo anterior; utilizando la técnica de cuantificación de la translocación de fosfatidil serina mediante el kit *anexinV-fitC abcam* (**figura 6**).



**Figura 6. El compuesto D<sub>4</sub> induce apoptosis en células de cáncer de mama MDA-MB-468, y MDA-MB-231; sin efectos significativos sobre células normales de mama MCF10A.** A) Cuantificación efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre la muerte celular en células MCF10A. B) Cuantificación de la apoptosis inducida por el compuesto D<sub>4</sub> en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y C) MDA-MB-468. Las células fueron expuestas a compuesto D<sub>4</sub> o DMSO (Control) por 48h. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, n=3; \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.



**Figura 7 A) Datos representativos del experimento de doble marcaje AnnexinV-fitC® versus PI abcam para 48hrs de estímulo con compuesto D4 en células normales y tumorales.** Las células son cultivadas en placas de 12 pocillos a razón de  $5 \times 10^4$  células por pocillo; una vez adheridas son estimuladas con compuesto D4 o DMSO por 48h y procesados usando FACS. Los resultados representan el resultado de un experimento, realizado en triplicado para su cuantificación; los dot-plots fueron generados usando Weassel®.

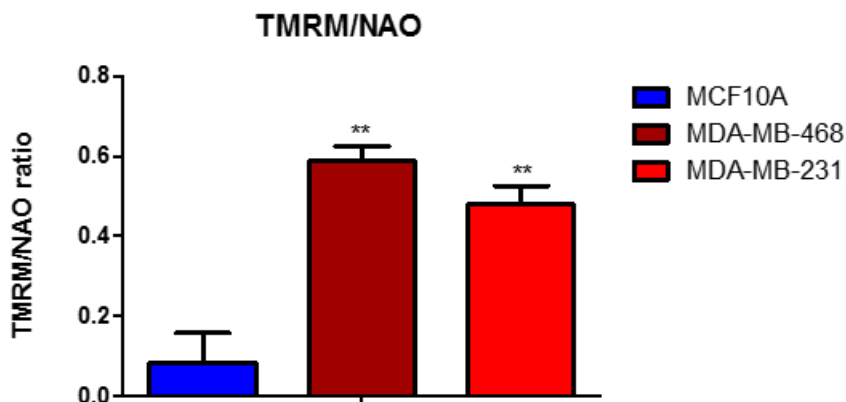
En resumen, podemos señalar que el efecto del compuesto **D<sub>4</sub>** sobre células de cáncer MDA-MB-231 y MDA-MB-468, tiene dos componentes la primera es la detención del ciclo celular en fase G1 lo cual impide que esas células sigan proliferando, y por otra parte una inducción de apoptosis. La existencia de ambos fenómenos en un estímulo de 48h, nos otorga una ventaja comparativa sobre compuestos que solo detienen el ciclo celular o solo tienen efecto citotóxico inespecífico.

Una explicación plausible de la selectividad observada, a las concentraciones estudiadas, puede deberse a una selectividad en la incorporación de la molécula en las células tumorales. Como ya se comentó en secciones anteriores la acumulación de compuestos de la familia de **D<sub>4</sub>**, depende del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), y este parámetro depende de muchos factores como: el tipo celular, el estado metabólico y el ciclo celular entre otros<sup>41,42</sup>. En publicaciones recientes se ha mostrado que algunas líneas celulares de cáncer con fenotipos más agresivos tienen potenciales  $\Delta\Psi_m$  más altos que sus contrapartes normales<sup>4,26,27</sup>.

Por lo tanto se procedió a hacer un experimento que nos permitiera evaluar y comparar las condiciones basales de  $\Delta\Psi_m$ , entre las líneas celulares elegidas para la evaluación biológica del compuesto. Así, se comparó la incorporación de tetrametilrodamina (TMRM), una sonda fluorescente que se incorpora en forma dependiente de  $\Delta\Psi_m$ , en las tres líneas celulares. Para descartar posibles diferencias producidas por la presencia de diferente masa mitocondrial entre las líneas celulares, se utilizó conjuntamente la sonda fluorescente NAO, la cual se une a las mitocondrias en una forma potencial-independiente (se une a las cardiolipinas de la membrana mitocondrial). Con esto descartamos el efecto masa teniendo una aproximación más certera de cuál de las líneas celulares posee un mayor  $\Delta\Psi_m$ .



A



**Figura 8. Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MDA-MB-468 tienen una razón TMRM/NAO más alta que las células normales MCF10A.** A) relación TMRM/NAO para las líneas celulares MCF10A, MDA-MB-468 y MDA-MB-231. Las células son sembradas en placas de 12 pocillos a razón de  $5 \times 10^4$  células por pocillo, al día siguiente se les incuban con una solución que contiene 5nM de TMRM y  $10 \mu\text{M}$  de NAO por 20 min se tripsinizan y se leen usando FACS. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes,  $n=3$ ;  $*=p < 0.05$ ,  $**=p < 0.01$ ,  $***=p < 0.001$ .

Ambas líneas celulares de cáncer poseen razones mayores de fluorescencia de TMRM/NAO, lo cual permite plantear que tienen un  $\Delta\Psi_m$  mayor, lo que les permite acumular más TMRM que sus contrapartes no tumorales. La acumulación de la sonda TMRM se relaciona con el potencial de membrana mitocondrial, en forma similar a la que lo hace **D<sub>4</sub>**, por lo tanto es posible que las células que acumulan mayor TMRM también incorporen mayor cantidad de compuesto **D<sub>4</sub>** con lo que podrían experimentar más fácilmente los efectos tóxicos del compuesto, explicando así la selectividad del compuesto.

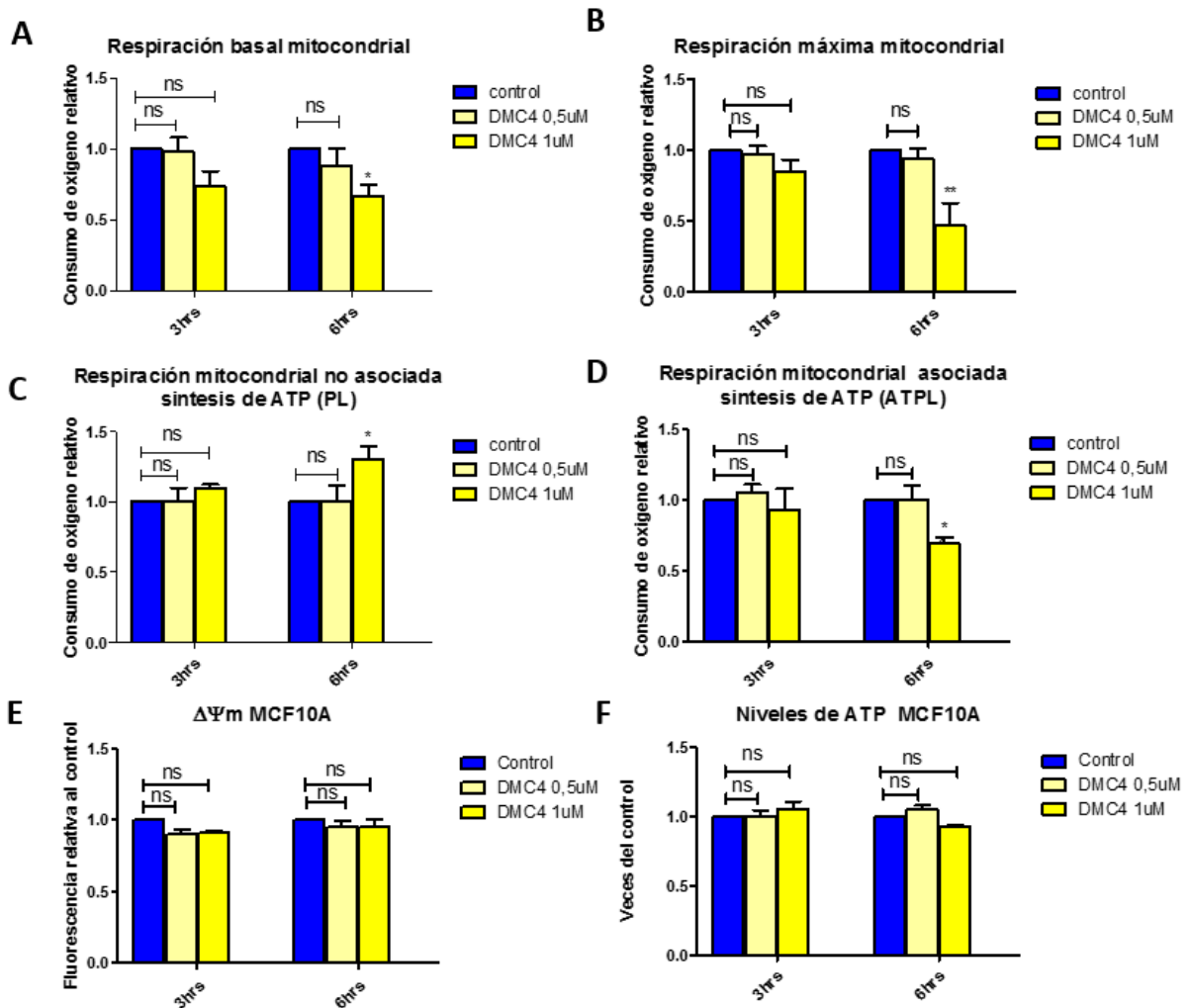
### 6.2.3 Caracterización del efecto de D<sub>4</sub> sobre la bioenergética celular.

El compuesto D<sub>4</sub> fue diseñado para acumularse en la mitocondria ya que posee el catión lipofílico trifenilfosfonio en su estructura. La acumulación del compuesto D<sub>4</sub> puede provocar alteraciones en parámetros bioenergéticos tales como la producción intracelular de ATP, el  $\Delta\Psi_m$ , la respiración celular y la tasa de acidificación extracelular. Con objeto de establecer si ocurren cambios significativos en estos parámetros se diseñaron experimentos de tiempos cortos de 3 y 6 horas que ofrecen una idea del efecto agudo de la incorporación del compuesto. Además los experimentos a 6 horas nos permiten tener una perspectiva temporal más amplia del efecto de D<sub>4</sub>.

Para los experimentos de medición del consumo de oxígeno se utilizó la tecnología SeaHorse™ de Agilent, con la cual se puede evaluar el efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre la respiración celular en presencia de determinados inhibidores, permite conocer los efectos sobre parámetros mitocondriales a través de la medición del consumo de oxígeno de un número determinado de células. La tecnología SeaHorse cuenta con la capacidad de hacer inyecciones en tiempo real; la primera inyección que se aplica a las muestras es oligomicina A, dicho compuesto inhibe la actividad de la ATP-Sintasa; proteína encargada de sintetizar el ATP a nivel mitocondrial. Producto de dicha inhibición se puede estimar que porcentaje del consumo de oxígeno está asociado a la síntesis de ATP, generándose el parámetro llamado ATPL (*ATP-linked-respiration*) y el parámetro PL (*Proton leak*) el cual nos da cuenta de la proporción de la respiración mitocondrial no asociada a la síntesis de ATP.

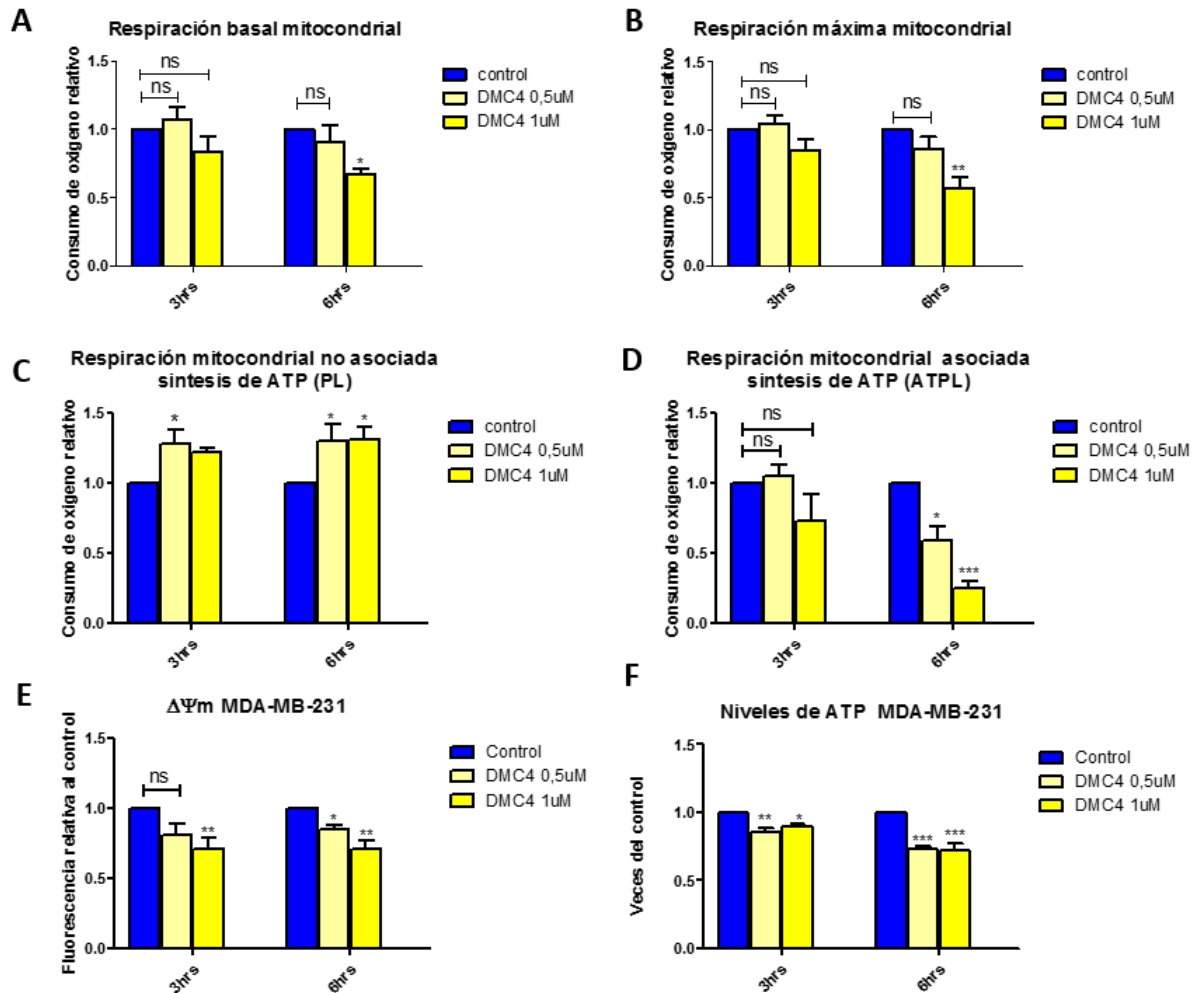
La segunda inyección que se aplica es FCCP un agente desacoplante de la fosforilación oxidativa el cual nos permite estimar el máximo consumo de oxígeno de cada muestra, generándose el parámetro *Maximal oxygen consumption rate*, que veremos expresado como respiración máxima mitocondrial.

Finalmente la tercera inyección consta de Antimicina A y Rotenona ambos potentes inhibidores de la actividad de la cadena transportadora de electrones a nivel mitocondrial, permitiéndonos evaluar la cuantía del consumo de oxígeno que es efectivamente mitocondrial, este dato es usado para normalizar cada medición.



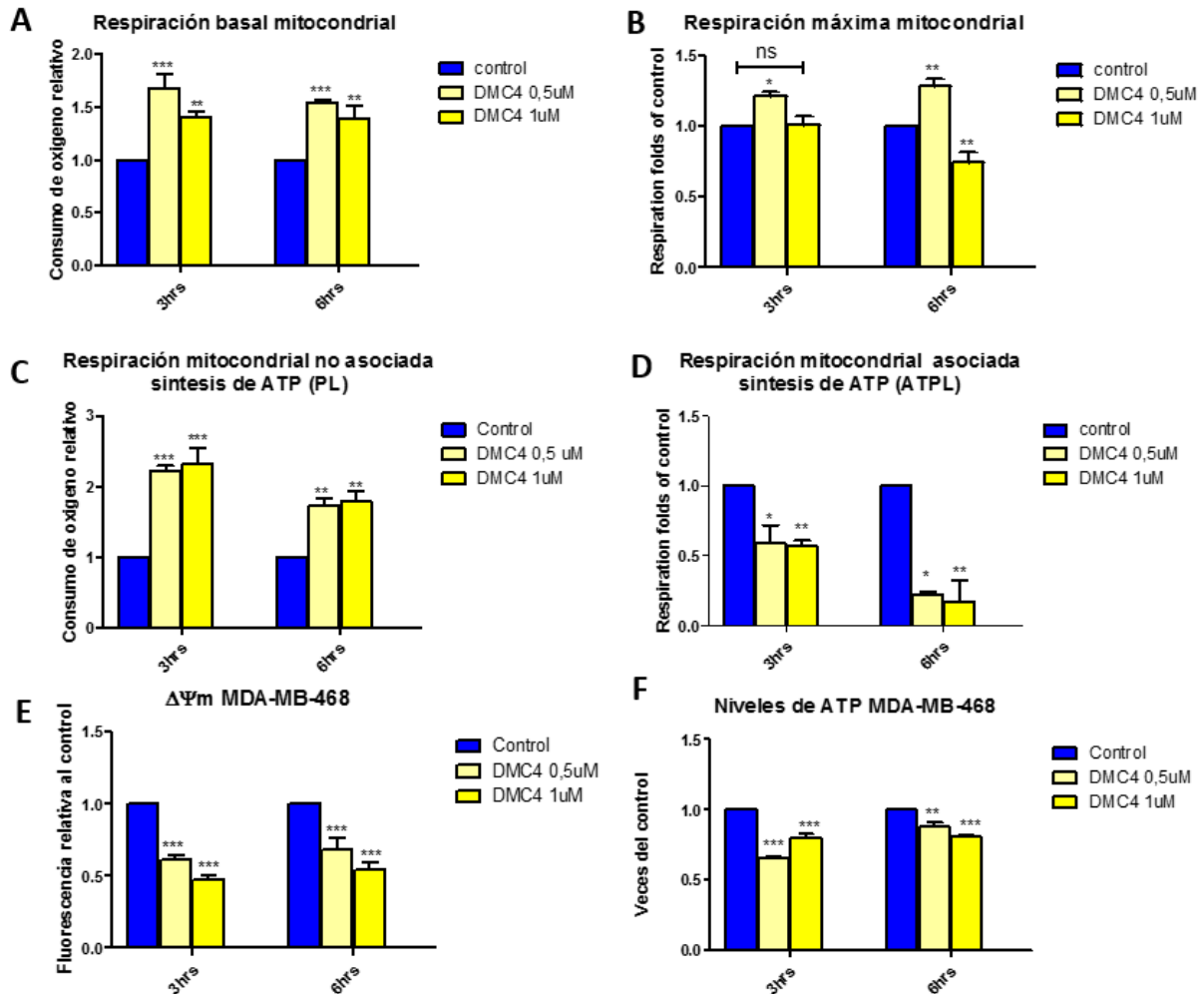
**Figura 9. El compuesto D<sub>4</sub> afecta la respiración asociada a la síntesis de ATP de células normales MCF10A, sin afectar los niveles de ATP intracelular ni el potencial de membrana mitocondrial  $\Delta\Psi_m$ . A), B), C) y D) Parámetros oxigráficos mito stress de Seahorse para estímulos de 6 y 3 horas con compuesto D<sub>4</sub> en células MCF10A. E) Efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre el la fluorescencia de TMRM en células MCF10A. F) Efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre**

los niveles intracelulares de ATP en células MCF10A. Las mediciones oxigráficas fueron realizadas usando Seahorse™; Los niveles de ATP intracelular fueron medidos en un luminómetro usando el kit luciferin-luciferase BIOSYNTH, el  $\Delta\Psi_m$  fue medido utilizando TMRM 5nM. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, n=3; \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ .



**Figura 10.** El compuesto D<sub>4</sub> aumenta el consumo de oxígeno no asociado a la síntesis de ATP y disminuye fuertemente el consumo de oxígeno asociado a la síntesis de ATP, afectando también los niveles intracelulares de ATP y el potencial de membrana mitocondrial  $\Delta\Psi_m$  en células MDA-MB-231. A), B), C) y D) Parámetros oxigráficos mito stress de Seahorse para estímulos de 6 y 3 horas con compuesto D<sub>4</sub> en células MDA-MB-231. E) Efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre el la fluorescencia de TMRM en células MDA-MB-231. F) Efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre los niveles intracelulares de ATP en células MDA-MB-231. Las mediciones oxigráficas

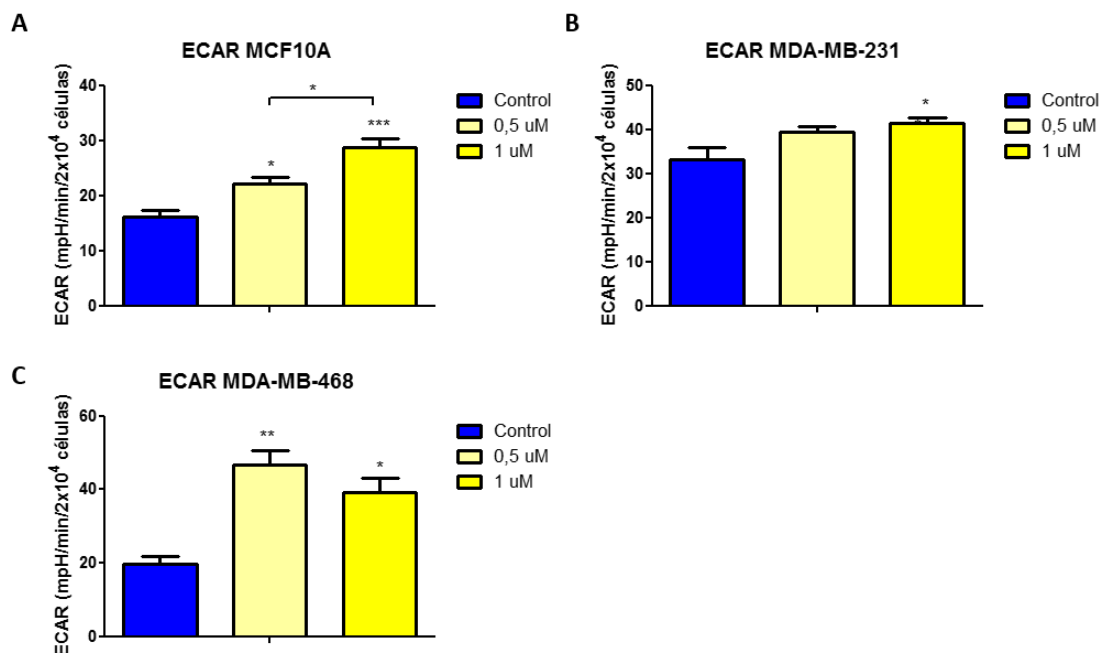
fueron realizadas usando SeaHorse™; Los niveles de ATP intracelular fueron medidos en un luminómetro usando el kit luciferin-luciferase BIOSYNTH, el  $\Delta\Psi_m$  fue medido utilizando TMRM 5nM. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, n=3; \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ .



**Figura 11. El compuesto D<sub>4</sub> aumenta el consumo de oxígeno no asociado a la síntesis de ATP y disminuye fuertemente el consumo de oxígeno asociado a la síntesis de ATP, afectando también los niveles intracelulares de ATP y el potencial de membrana mitocondrial  $\Delta\Psi_m$  en células MDA-MB-468.** A), B), C) y D) Parámetros oxigráficos mito stress de Seahorse para estímulos de 6 y 3 horas con el compuesto D<sub>4</sub> en células MDA-MB-468. E) Efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre la fluorescencia de TMRM en células MDA-MB-468. F) Efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre los niveles intracelulares de ATP en células MDA-MB-468. Las mediciones oxigráficas fueron realizadas usando SeaHorse™; Los niveles de ATP intracelular fueron medidos en un luminómetro usando el kit luciferin-luciferase BIOSYNTH, el  $\Delta\Psi_m$  fue medido utilizando TMRM 5nM. Los resultados representan el

promedio de tres experimentos independientes, n=3; \*=p< 0.05, \*\*=p < 0.01, \*\*\*=p < 0.001.

Como se observó en los puntos anteriores el compuesto **D<sub>4</sub>** afecta en diferentes proporciones, la respiración asociada a la síntesis de ATP en las tres líneas celulares estudiadas (**figuras 9, 10 y 11**), este hecho por si solo constituye una condición de estrés sobre la bioenergética celular, en el caso de las células MCF10A estas son capaces de compensar este efecto ya que sus niveles intracelulares de ATP no caen, no así en las líneas tumorales que experimentan caídas en sus niveles intracelulares de ATP. El mecanismo más plausible para esta compensación es la obtención de ATP a través de la glicolisis<sup>43</sup>, la utilización de la glicolisis conlleva a una acidificación mayor del medio extracelular producto de la generación de lactato; la tecnología Seahorse nos permite también evaluar este cambio como se muestra en la siguiente figura.



**Figura 12. El compuesto D<sub>4</sub> aumenta la tasa de acidificación (ECAR) del medio extracelular en células MCF10A, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, a tiempo de 6 horas.** A), B) y C) ECAR a 6 horas, para cada línea celular, MCF10A, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 respectivamente. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, n=3; \*=p < 0.05, \*\*=p < 0.01, \*\*\*=p < 0.001.

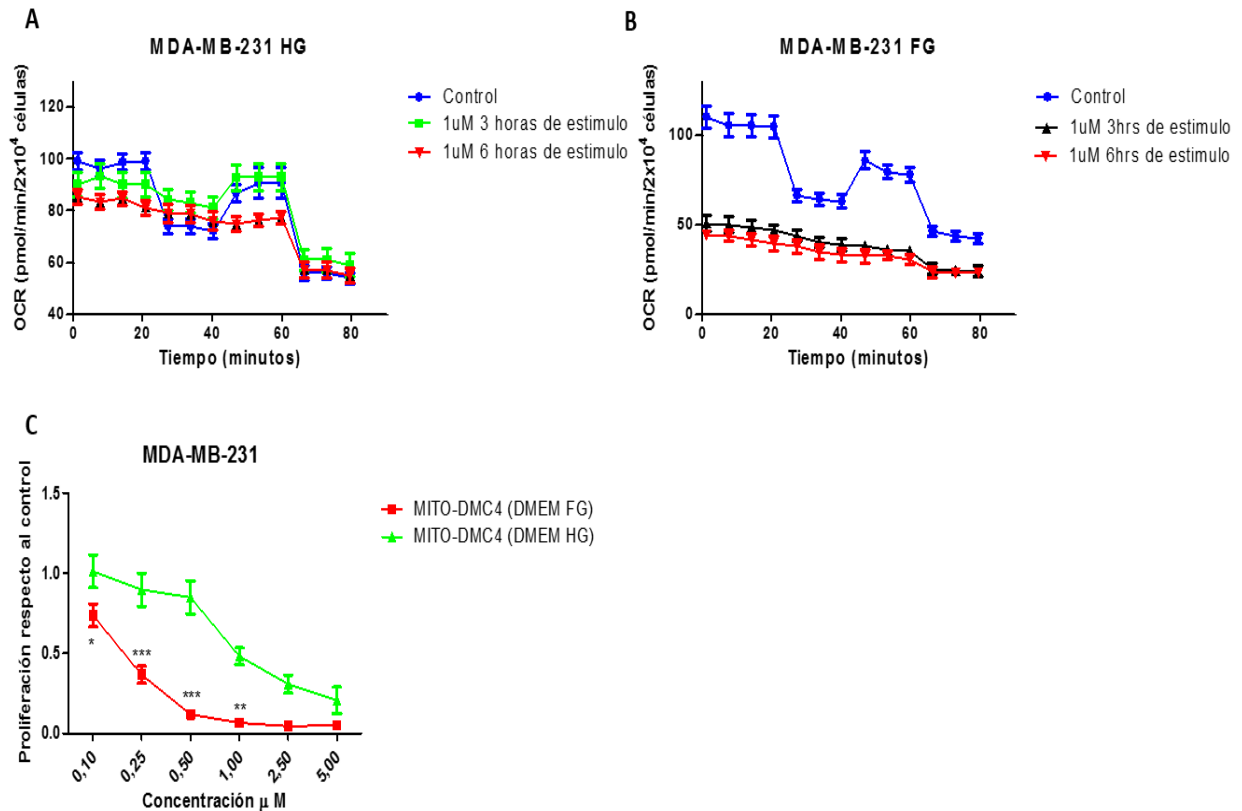
Con los últimos resultados expuestos es posible pensar que el efecto del compuesto **D<sub>4</sub>** sobre la proliferación de células tumorales puede deberse a la crisis bioenergética que estas experimentan posterior al estímulo con **D<sub>4</sub>** y a la imposibilidad de compensarla totalmente.

Las células de cáncer mamario humano MDA-MB-231 pueden ser reprogramadas metabólicamente según la disponibilidad de sustratos, obteniendo células que pueden ser cultivadas en condiciones en las que solo utilizan glutamina como soporte bioenergético para su proliferación en un medio libre de glucosa, lo cual implica que la obtención de ATP en estas condiciones es totalmente mitocondrial. En condiciones regulares de cultivo, el compuesto **D<sub>4</sub>** afecta la respiración asociada a la síntesis de ATP y baja el consumo basal de oxígeno, según los datos expuestos anteriormente (**figura 10**); si reprogramamos las células MDA-MB-231 a un metabolismo

completamente oxidativo deberíamos ver un efecto exacerbado del compuesto **D<sub>4</sub>**, sobre la respiración asociada a la síntesis de ATP, lo cual implicaría un déficit instantáneo de ATP ya que en medio libre de glucosa y con glutamina como único soporte para la proliferación no es posible un aumento en la obtención glicolítica de ATP. Por estas razones se decidió evaluar el efecto de **D<sub>4</sub>** en la respiración celular de células MDA-MB-231 deprivadas de glucosa, y además evaluar el efecto del compuesto **D<sub>4</sub>** sobre la proliferación de las células cultivadas en las condiciones antes señaladas.

Como se esperaba el efecto del compuesto **D<sub>4</sub>** en células MDA-MB-231 cultivadas en un medio libre de glucosa en presencia de glutamina como único soporte para la proliferación, es mucho más potente y prácticamente suprime la respiración asociada a la síntesis de ATP, además acentúa la caída de la respiración basal mitocondrial en todos los tiempos probados; del mismo modo el efecto del compuesto sobre la proliferación de células MDA-MB-231 se hace mayor (**figura 13**).





**Figura 13** La reprogramación metabólica hacia la OXPHOS acentúa el efecto del compuesto D<sub>4</sub> sobre la respiración celular y acentúa también el efecto sobre la proliferación de células MDA-MB-231. A) curvas representativas de Mito stress de Seahorse para células MDA-MB-231 crecidas en medio DMEM alta glucosa B) curvas representativas de Mito stress de Seahorse para células MDA-MB-231 crecidas en medio DMEM sin glucosa utilizando glutamina como único sustrato para generar ATP. C) Curvas de proliferación para el compuesto D<sub>4</sub> utilizando medio de cultivo con alta glucosa (HG) y deprivado glucosa (FG). Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, n=3; \*=p < 0.05, \*\*=p < 0.01, \*\*\*=p < 0.001.

## 7 Discusión.

De la serie de compuestos sintetizados, los derivados con cadenas alquílicas largas afectan por igual la proliferación de células normales y tumorales a diferencia del derivado con cadena alquílica corta **D<sub>4</sub>** que presenta selectividad en su efecto, por su parte el derivado **D<sub>1</sub>** también de cadena corta presenta IC<sub>50</sub> mayores en todas las líneas celulares estudiadas, este dato va en línea con lo descrito sobre la gravedad del impacto funcional en la bioenergética celular producido por las cadenas alquílicas unidas al catión lipofílico trifenilfosfónio. La comparación de alquil-TPP<sup>+</sup>, de largos de cadenas variados, muestra que los derivados con cadenas más largas tienen un impacto funcional más marcado sobre la mitocondria; un gran impacto funcional sobre la mitocondria puede ser correlacionado con una mayor toxicidad<sup>11,12</sup>.

Posterior al tamizaje de los compuestos de la serie en función de su índice de selectividad nos encontramos con que el compuesto **D<sub>4</sub>** produce arresto de ciclo celular en fase G1 en ambas líneas tumorales.

Hay reportes que sostienen la teoría de que la fase G1 del ciclo celular está caracterizada por un predominio bioenergético de la glicolisis por sobre la OXPHOS<sup>44</sup>, si ligamos esto con los resultados posteriores donde se muestra el efecto del compuesto sobre parámetros funcionales mitocondriales como la respiración asociada a la síntesis de ATP, caída del ATP intracelular y a su vez también caída en el  $\Delta\Psi_m$  para ambas líneas celulares, resulta muy razonable que las células que sobreviven al compuesto **D<sub>4</sub>** estén detenidas en la etapa del ciclo celular con menos demanda bioenergética oxidativa.

Está descrito también, que la transición de la fase G1 del ciclo celular está caracterizada por cambios mitocondriales tendientes a favorecer una mayor producción de ATP y solventar el costo bioenergético de las fases siguientes del ciclo celular y propiciando el ensamblaje de Ciclina E, proteína clave en la transición de G1-S<sup>41,45,46</sup>. El mecanismo más canónico de detención de ciclo celular en fase G1 está asociado a la caída de los niveles de ATP con el

consiguiente aumento de AMP lo que provoca la activación de la enzima AMPK, la cual en su rol de quinasa es capaz de fosforilar a p53 siendo este último uno de los efectores encargados de propiciar la degradación de la Ciclina E<sup>45,47 48</sup> y con esto la detención del ciclo celular en fase G1. Este mecanismo canónico no sería el apropiado para explicar el efecto del compuesto **D4** sobre el ciclo celular ya que las dos líneas celulares que mostraron arresto de ciclo en fase G1 tienen la peculiaridad de ser mutantes para p53, y para estos casos está descrito que p53 comienza a cumplir otras funciones no necesariamente relacionadas con las que tiene en células con fenotipo silvestre para dicha proteína<sup>49</sup>.

Hay diversos artículos en los que se ha descrito detención de ciclo en G1, como por ejemplo, con la molécula timoquinona, que es la molécula activa predominante en la planta *Nigella Sativa*, este compuesto produce arresto de ciclo celular en la fase G1 y un aumento del peak sub g1 en células T47D y MDA-MB-468 p53 mutadas. El mecanismo pareciera estar asociado a una reducción de la expresión de Ciclina E, Ciclina D1, y una caída paulatina del  $\Delta\Psi_m$ , siendo posible revertir estos efectos con el aumento de la expresión de AKT, lo cual sugiere que el efecto inhibitorio de la timoquinona sobre la señalización de AKT sería el causante de la detención del ciclo y de la muerte celular<sup>50</sup>.

Para seguir ejemplificando, Cefacromina un compuesto extraído de hongos, también produce detención del ciclo celular en fase G1, además de apoptosis, producto de una disfunción mitocondrial, conducente a la disminución de la expresión de ciclinas en células de cáncer de pulmón A549 las cuales poseen p53 silvestre<sup>51</sup>.

Por otra parte la molécula Mahanina, un alcaloide de núcleo indólico, produce arresto de ciclo en G1 por medio de la inhibición del complejo 3 a nivel de la mitocondria y daño oxidativo al DNA mitocondrial, reduciendo la expresión de diversas ciclinas reguladoras del ciclo celular en células p53 silvestres U87MG de glioblastoma y células p53 mutantes LN229 también de glioblastoma <sup>52</sup>.

Siguiendo la misma línea la droga NS-398 un inhibidor selectivo de la COX II, una proteína mitocondrial que forma parte del complejo IV a nivel de la mitocondria también produce detención de ciclo celular en fase G1 en células OVCAR-3 de cáncer ovárico humano las cuales son p53 mutantes<sup>53</sup>. Este mismo patrón de drogas que alteran la función mitocondrial y detienen el ciclo celular en G1 es seguido por muchas moléculas y en diversos modelos celulares, independiente del estatus de p53 de dichas células<sup>54-60</sup> Lo cual nos da la idea de que la detención de ciclo producida por el compuesto **D4**, podría tener relación de causalidad con el deterioro funcional de la mitocondria en las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468.

La selectividad del compuesto **D4** fue apreciada a todos niveles del trabajo desde los ensayos de proliferación (**figura 3**), los experimentos de ciclo celular donde no hay cambios significativos en la distribución del ciclo celular en las células normales MCF10A (**figura 5**), los experimentos de muerte celular en donde no hay inducción significativa de apoptosis en células MCF10A (**figuras 6 y 7**) y también en los experimentos de función mitocondrial donde no hay impacto del compuesto **D4** en el  $\Delta\Psi_m$ , o en los niveles intracelulares de ATP (**Figura 9**) y un impacto mucho menor en las mediciones oxigráficas. Una de las posibles explicaciones a la selectividad de **D4** dice relación con que las células de cáncer exhibirían cambios en cuanto a su potencial de membrana plasmática y a su potencial de membrana mitocondrial, siendo las células de cáncer más negativas que sus contrapartes normales, pudiendo estar más expuestas a la acumulación de cationes lipofílicos<sup>16,28</sup>. Similar al compuesto **D4**, recientemente fue publicado un artículo que sostiene que las células de cáncer mamario triple negativas tienen una masa mitocondrial aumentada y un potencial de membrana aumentado respecto a las no triple negativas<sup>26</sup>. Además se ha reportado la comparación de tres líneas celulares de cáncer de próstata versus una línea de epitelio prostático normal, caracterizándose cuantitativamente el  $\Delta\Psi_m$  y se concluye que en las tres líneas celulares tumorales hay en promedio 30mV más que en el control normal<sup>4</sup>. Estos datos soportan la idea de que las células de cáncer se encuentran mitocondrialmente

hiperpolarizadas respecto a las tumorales y que incluso existen diferencias en el potencial de membrana entre distintos fenotipos tumorales. En el contexto de esta investigación, para poner a prueba esta premisa se realizó el experimento de doble marcaje de TMRM/NAO (**figura 8**), donde ambas líneas celulares de cáncer presentaron razones TMRM/NAO más altas lo que podría representar un  $\Delta\Psi_m$  más alto y explicaría la selectividad en función de una posible mayor acumulación.

En el caso de las mediciones oxigráficas para células MCF10A (**figura 9**) utilizando Seahorse, se observan algunos cambios funcionales como una reducción de la capacidad máxima respiratoria y una baja de casi un 30% en la respiración acoplada a la síntesis de ATP, sin embargo estos cambios no parecieren tener mayor gravedad porque a los mismos tiempos de estímulo no se aprecian cambios significativos en los niveles de ATP intracelular, ni tampoco en el  $\Delta\Psi_m$ ; al evaluar tiempos de exposición crónicos 48 horas, tampoco se está deteniendo el ciclo celular, ni produciendo muerte celular, lo cual significa el efecto del compuesto **D4** a las concentraciones estudiadas está siendo eficientemente compensado.

En el caso de las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468, los cambios funcionales son más drásticos; en ambas líneas tumorales hay un marcado aumento de la respiración no asociada a la síntesis de ATP y un gran descenso en la respiración asociada a la síntesis de ATP, esto puede estar ocurriendo por varios mecanismos conocidos, mediados por proteínas como la ANT o las proteínas desacoplantes, o puede ser que el efecto esté dado por la estructura de la molécula la cual podría transportar protones hacia el interior de la mitocondria, tal como protonóforos conocidos como FCCP, por ejemplo. Pero lo más documentado es que este tipo de moléculas por su alta afinidad por las membranas y su acumulación mitocondrial podrían estar aumentando la conductancia de protones de la membrana mitocondrial, y provocando que la respiración sea en su mayoría para restituir el  $\Delta\Psi$  mitocondrial<sup>12,61</sup>.

En el caso de las células de MDA-MB-468, el compuesto **D<sub>4</sub>** tiene un comportamiento de desacoplante canónico, con un aumento de la respiración basal mitocondrial, marcados aumentos en la respiración no asociada a la síntesis de ATP, una brusca caída en la respiración asociada a la síntesis de ATP, todo acompañado de caída en el potencial de membrana mitocondrial y además baja los niveles de ATP (**figura 11**). Lo único inusual del efecto del compuesto en esta línea celular es que es la única en que hay aumentos significativos en la respiración máxima mitocondrial a concentración de 0,5µM a 3 y 6 horas; en cambio a concentración de 1µM el efecto se ciñe al comportamiento apreciado en las otras líneas celulares con una baja significativa en la respiración máxima mitocondrial. Una posible explicación a este fenómeno fue dada por el grupo de Skulachev, donde se describe que los cationes penetrantes como el compuesto **D<sub>4</sub>** pueden potenciar el efecto de protonóforos aniónicos como FCCP, CCCP o DNP, probablemente por formar complejos relacionados con la complementariedad de cargas y con eso favorecer el paso por las membranas; aumentando con esto el efecto del anión<sup>62</sup>.

En las tres líneas celulares, pese a la diferencia en la cuantía del efecto se observan caídas en la respiración máxima mitocondrial a concentración de 1µM (**figuras 9, 10 y 11**), esto puede deberse principalmente a dos fenómenos, el primero puede ser un agotamiento de sustratos oxidables como NADH, debido a la actividad de la cadena transportadora de electrones para compensar la caída en el potencial de membrana que está ocurriendo a ese tiempo en las líneas tumorales o también podría deberse a un efecto inhibitorio sobre la actividad de los complejos que ya ha sido reportado para cadenas más largas de este tipo de moléculas<sup>12</sup>. También aunque con menos relación estructural con **D<sub>4</sub>**, se han reportado efectos sobre el ciclo de Krebs de la molécula de la molécula metil-trifenilfosfónio la cual fue caracterizada como inhibidora de la enzima OGDH, y claramente cualquier efecto inhibitorio sobre el ciclo de Krebs podría crear un déficit de NADH, y generar la caída en la respiración máxima mitocondrial<sup>14</sup>.

En relación al efecto de **D<sub>4</sub>** sobre la mitocondria, este podría ser clasificado como un desacoplante de la OXPHOS, ya que aumenta la respiración no asociada a la síntesis de ATP, disminuye la respiración asociada a la síntesis de ATP, hace caer el potencial de membrana, y disminuye significativamente los niveles de ATP intracelular, pero este efecto desacoplante no es comparable al de otros agentes desacoplantes canónicos como FCCP o dinitrofenol, ya que el efecto desacoplante de **D<sub>4</sub>** pareciera manifestarse en lapsos de tiempo del orden de horas, y no instantáneamente como en el caso de las moléculas más conocidas, recientemente se ha introducido el término de “*mild uncoupler*” en la literatura<sup>63</sup>, pudiendo el compuesto **D<sub>4</sub>** ser parte de esta categoría, por este hecho existirían también otros usos farmacológicos posibles de explorar para este compuesto, ya que para este tipo de moléculas se han descrito efectos neuroprotectores como en el caso de los derivados de cadena corta de Rodamina 19 <sup>64</sup>, también se ha descrito utilidad para este tipo de compuestos en el área del envejecimiento ya que el efecto desacoplante podría estar imitando farmacológicamente una condición de restricción calórica, y dicha condición ha mostrado tener efecto sobre la longevidad en variados modelos de estudio <sup>65,66</sup>

## 8 Conclusiones.

1. La síntesis de derivados de acilhidroquinonas por reordenamiento de Fies, puede ser optimizada utilizando calentamiento asistido por radiación de microondas; consiguiendo mejores tiempos de reacción.
2. La sustitución nucleofílica de formación de las sales de fosfónio puede ser optimizada con el uso de calentamiento asistido por radiación de microondas consiguiéndose mejores tiempos de reacción.
3. De los compuestos sintetizados el compuesto **D<sub>4</sub>** posee la mejor actividad biológica de la serie en función de la selectividad de su efecto antiproliferativo contra ambas líneas de cáncer triple negativas evaluadas

4. La crisis bioenergética producida por **D<sub>4</sub>** podría ser la causa de su efecto antiproliferativo en células tumorales.
5. El efecto del compuesto **D<sub>4</sub>** sobre los parámetros bioenergéticos estudiados permite clasificarlo como un desacoplante no canónico de la OXPHOS.

## 9 Proyecciones.

El conocimiento generado en esta investigación permitió obtener el compuesto **D<sub>4</sub>** el cual es un promisorio compuesto con propiedades anticancer que puede ser estudiado en modelos *in vivo* de cáncer para seguir validando su utilidad.

Por otra parte, los datos generados sobre el impacto funcional del compuesto **D<sub>4</sub>** en la mitocondria pueden ser usados para comprender mejor los efectos tóxicos de moléculas estructuralmente relacionadas.

El mecanismo de acción a nivel mitocondrial (el efecto desacoplante de la OXPHOS) del compuesto **D<sub>4</sub>** y su margen de selectividad podría ser de interés para explorar otros efectos, especialmente en envejecimiento.



## 10 Bibliografía

1. Itriago, L., Silva, N. & Cortés, G. Cáncer en Chile y el mundo: una mirada epidemiológica, presente y futuro. *Rev. Médica Clínicas Las Condes* **24**, 531–552 (2013).
2. Weinberg, F. & Chandel, N. S. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3663–3673 (2009).
3. Porporato, P. *et al.* A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep.* (2013). doi:10.1016/j.celrep.2014.06.043
4. Panov, A. & Orynbayeva, Z. Bioenergetic and Antiapoptotic Properties of Mitochondria from Cultured Human Prostate Cancer Cell Lines PC-3, DU145 and LNCaP. *PLoS One* **8**, 22–24 (2013).
5. Srinivasan, S., Guha, M., Kashina, A. & Avadhani, N. G. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1–13 (2017). doi:10.1016/j.bbabbio.2017.01.004
6. Murphy, M. P. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1777**, 1028–1031 (2008).
7. Ross, M. F. *et al.* Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochem.* **70**, 222–230 (2005).
8. Madak, J. T. & Neamati, N. Membrane Permeable Lipophilic Cations as Mitochondrial Directing Groups. *Curr. Top. Med. Chem.* **15**, 745–766 (2015).
9. Porteous, C. M. *et al.* Rapid uptake of lipophilic triphenylphosphonium cations by mitochondria in vivo following intravenous injection: Implications for mitochondria-specific therapies and probes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1800**, 1009–1017 (2010).
10. Asin-Cayuela, J., Manas, A. R. B., James, A. M., Smith, R. a J. & Murphy, M. P. Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant. *FEBS Lett.* **571**, 9–16 (2004).
11. Reily, C. *et al.* Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics. *Redox Biol.* **1**, 86–93 (2013).
12. Trnka, J., Elkalaf, M. & Andě, M. Lipophilic triphenylphosphonium cations inhibit mitochondrial electron transport chain and induce mitochondrial proton leak. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).

13. Leo, S., Szabadkai, G. & Rizzuto, R. The mitochondrial antioxidants MitoE2 and MitoQ increase mitochondrial Ca load upon cell stimulation by inhibiting Ca efflux from the organelle. *Ann N Y Acad Sci* **1147**, 264–274 (2008).
14. Elkalaf, M., Tuma, P., Weiszenstein, M., Polák, J. & Trnka, J. Mitochondrial Probe Methyltriphenylphosphonium (TPMP) Inhibits the Krebs Cycle Enzyme 2- Oxoglutarate Dehydrogenase. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
15. Tsarev, D. A., Zverev, R. S., Kazmina, E. M., Tashlitsky, V. N. & Skulachev, V. P. EVALUATING THE STABILITY OF A CATIONIC PLASTOQUINONE DERIVATIVE ( PDTP ) IN VISOMITIN EYE DROPS. **47**, 219–224 (2013).
16. Modica-Napolitano, J. S. & Aprille, J. R. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**, 63–70 (2001).
17. Millard, M., Gallagher, J. D., Olenyuk, B. Z. & Neamati, N. A selective mitochondrial-targeted chlorambucil with remarkable cytotoxicity in breast and pancreatic cancers. *J. Med. Chem.* **56**, 9170–9179 (2013).
18. Cheng, G. *et al.* Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death. *BMC Cancer* **13**, 285 (2013).
19. Starenki, D. & Park, J. I. Mitochondria-targeted nitroxide, Mito-CP, suppresses medullary thyroid carcinoma cell survival in vitro and in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1529–1540 (2013).
20. Rohlena, J. *et al.* Mitochondrially targeted  $\alpha$ -tocopheryl succinate is antiangiogenic: potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 2923–35 (2011).
21. Vakili, M. R., Abyaneh, H. S., Molavi, O., Lai, R. & Lavasanifar, A. Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435 / DOX cells Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435 / DOX. (2014).
22. Biasutto, L. *et al.* Development of mitochondria-targeted derivatives of resveratrol. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 5594–5597 (2008).

23. Sassi, N. *et al.* Cytotoxicity of a mitochondriotropic quercetin derivative: Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1817**, 1095–1106 (2012).
24. Mattarei, A. *et al.* A mitochondriotropic derivative of quercetin: a strategy to increase the effectiveness of polyphenols. *Chembiochem* **9**, 2633–42 (2008).
25. Sassi, N. *et al.* Mitochondria-Targeted Resveratrol Derivatives Act As Cytotoxic Pro-Oxidants. *Curr. pharm Des.* Epub ahead of print (2013). doi:10.2174/13816128113199990034
26. Pelicano, H. *et al.* Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Res.* **16**, 434 (2014).
27. Lee, D. G. *et al.* The repopulating cancer cells in melanoma are characterized by increased mitochondrial membrane potential. *Cancer Lett.* **382**, 186–194 (2016).
28. Yang, M. & Brackenbury, W. J. Membrane potential and cancer progression. *Front. Physiol.* **4**, 1–10 (2013).
29. Kathryn, J. C., Sireesha V, G. & Stanley, L. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis* **32**, 35–48 (2012).
30. Nelly Fosu-Mensah, Maria sanchez, hoi ping, Jung Cai, A. W. Advances in small-molecule drug discovery for triple-negative breast cancer. *Future Med. Chem.* **7**, 2019–2039 (2015).
31. Olea-azar, C., Cavieres, C., Norambuena, E. & Rodri, J. Antioxidant properties and free radical-scavenging reactivity of a family of hydroxynaphthalenones and dihydroxyanthracenones. *Bioorganic Med. Chem.* **15**, 7058–7065 (2007).
32. Jaquelin Fuentes, R. araya. SÍNTESIS DE SALES DE FOSFONIO, DE ACILHIDROQUINONAS, INHIBIDORAS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR. *Mem. titulo, Univ. Chile* (2014).
33. Urra, F. A. *et al.* Small structural changes on a hydroquinone scaffold determine the complex I inhibition or uncoupling of tumoral oxidative phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **291**, 46–57 (2016).
34. Pelle Lidstrom, Jason Tierney, Bernard Wathey, J. W. Microwave assisted organic synthesis-a review. *Tetrahedron* **57**, 9225–9283 (2001).

35. Iwanek, W., Stefańska, K., Szumna, A. & Wierzbicki, M. Synthesis of resorcinarene phosphonium salts and the effect of counteranion on their structure. *Tetrahedron* **72**, 142–147 (2016).
36. Zeng, H. *et al.* Synthesis and evaluation of [18F]-fluoromethyl triphenylphosphonium cation as a novel mitochondria-specific positron emission tomography tracer. *Eur. J. Med. Chem.* **118**, 90–97 (2016).
37. Jameson, V. J. a *et al.* Synthesis of triphenylphosphonium Vitamin E derivatives as mitochondria-targeted antioxidants. *Tetrahedron* **71**, 8444–8453 (2015).
38. Urra, F. A. *et al.* An ortho -carbonyl substituted hydroquinone derivative is an anticancer agent that acts by inhibiting mitochondrial bioenergetics and by inducing G<sub>2</sub> / M-phase arrest in mammary adenocarcinoma TA3. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **267**, 218–227 (2013).
39. Kajstrura Malgorzata, H. Dorota Halicka, Juliusz Pryjma, Z. D. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by Discrete 'sub-G1' Peaks on DNA content Histograms. *J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **71**, 125–131 (2007).
40. O. Tounekti, J. Belehradec, L. M. M. Relationships between DNA Fragmentation, Chromatin Condensation, and Changes in Flow Cytometry Profiles Detected during Apoptosis.pdf. *Exp. Cell Res.* **217**, 506–516 (1995).
41. Schieke, S. M., McCoy, J. P. & Finkel, T. Coordination of mitochondrial bioenergetics with G<sub>1</sub> phase cell cycle progression. *Cell Cycle* **7**, 1782–1787 (2008).
42. Lee, I. H. & Finkel, T. Metabolic regulation of the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 724–729 (2013).
43. Hao, W., Chang, C. P. B., Tsao, C. C. & Xu, J. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *J. Biol. Chem.* **285**, 12647–12654 (2010).
44. Moreira, V. *et al.* Cell cycle progression is regulated by intertwined redox oscillators. *Theor. Biol. Med. Model.* 1–14 (2015). doi:10.1186/s12976-015-0005-2
45. Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G. & Lippincott-Schwartz, J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G<sub>1</sub>-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11960–5 (2009).

46. Martínez-Diez, M., Santamaría, G., Ortega, Á. D. & Cuezva, J. M. Biogenesis and dynamic of mitochondria during the cell cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS One* **1**, 1–12 (2006).
47. Mandal, S., Freije, W. a., Guptan, P. & Banerjee, U. Metabolic control of G1-S transition: Cyclin E degradation by p53-induced activation of the ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Biol.* **188**, 473–479 (2010).
48. Mandal, S., Guptan, P., Owusu-ansah, E. & Banerjee, U. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle Progression during Development as Revealed by the tenured Mutation in Drosophila. *Dev. Cell* **9**, 843–854 (2005).
49. Muller, P. a J. & Vousden, K. H. P53 Mutations in Cancer. *Nat Cell Biol* **15**, 2–8 (2013).
50. Rajput, S. *et al.* Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci.* **93**, 783–790 (2013).
51. Che-jen Hsiao, George Hsiao, Wei-Lin Chen, Shih-wei Wang, Chung Ping, li Ya Liu, C.-L. C. Cephalochromin Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by In fl icting Mitochondrial Disruption. *J. Nat. Prod.* **77**, 758–765 (2014).
52. Bhattacharya, K., Bag, A. K., Tripathi, R., Samanta, S. K. & Pal, B. C. Mahanine , a novel mitochondrial complex-III inhibitor induces G0 / G1 arrest through redox alteration-mediated DNA damage response and regresses glioblastoma multiforme. *Am. J. Cancer Res.* **4**, 629–647 (2014).
53. Denkert, C. *et al.* Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. *Oncogene* **22**, 8653–8661 (2003).
54. Liu, J.-D. *et al.* Molecular mechanisms of G0/G1 cell-cycle arrest and apoptosis induced by terfenadine in human cancer cells. *Mol. Carcinog.* **37**, 39–50 (2003).
55. Chen, R. *et al.* Ketoconazole Induces G0 / G1 Arrest in Human Colorectal and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**, 132–141 (2000).
56. Li, H. *et al.* Oleanolic acid induces mitochondrial-dependent apoptosis and G0 / G1 phase arrest in gallbladder cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, 3017–3030 (2015).

57. Weidner, C. *et al.* Amorfrutin C Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation in Colon Cancer Cells through Targeting Mitochondria. *J. Nat. Prod.* **79**, 2–12 (2016).
58. Ding, D., Guo, Y. R., Wu, R. L., Qi, W. Y. & Xu, H. M. Two new isoquinoline alkaloids from *Scolopendra subspinipes mutilans* induce cell cycle arrest and apoptosis in human glioma cancer U87 cells. *Fitoterapia* **110**, 103–109 (2016).
59. Ming, P. *et al.* A novel arylbenzofuran induces cervical cancer cell apoptosis and G1 / S arrest through ERK-mediated Cdk2 / cyclin-A signaling pathway. **7**, (2016).
60. Bao, L. *et al.* Histone deacetylase inhibitor induces cell apoptosis and cycle arrest in lung cancer cells via mitochondrial injury and p53 up-acetylation. *Cell Biol. Toxicol.* 1–14 (2016). doi:10.1007/s10565-016-9347-8
61. Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R. & Martin, D. Mitochondrial proton and electron leakss. *Essays Biochem* **47**, 53–67 (2010).
62. Antonenko, Y. N. *et al.* Penetrating Cations Enhance Uncoupling Activity of Anionic Protonophores in Mitochondria. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
63. Antonenko, Y. N. *et al.* Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers. *J. Biol. Chem.* **286**, 17831–17840 (2011).
64. Khailova, L. S. *et al.* A short-chain alkyl derivative of Rhodamine 19 acts as a mild uncoupler of mitochondria and a neuroprotector. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 1739–1747 (2014).
65. Caldeira Da Silva, C. C., Cerqueira, F. M., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H. G. & Kowaltowski, A. J. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell* **7**, 552–560 (2008).
66. Amara, C. E. *et al.* Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1057–1062 (2007).