



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Laboratorio de Farmacología y Toxicología

MECANISMOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR CATIONES LIPOFÍLICOS DERIVADOS DEL ÁCIDO GÁLICO

PROFESOR PATROCINANTE

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Farmacología

Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

DIRECTOR DE MEMORIA

Prof. Jorge Ferreira Parker

Programa de Farmacología Molecular y
Clínica. ICBM, Facultad de Medicina

Universidad de Chile

Memoria para optar al Título de Bioquímico

Karla Marión Cortés Jopia

SANTIAGO DE CHILE

Diciembre 2012

**A todos aquellos que de una u otra manera han hecho de mi vida un viaje
maravilloso, en especial a mi madre.**

"Nada es sólo mío. El yo no es posible sin la existencia del otro"
A. Jodorowsky

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis papás, que a lo largo de mi vida me han entregado su confianza y apoyo incondicional. Porque todos los días se esforzaron para darnos lo mejor, por educarnos y motivarnos para ser buenas profesionales y sobre todo, buenas personas. Hermanita, también te agradezco, porque juntas pasamos nuestros años de estudiantes lejos de la casa, gracias por ser mi amiga y compañera.

Profesora María Eugenia y Profesor Jorge, me siento muy feliz y honrada de haber sido su alumna. Gracias por abrirme las puertas de sus Laboratorio y confiar en mí sin saber más que mi nombre. Gracias a todos los que allí me recibieron y me hicieron sentir parte de una familia. Lili, Fabián y José, gracias por todo lo que me enseñaron, por su paciencia, por su ayuda, por sus consejos, por todos los almuerzos y risas compartidas. Gracias también Profe Mario, Felix y Andreita, por todo su cariño, amabilidad y buena disposición. Lulu, Vale y Felipe, los momentos que hemos compartido han sido de gran alegría. Gracias a todos los Chagásicos, Michel, Caro,Alfre, Rodrigo, Vicky y todos los tesistas PUC, siempre fue un agrado llegar al laboratorio y compartir con ustedes.

Quiero agradecer también, la colaboración de la Profesora Nancy Olea, el Laboratorio del Dr. Galanti, de la Dra. Ulrike y del Dr. Hetz, y también a los estudiantes de Doctorado Valentina Parra y Juan Cortés, sin su ayuda desinteresado no podría haber llevado a cabo todos los experimentos que incluye esta Tesis.

A toda mi linda y gran familia, gracias a mis abuelitos Luisa y Julio que me acompañaron durante mis primeros años en Santiago, y a mis tíos que me hicieron sentir que no estaba sola. A todos en el Norte, gracias por los lindos momentos que compartimos cada vez que estaba de visita, a mi tía Ely y abuelita Nani, por, a la Cami, Javi y Nico, gracias por la alegría en sus caritas cada vez que me veían llegar.

Gracias a mis amigas del Coro y compañeros del colegio, que me siguieron acompañando aquí en Santiago.

En especial quiero agradecer a Agustín, porque siempre fuiste uno de mis grandes amigos y hoy eres mi compañero de todos los días, porque nadie sabe mejor que tu todo lo que fueron en estos años, gracias por las veces que te quedaste acompañándome mientras estudiaba, gracias por enseñarme matemáticas y por ayudarme en todo lo que necesité, por estar conmigo incondicionalmente, por escucharme, por apoyarme en todas las cosas que emprendo. Sin ti estos años no hubiesen sido ni la mitad de lo buenos que fueron.

A mis queridas compañeras del equipo de futbolito y nuestro DT, ciertamente la práctica del deporte enriquece enormemente la experiencia universitaria. Gracias a todas, porque juntas en la cancha aprendimos tanto y más que lo que aprendimos en las salas de clases.

Gracias a Don Jose, a Charlie y Don Enrique por toda su amabilidad, gracias a Maria Isabel Pino por toda su ayuda.

En especial quiero agradecer a mi querida amiga Valentina Esjmentevic, porque, desde el bachillerato, juntas hemos batallado contra cuanta prueba y examen se nos ha presentado, debes ser una de las personas que mas entiende mi alegría en este momento. Gracias a ti y a tu familia.

Hay tantos nombres más que me gustaría incluir en estas páginas, pero el manuscrito sería eterno. Me doy cuenta de soy muy afortunada y que estoy rodeada de grandiosas personas.

A todas ellas, infinitas gracias de todo corazón.

ABREVIATURAS

DNAc	: DNA complemento
AIF	: Apoptosis Inducing Factor
AO	: Acridine Orange
ATCC	: American Type Culture Collection
Atg	: Autophagy related genes
bax	: Bcl-2-associated X protein
bm2	: Beta2-Microglobulin
CCRF-CEM	: Línea celular de leucemia linfoblástica humana
CEM-C2	: Variante multiresistente de CCRF-CEM
CLD	: Cationes lipofílicos deslocalizados
DISC	: Death Inducing Signaling Complex
DMEM	: Medio Dulbecco's modified Eagle's
EndoG	: Endonuclease G
FADD	: Fas-Associated Via Death Domain
FCS	: Fetal Calf Serum
gabarap	: Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
gadd45 alfa	: Growth Arrest and DNA Damage
Glucosa 6-P	: Glucosa seis fosfato
HK-2	: Hexoquinasa II
MET	: Microscopía de Transmisión Electrónica
Omi/HtrA2	: High Temperature Requirement Protein A2
PARP-1	: Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PI	: Propidium Iodide
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
RT-PCR	: Reverse transcription polymerase chain reaction
Smac/DIABLO	: Second Mitochondrial Derived Activator of Caspase/ Direct IAP-Binding Protein Propidium Iodide
TA3	: Línea celular de adenocarcinoma mamario de ratón
TA3-MTX-R	: Variante multiresistente de TA3

TOR : Target of Rapamycin
TPP⁺ : Cati3n trifenilfosfonio
TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α
VDAC : Voltaje dependent anionic channel

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
SUMMARY.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
La mitocondria como posible blanco de acción para nuevos agentes antineoplásicos.....	3
Compuestos lipofílicos deslocalizados como antineoplásicos mitocondriotrópicos.....	4
Derivados de ésteres del ácido gálico unidos a trifenilfosfina como antineoplásicos mitocondriotrópicos.....	6
Muerte celular y Cáncer.....	7
Estudio de la muerte celular.....	11
HIPÓTESIS.....	14
Objetivo general.....	14

Objetivos específicos.....	15
II.MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Reactivos.....	16
Cultivo celular.....	16
Viabilidad celular	17
Detección de organelos vacuolares acídicos.....	17
Análisis Morfológico mediante microscopía electrónica.....	18
Análisis de expresión genes bax, gabarap, gadd45alfa. Método Delta, delta C _T	18
III. RESULTADOS.....	22
Evaluación de la citotoxicidad aguda de cationes lipofílicos deslocalizados derivados del ácido gálicos, sobre células TA3 y CCRF/CEM y sus respectivas variantes multiresistentes.	22
Ensayo de morfología autofágica	28
Análisis Morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión.....	33
Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real.....	35
IV. DISCUSIÓN.....	38
V. CONCLUSIONES.....	42
VI. REFERENCIAS.....	43

ANEXOS.....	50
Anexo 1: Protocolo de preparación de células aisladas para MET.....	50
Anexo 2: Tabla <i>p value</i> Figuras 1, 2, 3 y 4.....	51
Anexo 3: Tabla <i>p value</i> Figura 12.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1	Incorporación de yoduro de propidio a células TA3 después del tratamiento con los cationes lipofílicos.	23
Figura 2	Incorporación de yoduro de propidio a células TA3 MTX-R después del tratamiento con los cationes lipofílicos.	24
Figura 3	Incorporación de yoduro de propidio a células CCRF/CEM después del tratamiento con los cationes lipofílicos.	25-26
Figura 4	Incorporación de yoduro de propidio a células CEM/C2 después del tratamiento con los cationes lipofílicos.	27
Figura 5	Células TA3 tratadas con DMSO durante 4h.	28
Figura 6	Células TA3 tratadas con DMSO durante 6h.	29

Figura 7	Células TA3 tratadas con C ₁₀ TPP ⁺ 15 μM durante 4h.	30
Figura 8	Células TA3 tratadas con C ₁₂ TPP ⁺ 15 μM durante 4h.	31
Figura 9	Células TA3 tratadas con C ₁₀ TPP ⁺ 15 μM durante 6h.	32
Figura 10	Células TA3 tratadas con C ₁₂ TPP ⁺ 15 μM durante 6h.	33
Figura 11	Micrografías electrónicas.	34
Figura 12	Análisis de la expresión de los genes gabarap, bax y gadd45 alfa en las líneas celulares TA3 y CCRF/CEM con sus respectivas variantes multiresistentes por RT-PCR en tiempo real.	37

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1	Secuencia de partidores.	32
Tabla 2	Condiciones de reacción RT-PCR.	34
Tabla 3	Programa de amplificación RT-PCR.	35

RESUMEN

Se ha descrito que los ésteres derivados del ácido gálico poseen efecto citotóxico sobre las células tumorales. En este trabajo se analizaron los mecanismos de muerte celular, inducidos por los compuestos catiónicos lipofílicos derivados del ácido gálico: galato de octil trifenilfosfonio, galato de decil trifenilfosfonio, undecil galato de trifenilfosfonio y lauril galato de trifenilfosfonio [$C_8\text{TPP}^+$, $C_{10}\text{TPP}^+$, $C_{11}\text{TPP}^+$ y $C_{12}\text{TPP}^+$, respectivamente]. Para ello se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma mamario de ratón TA3 y de leucemia linfoblástica aguda humana CCRF/CEM, con sus respectivas variantes multiresistentes TA3-MTX-R y CEM/C2. Estas células fueron tratadas con distintas concentraciones (0,5, 15, 30 y 50 μM) de los cationes lipofílicos, durante 2 y 4 horas y al cabo de estos periodos se determinó la viabilidad celular. El tratamiento con los cationes $C_{10}\text{TPP}^+$ y $C_{12}\text{TPP}^+$ produjo una disminución significativa de la viabilidad de las células tumorales; sin embargo, los cationes $C_8\text{TPP}^+$ y $C_{11}\text{TPP}^+$ no produjeron efectos significativos. Las microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión evidenciaron alteraciones profundas en la ultraestructura mitocondrial de las células TA3 provocadas por el catión $C_{12}\text{TPP}^+$. Más aún, el tratamiento con los cationes $C_{10}\text{TPP}^+$ y $C_{12}\text{TPP}^+$ produjo la sobreexpresión del gen pro-apoptótico gadd45 α , en todas las líneas celulares y en la mayoría de las condiciones ensayadas; la expresión del gen bax no fue afectada; el gen gabarap se sobreexpresó sólo en las líneas celulares CCRF/CEM y CEM/C2, y en dos de las condiciones ensayadas. Estos resultados en conjunto muestran que tanto $C_{10}\text{TPP}^+$ como $C_{12}\text{TPP}^+$ son los compuestos citotóxicos más potentes, y que la muerte celular ocurriría principalmente a través de la inducción de la vía intrínseca de apoptosis, y en menor porcentaje estaría dada por autofagia.

SUMMARY

It has been reported that esters of Gallic acid have cytotoxic effects on cancer cells. In this work we analyzed the mechanisms of cell death induced by lipophilic cation derivatives of Gallic acid: octyl triphenylphosphonium gallate, decyl triphenylphosphonium gallate, undecyl triphenylphosphonium gallate, and dodecyl triphenylphosphonium gallate [$C_8\text{TPP}^+$, $C_{10}\text{TPP}^+$, $C_{11}\text{TPP}^+$ and $C_{12}\text{TPP}^+$, respectively]. Cell lines used in this study were: TA3 (mouse mammary adenocarcinoma) and CCRF/CEM (human acute lymphocytic leukemia) and their multiresistant variants TA3 MTX-R and CEM/C2, respectively. These cell lines were treated with increasing cations concentrations (0,5, 15, 30 and 50 μM) of lipophilic compounds during 2 and 4 h and then screened for viability. The treatment of cells with $C_{10}\text{TPP}^+$ and $C_{12}\text{TPP}^+$ decreased the cell viability, whereas that $C_8\text{TPP}^+$ and $C_{11}\text{TPP}^+$ did not affect it. Hence, we investigated the mitochondrial toxicity of the lipophilic cation using Transmission Electron Microscopy. Our results indicated changes in the mitochondrial ultrastructure provoked by $C_{12}\text{TPP}^+$ treatment in TA3 cells. Moreover, Real Time RT-PCR analysis for cell death related genes (gabarap, bax and gadd45 α) expression, revealed that $C_{10}\text{TPP}^+$ and $C_{12}\text{TPP}^+$ up-regulated pro-apoptotic gene gadd45 α in all cell lines and in almost all assay conditions, while Bax gene expression was not affected. Gabarap was up-regulated but not in all cell lines and only in a few assay conditions. Taking account these results, we may conclude that $C_{10}\text{TPP}^+$ and $C_{12}\text{TPP}^+$ were the most potent cytotoxic compounds. The principal mechanism of cell death seems to be through the induction of the intrinsic route of the apoptosis, but also a percentage of autophagy occurs.

I. INTRODUCCIÓN

Desde la primera vez que en 1956, Warburg describió que existían diferencias entre los procesos metabólicos de una célula normal y una célula tumoral (Warburg, 1956) se ha mantenido el interés de investigar las múltiples particularidades de las células neoplásicas. Con el paso del tiempo distintos estudios han permitido organizar y comprender de mejor manera el particular comportamiento de las células que conforman un cáncer.

Durante las múltiples etapas del desarrollo de un tumor, las células van adquiriendo ciertas capacidades que las hacen más competentes que las células normales. Entre estas capacidades se incluyen: la señalización sostenida para que ocurra la proliferación, la resistencia a la muerte celular, la alta capacidad de invasión y metástasis, la inmortalidad replicativa y la inducción de la angiogénesis. Estos antecedentes sustentan la capacidad para evadir el ataque del sistema inmune, la presencia de múltiples alteraciones genómicas y la reprogramación del metabolismo energético de este tipo de células (Hanahan & Weinberg, 2011).

La reprogramación del metabolismo energético es uno de los más importantes cambios en las células tumorales. El aumento de la capacidad glicolítica, inclusive en presencia de oxígeno, (“Warburg effect”) es materia de estudio desde hace largo tiempo. En las células normales la energía se obtiene principalmente del ATP producido por la mitocondria (>90%). En las células tumorales, en cambio, la producción de ácido láctico puede proporcionar hasta el 50% del ATP requerido (Pedersen, 2007^a). Estudios genómicos en 24 tipos de cáncer humanos, demuestran que la mayoría de las enzimas de la vía glicolítica se encuentran sobre-expresadas (Altenberg & Greulich, 2004). Para la mantención de este fenotipo altamente glicolítico, el primer paso en la fosforilación de la glucosa es crítico. La hexoquinasa es la enzima que cataliza el primer paso de la vía glicolítica, donde la glucosa es fosforilada para formar glucosa 6-fosfato. En tumores que presentan altas tasas glicolíticas, se encuentra sobre-expresada una isoforma de

hexoquinasa distinta a la encontrada en tejidos normales, la hexoquinasa II (HK-2). Esta enzima se encuentra unida a la membrana externa mitocondrial por medio de la proteína de transmembrana VDAC (voltaje dependiente anionic channel), la cual, junto a un transportador de nucleótidos de adenina, facilitan el acceso del ATP recién sintetizado en la membrana interna mitocondrial hacia el sitio activo de HK-2; es decir, esta isoenzima tumoral es totalmente dependiente del ATP producido por el sistema mitocondrial (Pedersen, 2007^b). Las abundantes cantidades de HK-2 atrapan preferentemente el ATP y la glucosa, produciendo glucosa 6-P en grandes cantidades, lo que sustenta el crecimiento mantenido del tumor. Así se provee de la materia prima para mantener la elevada proliferación de las células tumorales y asegura su supervivencia mediante la producción de ácido láctico, que al ser excretado provoca un ambiente ácido desfavorable para las células normales circundantes.

La síntesis del ATP celular ocurre principalmente en el mitocondrion. Es por ello que es interesante estudiar las alteraciones que sufre este organelo en la patología del cáncer. Se han detectado diferencias asociadas específicamente a la función bioenergética de las mitocondrias en células tumorales. Entre estas diferencias se encuentran: cambios en la elección de sustratos para la respiración celular, diferencia en las tasas de flujo de electrones y transporte de aniones y en la capacidad de acumulación y retención de calcio. Además, se encuentra disminuida la actividad de enzimas importantes para la fosforilación oxidativa (Modica-Napolitano & Singh, 2004). El potencial de membrana mitocondrial es significativamente mayor en células tumorales que en células epiteliales normales (Davis y cols., 1985). La tasa de respiración de células tumorales es significativamente menor que la de células normales, aparentemente por la disfunción y pérdida de masa mitocondrial, lo que supone una menor cantidad de ATP disponible (Rossignol y cols., 2004). Todas estas diferencias ofrecen distintas posibilidades para que las mitocondrias sean un buena diana farmacológica, al momento de combatir a las células tumorales.

El mitocondrion como posible blanco de acción para nuevos agentes antineoplásicos.

El mitocondrion es un organelo cuyo buen funcionamiento es fundamental para el control de la vida y la muerte celular, su principal función es el control del metabolismo energético mediante la fosforilación oxidativa. En este organelo se encuentran las proteínas necesarias para la respiración celular, el ciclo del ácido cítrico y la β -oxidación de los ácidos grasos. Además, el mitocondrion participa en el control de los niveles de calcio citosólico, la producción de ROS y la apoptosis. Todos estos antecedentes sugieren la importancia y potencial participación del mitocondrion en enfermedades como el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Armstrong, 2007). Por lo tanto, existe gran interés en diseñar drogas dirigidas específicamente a este organelo.

Una de las características explotables en relación a la función mitocondrial es su participación en el proceso de apoptosis. La permeabilización de la membrana mitocondrial supone un punto de no retorno en el proceso de muerte celular (Marchetti y cols., 1996). Por lo tanto, compuestos que puedan promover la función pro-apoptótica de este organelo podrían ser usados para gatillar la muerte de células tumorales.

La intervención en el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones ofrece también un mecanismo para inducir eficazmente la muerte celular. El déficit de ATP es una condición de estrés, que mantenida en el tiempo, conduce a la muerte celular. Las células tumorales, dada su alta tasa glicolítica, se encuentran aun más vulnerables a un posible déficit de ATP. Es necesario recordar que la hexoquinasa II, que juega un papel preponderante a la hora de mantener el fenotipo glicolítico en las células tumorales, es dependiente del ATP mitocondrial. Por lo tanto, la intervención de la cadena transportadora de electrones, principalmente en aquellas células que presentan alta actividad glicolítica, además de provocar drásticos cambios en las concentraciones citosólicas de calcio, conduciría a un

profundo déficit de ATP, lo que finalmente permitiría detener el crecimiento tumoral.

Cualquier compuesto que se proponga como agente antineoplásico debe tener la capacidad de afectar selectivamente a las células tumorales. Si es el mitocondrion el blanco al cual se apunta, estos compuestos deben dirigirse preferentemente a este organelo y no ha otros componentes celulares. Es más, deben dirigirse principalmente al mitocondrion de células tumorales y no al de las células normales. Para estos fines podemos aprovechar la naturaleza única de la membrana interna mitocondrial. Esta membrana posee un potencial de transmembrana de 150-180 mV; esta magnitud es el doble que la de las membranas de células excitables y seis veces mayor que la de las membranas plasmáticas de células no excitables, esta condición otorga un gradiente de potencial negativo que sirve como fuerza electrostática conductora para ciertas moléculas que podrían acumularse en el mitocondrion. Además, el mitocondrion de las células tumorales posee un potencial de transmembrana aún mayor que el de células normales (Chen, 1988) este fenómeno favorecería las condiciones de selectividad anteriormente señalada.

Compuestos lipofílicos deslocalizados como antineoplásicos mitocondriotrópicos

Actualmente no se encuentran disponibles terapias específicas dirigidas al mitocondrion, en parte debido a la dificultad que presenta liberar moléculas terapéuticas "in vivo". Como una primera aproximación a este tipo de terapias, se han desarrollado distintas estrategias para lograr este objetivo, entre ellas, el uso de sistemas de polímeros transportadores, micelas, y liposomas (Murphy, 2008).

Entre las técnicas con mejores resultados se encuentra el uso de cationes lipofílicos deslocalizados, tales como el catión trifenilfosfonio; estas moléculas permiten la liberación de agentes bioactivos mediante la unión

covalente de la molécula a través de una cadena alquílica. Por lo general, las moléculas cargadas no pueden atravesar las membranas lipídicas, si no es con la ayuda de una proteína transportadora, debido a la gran energía de activación requerida para remover las moléculas de agua asociadas. La distribución de la carga positiva sobre la extensa superficie lipofílica de estos cationes permite disminuir considerablemente esta energía y así pueden atravesar fácilmente las membranas. El potencial de membrana mitocondrial además, favorece su acumulación en la matriz de las mitocondrias (Murphy, 2008). Estas propiedades son las que han validado el uso del ion trifenilfosfonio como molécula chaperona de distintos agentes, tales como, sondas fluorescentes, spin traps y agentes antioxidantes dirigidos tanto a mitocondrias de células aisladas como a las de organismos vivos (Ross y cols., 2004). Como agentes farmacológicos, ciertas sales de trifenilfosfonios han demostrado tener capacidad antibacteriana y antiparasitaria contra *T. cruzi*, actividad antiglicemiantes en modelos animales y actividad antiproliferativa en cultivos celulares y modelos animales (Millard y cols., 2010).

Estudios sobre la incorporación de TPP⁺ en cultivos celulares de carcinoma mamario MCF-7, han demostrado que este compuesto se acumula en las células malignas 30 veces más que en las células epiteliales normales (Davis y cols., 1985). Otros estudios corroboran estos resultados y los amplían a distintas líneas celulares, asociando la acumulación selectiva con el mayor potencial de membrana de las células tumorales (Madar y cols., 2002). Los antecedentes disponibles acerca de las distintas propiedades de las sales de trifenilfosfonio permiten concluir que estos compuestos presentan un gran potencial como agentes farmacológicos, puesto que son capaces de acumularse preferentemente en mitocondrias de células tumorales. La naturaleza de la molécula unida al catión jugará un papel preponderante en relación a los efectos producidos por estos compuestos, pues el catión trifenilfosfonio en sí mismo no posee actividad citotóxica.

Derivados de ésteres del ácido gálico unidos a trifenilfosfina como antineoplásicos mitocondriotrópicos.

El ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es un fenol vegetal obtenido de la hidrólisis de los taninos. Sus ésteres de alquilo son usados como aditivos antioxidantes para prevenir cambios de sabor y valor nutricional en los alimentos. Además, estos compuestos poseen distintas propiedades terapéuticas, como actividad antimicrobiana y anti cancerígena (Inoue et al., 1995; Frey et al., 2007). Se ha demostrado que la cadena alquílica lateral de los derivados del ácido gálico es importante para su capacidad antioxidante y que la capacidad de unirse o atravesar la membrana celular depende en gran parte del largo de la cadena lipofílica de los compuestos (Tammela y cols., 2004). La citotoxicidad no es una característica común de los compuestos fenólicos, pero sí es una propiedad específica del ácido gálico, siendo los 3 grupos hidroxilos adyacentes presentes en la molécula los responsables de la citotoxicidad observada (Inoue y cols., 1995). Se ha descrito que tanto el ácido gálico como sus derivados inducen apoptosis en células tumorales (Inoue y cols., 1994; Ji y cols., 2009). Sin embargo, el mecanismo involucrado en este fenómeno no se conoce profundamente y los efectos son variables entre las distintas líneas tumorales. En la actualidad los compuestos de origen natural son una buena base para el desarrollo de nuevos fármacos. Así, la asociación de ésteres derivados del ácido gálico a moléculas transportadoras, como los cationes trifenilfosfonios, que los dirijan específicamente hacia las mitocondrias de las células tumorales, resultan ser una estrategia novedosa para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

En el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antineoplásica es de gran importancia el estudio del mecanismo de acción de estas mismas, pues en base a éstos resultados, se podrá establecer si estas moléculas representan una oportunidad real para el desarrollo de nuevas terapias.

Muerte celular y Cáncer

La muerte celular ocurre continua y normalmente en nuestro organismo para mantener la homeostasis de la población celular en los tejidos. También puede ocurrir como un mecanismo de defensa, como es el caso de las reacciones inmunes, en donde se programa la muerte de aquellas células afectadas por enfermedades o agentes nocivos (Duprez y cols., 2009). De forma muy general, los procesos de muerte celular se pueden clasificar en dos grandes grupos: muerte celular programada, donde se incluye la apoptosis y autofagia y muerte celular no programada que corresponde a los procesos de muerte por necrosis (Kroemer y cols., 2009; Edinger & Thompson, 2004). El que ocurra un tipo de muerte celular u otra dependerá en parte de la naturaleza de la señal de muerte, el tipo de tejido, el estado de desarrollo en que se encuentra el tejido y su entorno fisiológico (Zeiss, 2003).

El proceso apoptótico es un proceso coordinado y que requiere energía. Independientemente del estímulo que induce a la apoptosis, los mecanismos confluyen en una vía común donde participan un grupo de cisteína-proteasas llamadas caspasas que activan una compleja cascada de eventos que conducen a una rápida muerte celular sin provocar inflamación. La muerte celular apoptótica se desencadena mediante distintos estímulos que pueden activar tanto la vía de señalización intrínseca como la extrínseca. En la vía extrínseca participan receptores de transmembrana conocidos como receptores de muerte celular, que pueden ser una proteína integral de membrana de otra célula (FAS) o una proteína extracelular soluble (TNF- α); receptor más ligando forman un complejo de señalización de muerte (DISC) que se une a la proteína adaptadora con un dominio de muerte asociado a FAS (FADD) la cual recluta la pro-caspasa 8 y de esta manera se activa la cascada de caspasas que darán inicio al proceso de muerte celular. La activación de la vía intrínseca, en cambio, puede responder tanto a estímulos de muerte extracelulares (deficiencias en nutrientes, radiaciones,

estrés químico y físico) como a estímulos intracelulares (estrés oxidativo, daño al DNA, plegamiento incorrecto de las proteínas). Esta vía es dependiente del mitocondrion y es modulada por la liberación de proteínas pro-apoptóticas desde este organelo al citoplasma. Estas proteínas incluyen al citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF y EndoG, entre otras. En esta etapa la señal apoptótica puede ser inhibida y la célula sobrevivirá, o ser transmitida, donde pasado un punto “sin retorno” la célula morirá. La liberación del citocromo c, se señala como el evento que marca el no retorno en el proceso de muerte celular, proceso que está estrechamente regulado por proteínas pro y anti apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk y Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG). Diferentes patologías muestran alteraciones en los mecanismos de apoptosis en virtud de una disfunción, sea excesiva o bien deficiente (Duprez y cols., 2009).

En el cáncer el proceso de muerte celular se encuentra desregulado, los defectos de la apoptosis favorecen la proliferación y crecimiento sin control que caracterizan la enfermedad. Las células malignas han adquirido la capacidad de evadir las señales de muerte celular y obtener resistencia a los tratamientos. Así, restablecer la función apoptótica en células tumorales es una buena estrategia para combatir el cáncer; sin embargo, no debemos dejar de lado la alternativa de potenciar otros mecanismos de muerte celular, tales como la autofagia o necrosis, los cuales pueden tener importancia terapéutica, sobre todo cuando la apoptosis es defectuosa.

La autofagia constituye una vía alternativa de muerte celular. Es un proceso en el cual el citoplasma y los organelos subcelulares son secuestrados en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas que luego liberan su contenido dentro de lisosomas para su degradación y reciclaje de macromoléculas. Así como el recambio proteico está mediado por ubiquitinización y degradación por el proteosoma, el recambio de grandes proteínas y organelos es atribuido parcialmente a la autofagia. El mecanismo de la autofagia es conservado en levaduras, plantas y metazoos e involucra

la acción de un grupo de genes conocidos como genes atg, los cuales coordinan el catabolismo celular. La autofagia es el único mecanismo que permite degradar organelos y agregados proteicos. En condiciones normales, la autofagia ocurre para mantener el equilibrio celular y deshacerse de componentes dañados que podrían resultar tóxicos. En condiciones de privación de nutrientes la autofagia los entrega y permite así que la célula sobreviva. Este control es posible debido a que en la membrana existen moléculas que actúan como sensores del medio extracelular activando vías de señalización intracelulares. Uno de estos sensores es la proteína TOR, que inhibe la autofagia en un medio rico en nutrientes y promueve la formación del autofagosoma cuando los nutrientes son escasos (Duprez y cols., 2009; Edinger & Thompson, 2004). Además, de permitir la sobrevivencia celular en condiciones adversas, la autofagia puede promover un tipo de muerte celular programada que tiene un papel fundamental en el desarrollo normal de los tejidos de organismos como levaduras, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Ictyostelium discoideum* (Kourtis & Tavernarakis, 2008). La autofagia puede inducirse por una gran cantidad de fenómenos que producen estrés, puede degradar agregados proteicos, lípidos oxidados, organelos dañados, e inclusive patógenos intracelulares, lo que evidencia que la autofagia también tiene un rol importante en la prevención de enfermedades. Defectos en la autofagia se relacionan con enfermedades hepáticas, neurodegenerativas, enfermedad de Crohn, envejecimiento, síndrome metabólico y cáncer (Rabonowitz & White, 2010). El rol de la autofagia en cáncer es tema de continuo debate. Ciertas líneas celulares malignas responden a los agentes antitumorales promoviendo la autofagia, se ha probado que el tratamiento con As_2O_3 , en al menos seis tipos de líneas celulares de gliomas, induce la muerte celular mediante autofagia, sin observarse señales de apoptosis (Kanzawa y cols., 2003). El tratamiento con radiación induce muerte celular autofágica en líneas celulares de cáncer de mamas, próstata y colon (Paglin y cols., 2001). Estos resultados se contraponen con aquellos en que la autofagia se encuentra inhibida durante el desarrollo y tratamiento del

cáncer, lo que demuestra la individualidad de cada tipo de cáncer. Por lo tanto, el rol de la muerte celular mediada por autofagia en respuesta a distintos tratamientos antitumorales debe seguir siendo investigado, de esta manera se podrán manejar posibles estrategias para el tratamiento de esta enfermedad, ya sea potenciando la autofagia, en aquellas células capaces de sufrir este tipo de muerte celular en respuesta a fármacos, o inhibiendo este mecanismo, en las que utilizan la autofagia para protegerse de los efectos de la terapia antineoplásica.

Un tercer tipo de muerte celular que tiene relación con la enfermedad tumoral es la necrosis, ésta podría definirse como aquel tipo de muerte que no presenta signos de apoptosis o autofagia. Se considera como un proceso tóxico, descontrolado y pasivo, que generalmente afecta grandes áreas celulares. La característica fundamental que distingue a la necrosis, es la rápida pérdida de los potenciales de membrana como consecuencia de la disminución de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o pérdida de la función de las bombas iónicas o canales homeostáticos. La alteración de uno de estos parámetros produce un efecto en la función de los otros, siendo difícil definir cuál ocurre primero. La pérdida de la integridad de la membrana resulta en la liberación de los contenidos citoplasmáticos al exterior, lo que desencadena en el envío de señales quimiotácticas que provocan el reclutamiento de células inflamatorias. Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que la necrosis es un proceso que ocurre de forma desregulada, existen situaciones en que este proceso se desencadena de forma controlada durante eventos patológicos y fisiológicos específicos (Proskuryakov y cols., 2003; Zong & Thompson, 2006). De esta manera la necrosis, como proceso de eliminación celular, puede ser modulado con propósitos terapéuticos, pudiendo ser suprimida para prevenir el daño de tejidos normales, o activada para inducir el daño en tejidos tumorales (Kiaris & Schally, 1999).

Existe evidencia *in vitro* de que ciertas drogas antitumorales inducen necrosis, entre ellas, los agentes alquilantes del DNA. Estos actúan vía activación de PARP-1, proceso que afecta tanto a células resistentes como no resistentes a la apoptosis (Zong y cols., 2004). Puesto que las drogas que inducen necrosis exhiben también una alta citotoxicidad, una estrategia para sortear este inconveniente sería conducir estos fármacos directo a los tumores (Koppan y cols., 1998). Nuevos enfoques sugieren que potenciar la necrosis y además la respuesta inmune, podría favorecer la regresión del tumor. De esta manera el desafío es controlar el proceso de necrosis para modular una respuesta inflamatoria adecuada que potencie la terapia antitumoral.

Finalmente todo la evidencia apunta a que en un mismo tumor, apoptosis, autofagia y necrosis pueden coexistir y que el porcentaje de contribución de cada proceso puede delimitar la trayectoria del crecimiento o regresión del tumor, así como la respuesta del individuo.

Estudio de la muerte celular

En la actualidad existen distintas técnicas para estudiar y describir los distintos tipos de muerte celular. Desde el punto de vista morfológico, el estudio mediante microscopía ha sido una herramienta de gran utilidad durante mucho tiempo. Por medio de la microscopía óptica se pueden apreciar cambios en la organización celular, tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos. Para apreciar alteraciones celulares como cambios en microvellosidades, así como alteraciones mitocondriales o del retículo endoplásmico, se puede recurrir a la microscopia electrónica (Jurišić y cols., 2008).

Uno de los procesos que se asocian generalmente con la apoptosis es la degradación de DNA, que ocurre siguiendo un patrón específico. Se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula en busca de esta degradación. El ensayo TUNEL es el más utilizado

para estos propósitos, la detección puede ser tanto por medio de citometría de flujo como por microscopia. Por otra parte, durante la necrosis también se presenta degradación de DNA aunque ésta no presenta el patrón de degradación internucleosomal presente en la apoptosis (Jurišić y cols., 2008). Un estudio clásico para describir la presencia de apoptosis es la detección de la activación de caspasas; la activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis (Jurišić y cols., 2008). Para la evaluación de la simetría de la membrana celular se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de fosfatidil serina en el exterior de la membrana celular. Anexina V es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana, y que tiene una alta afinidad por la fosfatidil serina, por lo que aquellas células que se encuentran marcadas con anexina V, serán aquellas que se encuentran en apoptosis (Jurišić y cols., 2008). Para el caso de autofagia tanto los estudios morfológicos como otro tipo de ensayos apuntan a la detección de autofagosomas. Una buena forma de demostrar la presencia de autofagia es la detección de autolisosomas, que consisten en la fusión del autofagosoma y del lisosoma. Este último organelo es una vesícula ácida, condición que permite su detección mediante distintos métodos, tales como, el uso de la sonda naranja de acridina. El método más popular para la detección de la autofagia es la observación y cuantificación de GFP-LCR mediante microscopia de fluorescencia. Durante la autofagia esta molécula normalmente se encuentra distribuida en toda la célula, de lo contrario, solo se encuentra en las membranas de los autofagosomas (Mizushima y cols., 2010; Klionsky y cols., 2007). En cuanto a la necrosis, una técnica rápida y fácil para determinar el rompimiento de la membrana celular es medir la incorporación de yoduro de propidio mediante citometría de flujo, el yoduro de propidio no atravesará la membrana de las células viables (Dengler y cols., 1995).

Puesto que todos los procesos de muerte celular se ven controlados en mayor o menor medida por la activación de ciertos genes en un momento determinado, la aplicación de la biología molecular aparece como una buena

alternativa para evaluar la expresión de genes relacionados a estos fenómenos.

En la actualidad la transcriptómica, que se encarga del estudio de los conjuntos de ARN mensajeros o transcriptos que hay en una muestra determinada en un momento determinado, surge como una excelente herramienta para identificar modificaciones en los perfiles de expresión génica (Wang y cols., 2009). Esta estrategia ha sido de gran utilidad en el estudio del cáncer, ya que permite la comparación del conjunto de especies de mRNA de una población de células tumorales, frente al transcriptoma de células normales (Eswaran y cols., 2012). Igualmente, el estudio de perfiles de expresión se ha utilizado para el análisis de mecanismos de acción de distintos compuestos con actividad antitumoral, puesto que es posible identificar genes expresados diferencialmente bajo ciertas condiciones de interés (Chia y cols., 2010; Mbazima y cols., 2008). La valoración y cuantificación de estos genes puede realizarse mediante la tecnología de RT-PCR en tiempo real.

La técnica RT-PCR en tiempo real, se basa en la detección y cuantificación simultánea, en cualquier momento de la amplificación, del producto amplificado (cDNA, DNA), mediante una señal de fluorescencia que se acumula durante el proceso de amplificación hasta sobrepasar un nivel umbral que se denomina ciclo umbral o C_T . Estos valores son inversamente proporcionales a la cantidad inicial presente de DNA o cDNA (Heid y cols., 1996).

La técnica de PCR en tiempo real ofrece variadas ventajas:

- A diferencia del PCR convencional, las mediciones se realizan en la etapa exponencial de la reacción donde, en teoría, por cada ciclo de amplificación se acumula el doble de producto respecto al ciclo anterior, asumiendo una eficiencia del 100%.

- Al utilizar un sistema cerrado, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante.
- Rapidez en la obtención de resultados.
- Permite cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla y precisa.
- Permite monitorear la eficiencia de la reacción.
- Ofrece mínima variabilidad de los resultados

Por estas razones, el uso de RT-PCR en tiempo real combinado con los nuevos sistemas para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para la detección y cuantificación de eventos moleculares. En este trabajo mediante RT- PCR en tiempo real se estudiarán los efectos producidos por los cationes lipofílicos derivados del ácido gálico sobre los niveles de expresión de distintos genes que participan en el proceso de muerte celular, en líneas celulares tumorales.

HIPÓTESIS

Los cationes lipofílicos deslocalizados derivados del ácido gálico, producen la muerte de células tumorales mediante apoptosis, autofagia y necrosis, provocando daño a nivel mitocondrial y cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con muerte celular.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el tipo de muerte celular inducida por cationes lipofílicos derivados del ácido gálico en líneas de células tumorales de leucemia linfoblástica aguda humana (CCRF-CEM) y su variante multiresistente (CEM-C2), y en adenocarcinoma mamario de ratón (TA3) con su variante multiresistente (TA3-MTX-R).

Objetivos específicos

1. Establecer mediante un ensayo de viabilidad celular el tiempo y concentración mínima que debe aplicarse, para observar efectos en la viabilidad celular, inducidos por el tratamiento con cationes lipofílicos derivados de ácido gálico [C_8TPP^+], [$C_{10}TPP^+$], [$C_{11}TPP^+$], [$C_{12}TPP^+$], en células de las líneas CCRF-CEM y TA3 con sus respectivas variantes multiresistentes CEM-C2 y TA3-MTX-R.
2. Mediante el uso de la sonda naranja de acridina, evaluar las condiciones de tiempo y concentración en que los cationes lipofílicos provocan la aparición de vesículas ácidas.
3. Evidenciar mediante microscopía electrónica de transmisión los efectos de los cationes lipofílicos derivados del ácido gálico sobre la morfología celular.
4. Evaluar los cambios en los niveles de expresión de los genes relacionados con la muerte celular: bax, gabarap y gadd45 α , en las células de las líneas CCRF-CEM y TA3 y sus respectivas variantes multiresistentes CEM-C2 y TA3-MTX-R tratadas con los cationes lipofílicos derivados del ácido gálico: [C_8TPP^+], [$C_{10}TPP^+$], [$C_{11}TPP^+$], [$C_{12}TPP^+$].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich Co. (St.Louis, MO, USA): medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), Tritón X-100, Yoduro de propidio (PI), Acridina Orange (AO), PBS. El suero fetal bovino (FCS), penicilina y estreptomycin fueron adquiridos en Biological industries, Kibbutz. Israel. El medio de cultivo RPMI-1640 se obtuvo de GIBCO. RNeasy mini kit, QuantiTec SYBR Green RT-PCR, fueron obtenidos de Qiagen.

MÉTODOS

Cultivo celular. En este trabajo se utilizaron 4 líneas celulares:

1. TA3, línea celular de adenocarcinoma mamario de ratón.
2. TA3-MTX-R, variante multiresistente de TA3.
3. CCRF-CEM, línea celular de leucemia linfoblástica aguda humana.
4. CEM-C2, variante multiresistente de CCRF-CEM.

Las líneas celulares 1 y 2 fueron crecidas hasta el día del ensayo mediante una inyección i.p. semanal en ratones jóvenes adultos machos de la cepa CAF1/JAC. En la línea TA3-TX-R, la resistencia se generó mediante la inyección ip de 2,0 mg de MTX/kg/48h, hasta el día del ensayo. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino inalterado (FCS) y antibióticos al 1% (penicilina/estreptomycin) en una atmósfera húmeda (37°C y 5% CO₂).

Las líneas celulares 3 y 4 fueron adquiridas en ATCC (American Type Culture Collection). Las células se propagaron en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con FCS al 10% y 1% de la mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomycin) en atmósfera húmeda (37°C y 5%CO₂). Para el mantenimiento de los cultivos se realizó un cambio de medio, día por medio.

Viabilidad celular (citotoxicidad). Los ensayos de viabilidad celular se realizaron en placas de 24 pocillos transparentes, allí se sembraron 200.000 células por pocillo para TA3, TA3-MTX-R, CCRF-CEM y CEM-C2 en un volumen de 1 ml por pocillo de medio DMEM suplementado o RPMI suplementado, según corresponda. Las células fueron incubadas 24 horas. Para valorar el efecto de los compuestos (C_8TPP^+ , $C_{10}TPP^+$, $C_{11}TPP^+$, $C_{12}TPP^+$) se prepararon cuatro diluciones de los distintos compuestos en DMSO obteniendo las siguientes concentraciones: 0,5, 15, 30 y 50 μ M. Cada pocillo fue tratado con 10 μ L de cada una de las diluciones, dejando un pocillo tratado con DMSO como control del vehículo. Después de 2 o 4 horas de incubación, se determinó la población celular viable midiendo la incorporación de yoduro de propidio (1 μ g/mL) mediante citometría de flujo, usando el equipo FACS-Canto (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU)

Se calcularon los porcentajes de supervivencia celular, relativos a las células control (tratadas con DMSO) y se construyeron curvas de concentración vs porcentaje de supervivencia empleando el programa GraphPad Prism 5. Para cada tratamiento se realizaron al menos tres experimentos independientes con resultados consistentes, en semanas diferentes.

Detección de organelos vacuolares acídicos. Naranja de Acridina es una sonda sensible al pH que puede ser usada para la detección de compartimentos ácidos, donde se protona y acumula. A pH ácido AO emite fluorescencia roja con una intensidad proporcional al grado de acidez, además tiñe el DNA y citoplasma en color verde. La formación de vacuolas ácidas en células tratadas con AO puede medirse mediante citometría de flujo o pueden ser observadas mediante microscopio de fluorescencia.

Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos en una densidad celular de 200.000 células/pocillo. Las células fueron incubadas 24 h, luego se adicionaron cuatro concentraciones de los compuestos $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$ respectivamente (5, 15, 30 y 50 μ M) y se incubó durante 20 minutos, como control se trataron células con DMSO. Finalizado este tiempo, las células

fueron lavadas y resuspendidas en PBS, se adicionó a cada pocillo 10 μ L de naranja de acridina a una concentración final de 1 μ g/mL. Las placas se observaron al microscopio de fluorescencia Nikon DIC Eclipse 80i. Los campos fueron fotografiados con el fin de determinar la presencia de organelos con pH ácido.

Análisis Morfológico mediante microscopía electrónica. Se incubaron 4 placas de 24 pocillos con 200.000 células TA3 por pocillo, en un volumen de 1 ml. Dos placas fueron tratadas con el compuesto $C_{12}TPP^+$, 10 μ L por pocillo, en una concentración final de 15 μ M durante 6 h. Las otras dos placas corresponden al control, tratadas con DMSO. Transcurrido ese tiempo se recolectaron todos los volúmenes de cada pocillo en un tubo y se centrifugaron para obtención del pellet. Luego el pellet fue fijado de acuerdo al protocolo apropiado para la técnica (Anexo 1). Finalmente, cortes finos de 600 Å recogidos en grillas de 200 mesh, teñidos con tinción doble de acetato de uranilo y plomo, fueron observados y fotografiados con el microscopio MET Zeiss EM 109.

Análisis de expresión genes *bax*, *gabrap*, *gadd45*alfa. Método Delta, delta C_T . Las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos, disponiendo 200.000 células/pocillo en un volumen de 1mL. Después de 24 horas, en cada placa se aplicó uno de los siguientes tratamientos $C_{10}TPP^+$ 15 μ M durante 2 y 6 h, $C_{12}TPP^+$ 15 μ M durante 2 y 6 h. Al final de los tratamientos, se retiró el medio de cultivo y se lavó y centrifugó el pellet celular, para proceder a la extracción de RNA.

La extracción de RNA total se realizó mediante el uso del kit comercial RNeasy de Qiagen siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El kit permite la purificación del RNA mediante el uso de pequeñas columnas de centrifugación de membrana de sílica con una capacidad de unión de hasta 100 μ g de RNA. La cuantificación del RNA total se realizó midiendo la

absorbancia a 260 nm y 280 nm del RNA total obtenido Para el cálculo de la concentración se empleó la relación: la absorbancia a 260nm, medida en una celda de 1 cm, de una solución de ARN de cadena sencilla de concentración 40 µg/mL es 1. Se evaluó también la relación A260nm/A280nm, como indicativo de la pureza del RNA obtenido, que se espera sea mayor que 2,0. Sólo los extractos que cumplieron con los criterios de pureza fueron seleccionados para análisis posteriores.

Para realizar las amplificaciones por PCR en tiempo real, se emplearon partidores específicos diseñados para cada uno de los siguientes genes de interés: gabarap, bax, gadd45alfa y bm2 como gen de referencia interna. Los partidores para ratón se obtuvieron de la base de datos Primer Bank disponible en <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>. Luego, las secuencias obtenidas fueron verificadas por comparación frente a las bases de datos del GenBank mediante la herramienta BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), para asegurar la especificidad de los partidores hacia los genes de interés. La secuencia de los partidores de la especie humana fue proporcionada por el Laboratorio de Enzimología Molecular a cargo de la Dra. Mónica Salas del instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

La síntesis de cDNA y la amplificación por PCR en tiempo real se realizó en un solo paso usando el kit QuantiTec SYBR Green RT-PCR Master Mix en el termociclador 7300 Fast Real –Time PCR System (Applied Biosystems). El volumen final de las reacciones fue de 25 µL, esta mezcla incluyó el mRNA blanco, los partidores específicos, y la mezcla de reacción QuantiTec SYBR Green RT-PCR Master Mix.

Tabla N°1. Secuencia de partidores

Nombre del gen / especie	N° Acceso RNAm Gene Bank	Partidor directo	Partidor Inverso
gabarap /ratón	NM_020590	AGGACCACCCCTTCGAGTATC	GCACAAGGTACTTCCTCTTATC
bax/ ratón	NM_026669	TCCCACATAACTCCCTCGACA	GTGTGTGACCACATGGACATA
gadd45alfa/atón	NM_007836	CCGAAAGGATGGACACGGTG	TTATCGGGGTCTACGTTGAGC
gabarap / humano	NM_007285.6	TCCCGACAGGGTTCCGGTGAT	AGCCCAGCAATGGCCCTCAGA
bax / humano	NM_1366761.3	AAGCGCATCGGGGACGAAC	AGCCCAGCAATGGCCCTCAGA
gadd45alfa/humano	NM_001924.3	GGAGAGCAGAAGACCGAAAGG	AGCAGGCACAACACCACGTTA
bm2	NM_004048.2	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	GATGCTGCTTACATGTCTCG

Tabla 2. Condiciones de reacción RT-PCR

Componente	Volumen/reacción μL	Concentración Final
2x QuantiTec SYBR Green	12,5	1 X
RT-PCR Master Mix		
Primer A	1,25	0,5 μM
Primer B	1,25	0,5 μM
QuantiTec RT Mix	0,25	-
RNA Templado	2,5	1 ng/ μL
Agua libre de RNAasa	7,25	-
Volumen final	25	

El programa de amplificación a emplear fue determinado y programado en el equipo según las indicaciones del kit.

Tabla 3. Programa de amplificación RT-PCR

Pasos	Tiempo	Temperatura
Transcripción Reversa	30 min	50°C
Paso inicial Activación PCR	15 min	95°C
Ciclos:		
Desnaturalización	15 s	94°C
Alineamiento	30 s	58°C
Extensión	30 s	72°C
Número de ciclos	40	

Los cambios en la expresión génica se calcularon empleando el método de cuantificación relativa de doble delta de C_T ($\Delta\Delta C_T$) reportado por Livak y Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001), usando la siguiente ecuación:

Nivel de expresión = $2^{-\Delta\Delta C_T}$, donde:

$\Delta\Delta C_T = (C_T, \text{ gen de interés} - C_T, \text{ gen de referencia}) \text{ Tratamiento} - (C_T, \text{ gen de interés} - C_T, \text{ gen de referencia}) \text{ Control}$

Como gen de referencia interna se empleó el gen de expresión constitutiva β -2-microglobulina (bm2). La diferencia en los valores de expresión de los genes entre las dos líneas celulares estudiadas se evaluó mediante una prueba *t-Student* empleando el programa estadístico GraphPad Prism 5, teniendo en cuenta un valor $p < 0,05$ como significativo.

III. RESULTADOS

Evaluación de la citotoxicidad aguda de cationes lipofílicos deslocalizados derivados del ácido gálicos, sobre células TA3 y CCRF/CEM y sus respectivas variantes multiresistentes. Se valoró la actividad citotóxica de los compuestos C_8TPP^+ , $C_{10}TPP^+$, $C_{11}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$ utilizando cuatro concentraciones (0,5, 15, 30, 50 μM) durante 2 y 4 horas de tratamiento. Las diferencias estadísticas se evaluaron respecto al control, mediante el test *t de Student*, de donde se obtuvieron los *p value* correspondientes (Anexo 2).

Los cationes C_8TPP^+ y $C_{11}TPP^+$ no presentaron actividad citotóxica sobre ninguna de las cuatro líneas celulares ensayadas, en ninguna de las concentraciones y tiempos seleccionados (Figuras 1, 2, 3 y 4). Los valores no fueron estadísticamente diferentes al control ($p > 0,05$). Los cationes $C_{10}TPP^+$ Y $C_{12}TPP^+$ en cambio, presentaron un efecto citotóxico dosis-dependiente; la viabilidad celular disminuyó a medida que se aumentó la concentración del compuesto administrado. Esta respuesta se observó en las líneas celulares TA3, TA3-MTX-R, CCRF-CEM y CEM-C2, y se acentuó al aumentar el tiempo de exposición.

Los resultados del tratamiento de las células TA3 con los cationes $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$ se muestran en la Figura 1. Un 20% de las células TA3 tratadas con $C_{10}TPP^+$ en la concentración 15 μM durante 2 horas, incorporaron yoduro de propidio; sin embargo, en estas mismas condiciones, el efecto de $C_{12}TPP^+$ no fue significativo ($p > 0,05$). El efecto citotóxico de $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$ a las concentraciones 30 μM y 50 μM fue similar, aproximadamente el 50% y casi el 100% de las células incorporaron yoduro de propidio, respectivamente. Los efectos a las 4 horas de tratamiento coincidieron con los observados a las 2 horas de tratamiento.

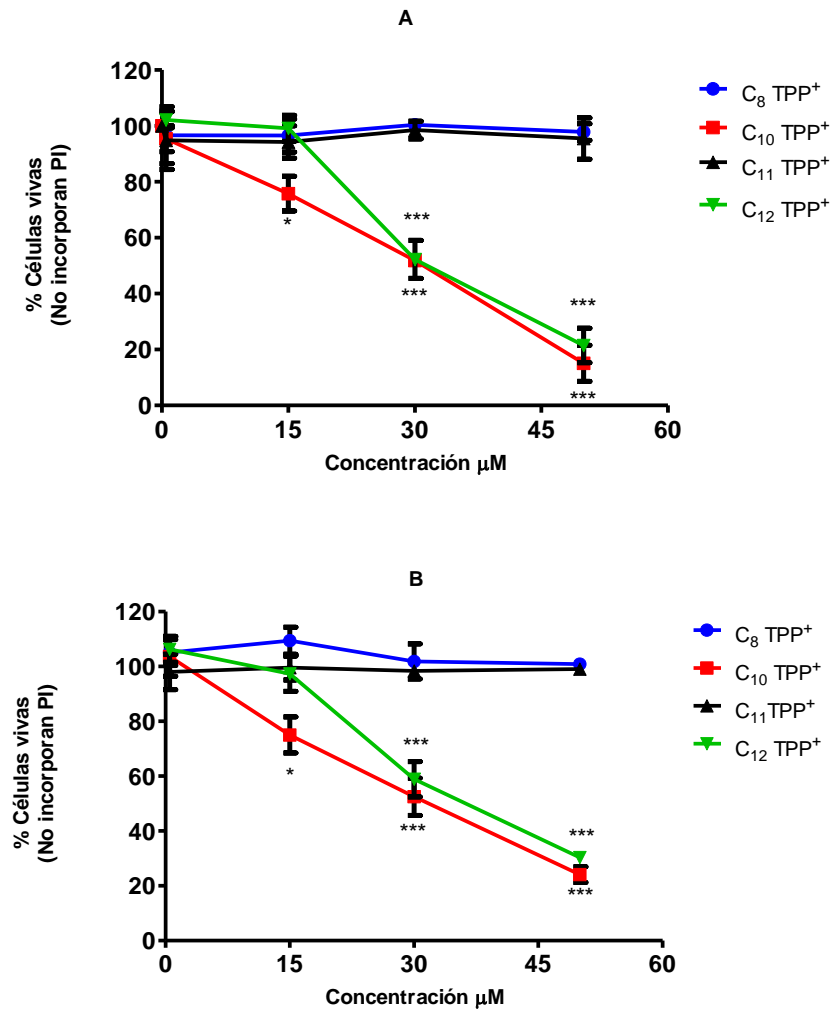


Figura 1. Incorporación de yoduro de propidio a las células TA3 después del tratamiento con los cationes lipofílicos. A: 2 horas de tratamiento. **B:** 4 horas de tratamiento. El porcentaje de células vivas se calculó respecto al control. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS. Los asteriscos representan valores estadísticamente diferentes al control *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

La línea celular TA3-MTX-R presenta resistencia a varios agentes quimioterapéuticos, como por ejemplo cisplatino, dexorrubicina, metotrexato, 5-fluorouracilo y vinblastina (Frey y cols., 2008). En los experimentos realizados, los efectos significativos del catión $\text{C}_{10} \text{ TPP}^+$ sobre la viabilidad celular se observan en las concentraciones 30 y 50 μM , donde alrededor de

un 50% de las células incorporaron yoduro de propidio a las 2 h de tratamiento. El tratamiento durante 4 horas con el catión $C_{10}TPP^+$ aumentó este efecto significativamente. Así, la incorporación de yoduro de propidio se observó a partir de la concentración 15 μM y el tratamiento con 50 μM produjo un 70% de células no viables, aproximadamente (Figura 2).

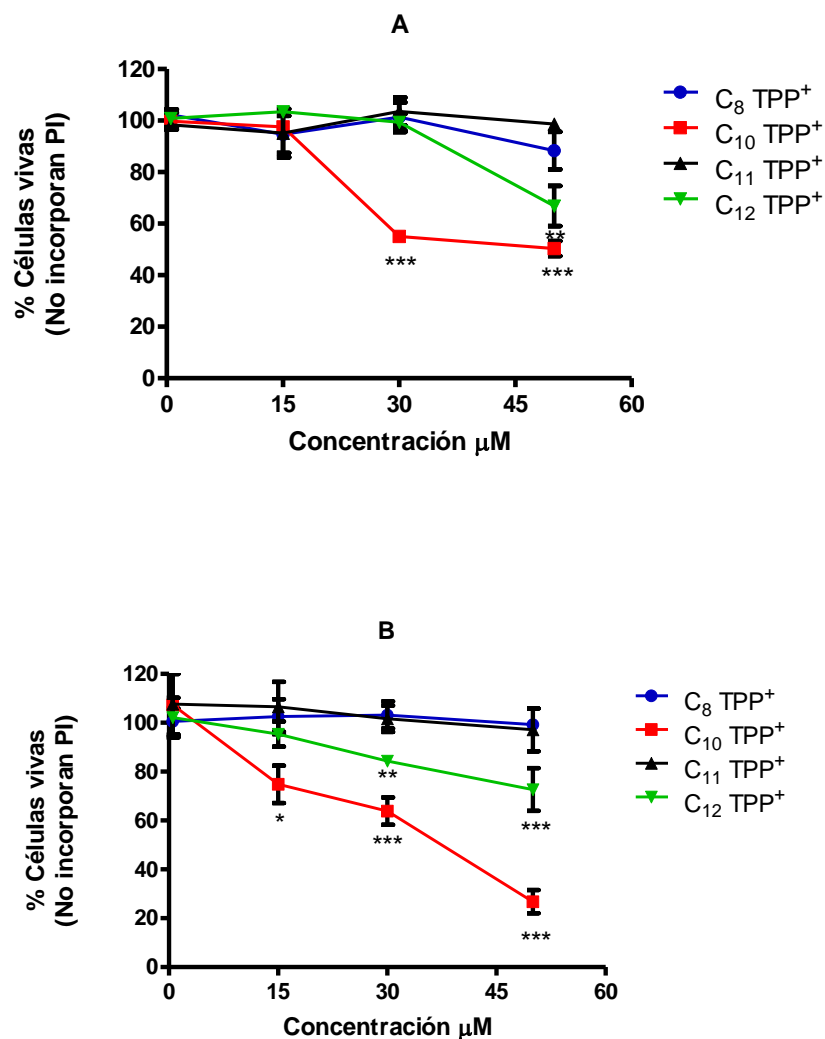


Figura 2. Incorporación de yoduro de propidio a células TA3 MTX -R después del tratamiento con los cationes lipofílicos. A: 2 horas de tratamiento. **B:** 4 horas de tratamiento. El porcentaje de células vivas se calculó respecto al control. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS. Los asteriscos representan valores estadísticamente diferentes al control *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Los ensayos en la línea celular CCRF/CEM mostraron efectos significativos al tratar estas células con los compuestos $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$. A la concentración de $30\ \mu\text{M}$ y 2 horas de tratamiento, aproximadamente un 90% de las células fueron viables. Sólo un 20% de las células se encontraron viables al tratarlas $C_{10}TPP^+$ $50\ \mu\text{M}$ y un 40% al tratarlas con $C_{12}TPP^+$ $50\ \mu\text{M}$. A las 4 horas de tratamiento, los efectos de los cationes fueron más pronunciados; $C_{12}TPP^+$ produjo efectos significativos a partir de la concentración $30\ \mu\text{M}$. Asimismo, el 50% de células tratadas con el catión $C_{10}TPP^+$ a una concentración de $15\ \mu\text{M}$ incorporó yoduro de propidio y ambos cationes produjeron casi un 100% de pérdida de la viabilidad celular al tratarlos con la concentración $50\ \mu\text{M}$ (Figura 3).

El 70% de las células leucémicas multiresistentes a quimioterápicos, CEM/C2, tratadas durante 2 h con el catión $C_{10}TPP^+$ $30\ \mu\text{M}$ permanecieron viables. Una concentración de $50\ \mu\text{M}$ del catión $C_{12}TPP^+$, luego de 2 h de tratamiento, produjo un 40% de células viables y $C_{10}TPP^+$ en las mismas condiciones produjo casi un 100 de pérdida de viabilidad celular. A las 4 h de tratamiento sólo un 20% de células no fueron viables al tratar con $C_{10}TPP^+$ $15\ \mu\text{M}$ y un 80% al tratar con $30\ \mu\text{M}$. A ese mismo tiempo de tratamiento, $C_{12}TPP^+$ $30\ \mu\text{M}$ redujo a un 50% las células viables. La concentración $50\ \mu\text{M}$ produjo la muerte de aproximadamente el 100% de estas células, tratadas ya sea con $C_{10}TPP^+$ o con $C_{12}TPP^+$ (Figura 4).

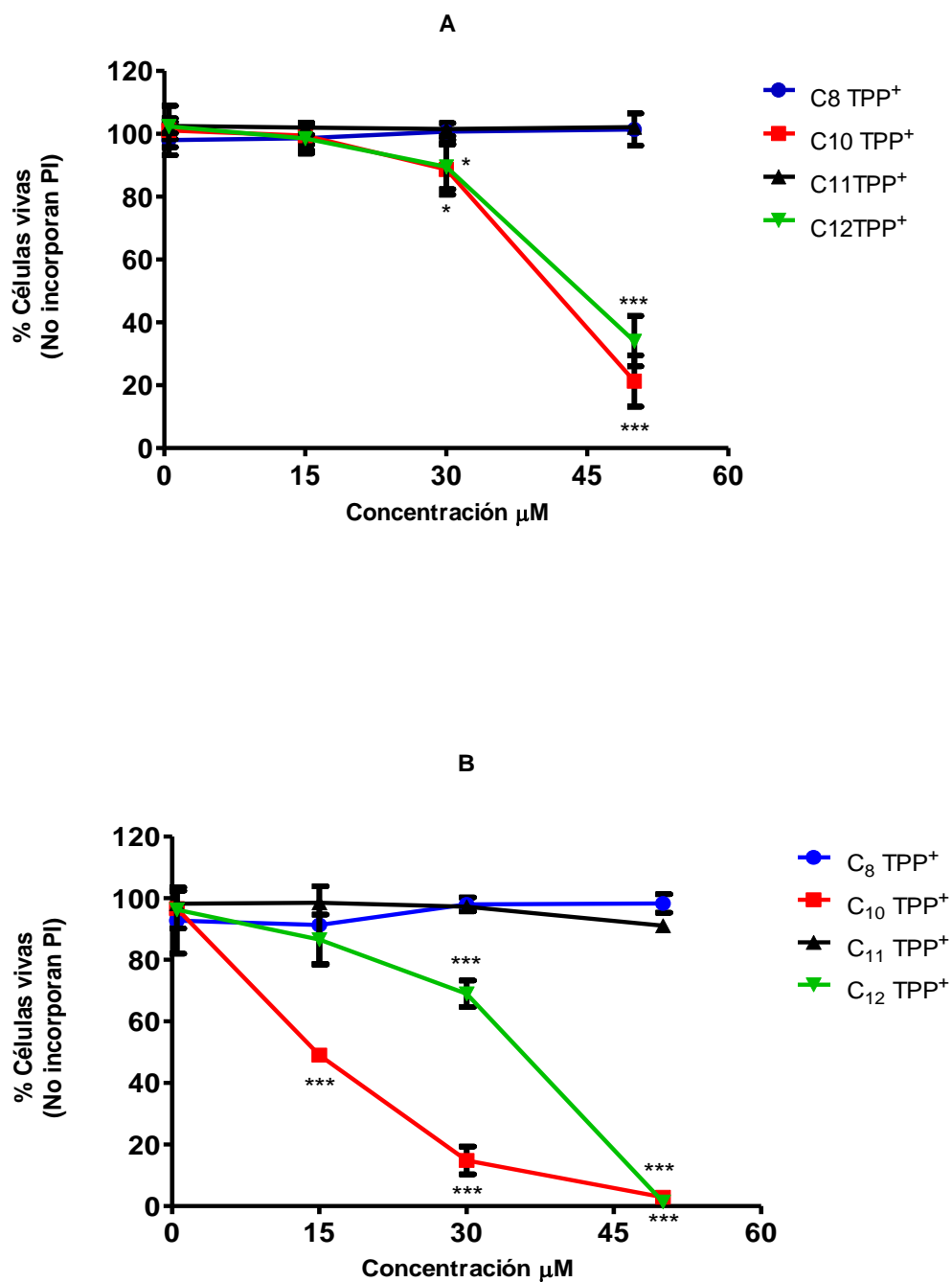


Figura 3. Incorporación de yoduro de propidio a células CCRF/CEM después del tratamiento con los cationes lipofílicos. A. 2 horas de tratamiento. **B:** 4 horas de tratamiento. El porcentaje de células vivas se calculó respecto al control. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS. Los asteriscos representan valores estadísticamente diferentes al control, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

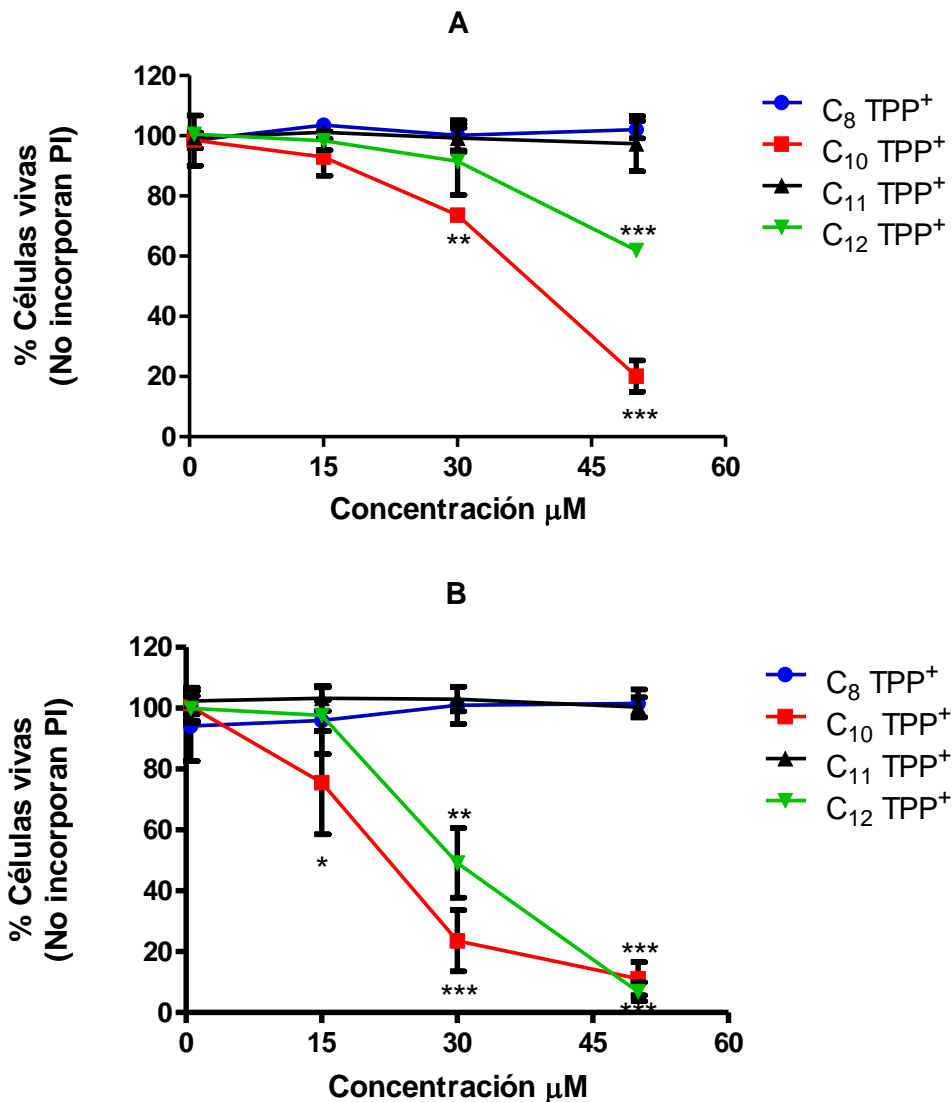


Figura 4. Incorporación de yoduro de propidio a células CEM/C2 después del tratamiento con los cationes lipofílicos. A: 2 horas de tratamiento. **B:** 4 horas de tratamiento. El porcentaje de células vivas se calculó respecto al control. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS. Los asteriscos representan valores estadísticamente diferentes al control, cuyo valor se consideró como 100%. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Dado que los cationes $C_8\text{TPP}^+$ y $C_{11}\text{TPP}^+$ no presentaron efectos citotóxicos significativos en las condiciones ensayadas, los experimentos para evaluar los mecanismos de muerte celular se realizaron sólo con los cationes $C_{10}\text{TPP}^+$ y $C_{12}\text{TPP}^+$.

Ensayo de morfología autofágica. Para evaluar cualitativamente los cambios presentados por las células TA3 al ser tratadas con los compuestos $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$ a la concentración de $15 \mu M$ durante 4 y 6 h se usó el método de tinción con naranja de acridina. Mediante esta técnica fue posible observar cambios morfológicos en las células tratadas con estos cationes. Como control se utilizó DMSO al 1%, que fue el solvente utilizado para disolver los cationes lipofílicos. Las microfotografías analizadas mostraron la aparición de “puntos rojos” que esta técnica asocia a la presencia de vesículas con pH ácido. La densidad de las vesículas ácidas, en las células tratadas con los cationes lipofílicos fue mayor que en el control tratado con DMSO. En ambos casos la integridad de las células no fue afectada (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

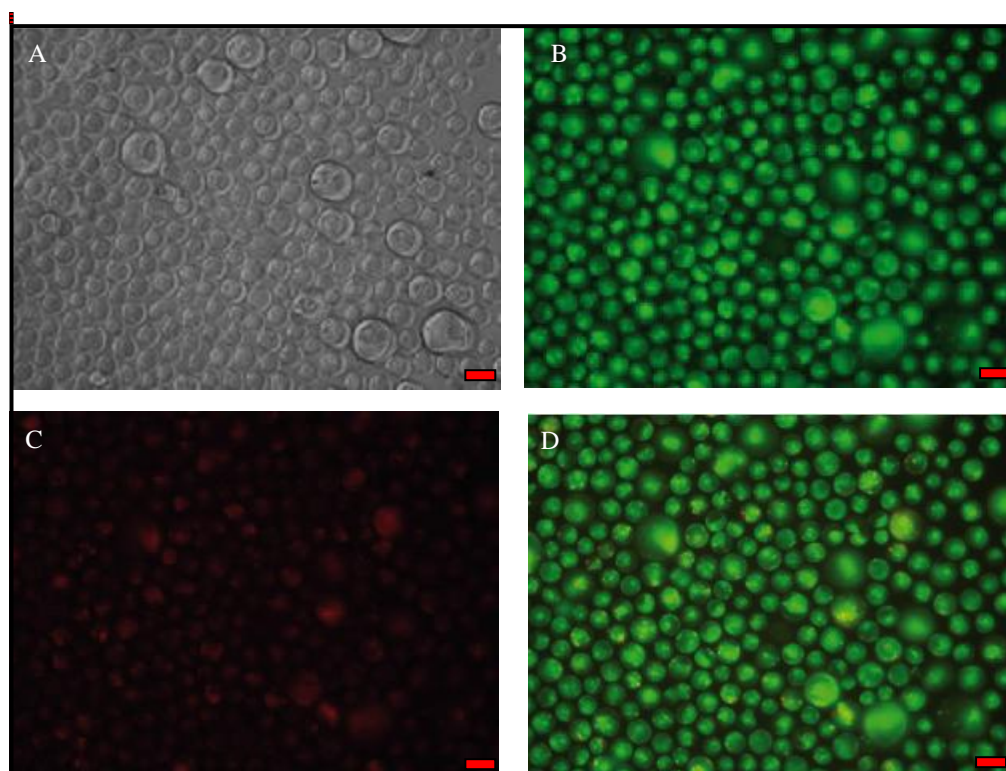


Figura 5. Células TA3 tratadas con DMSO durante 4 h. A: Fase, B: 530 nm, C: 650 nm, D: merge. Regla = 1 cm.

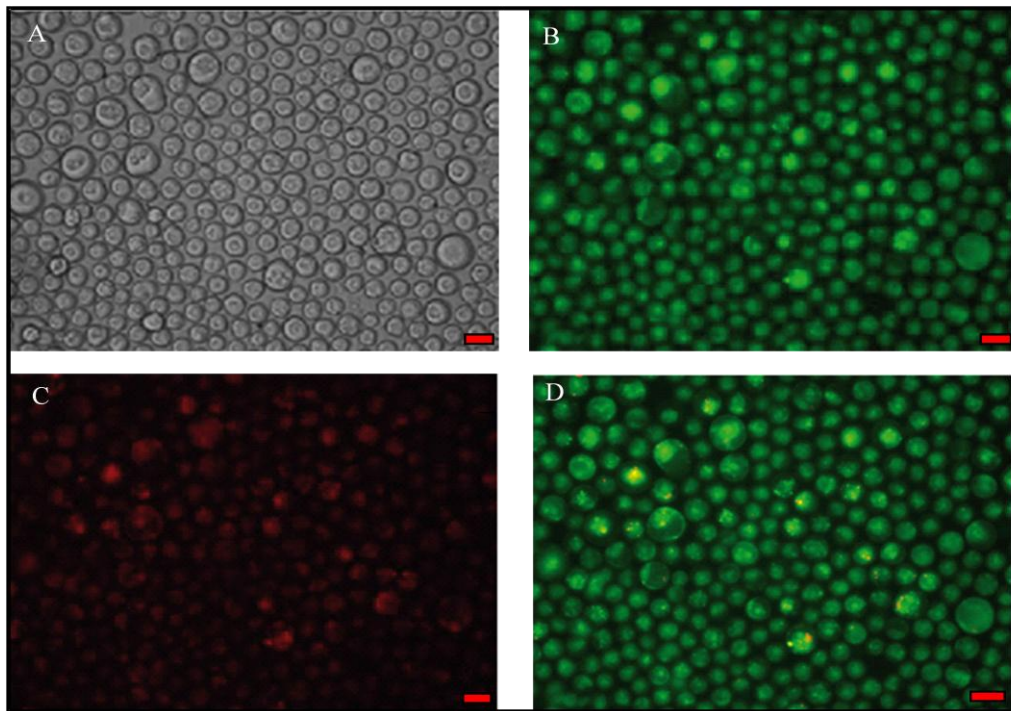


Figura 6. Células TA3 tratadas con DMSO durante 6 h. A: Phase, B: 530 nm, C: 650 nm, D: merge. Regla = 1cm.

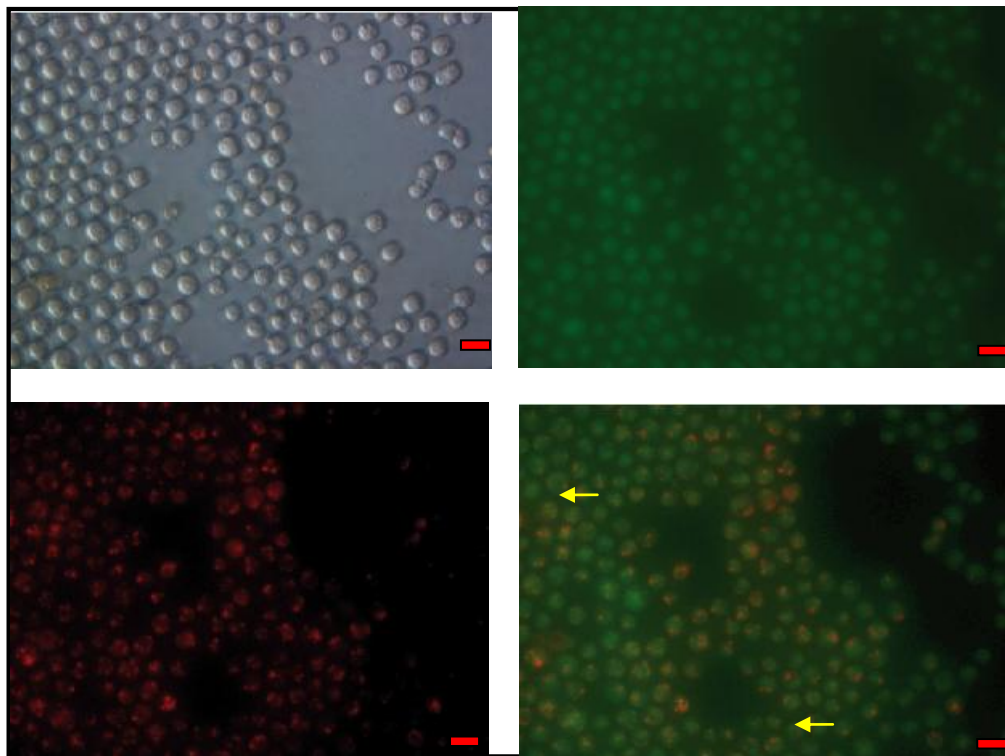



Figura 7. Células TA3 tratadas con $C_{10}TPP^+$ 15 μM durante 4 h. A: Phase, B: 530 nm, C: 650 nm, D: merge. Regla = 1cm.  Vacuolas ácidas

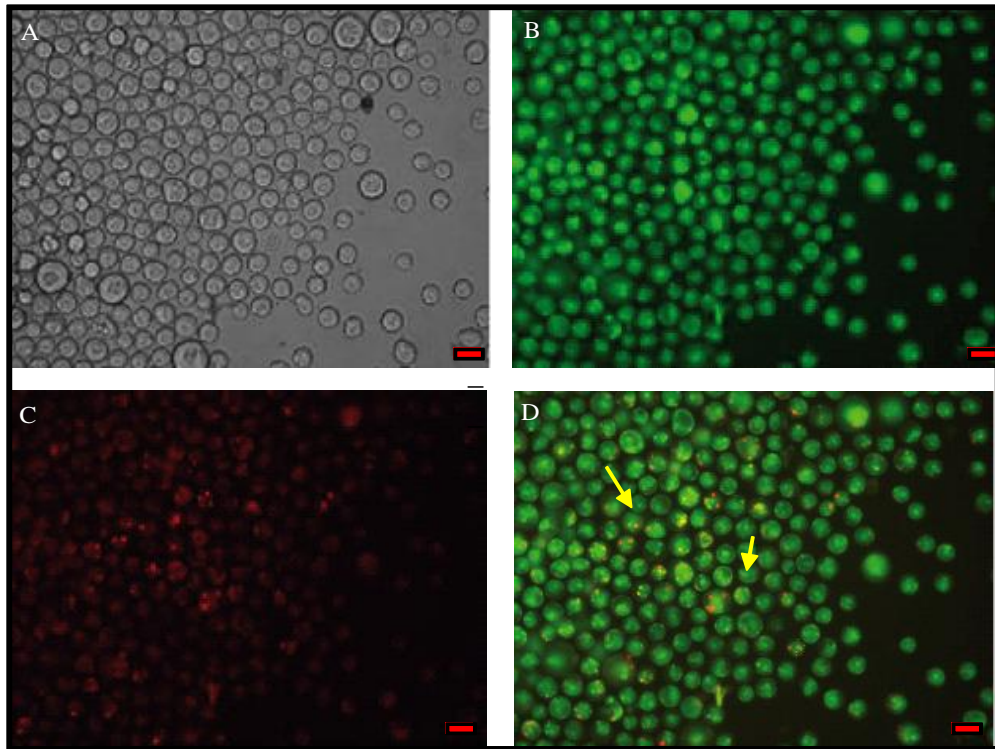


Figura 8. Células TA3 tratadas con $C_{12}TPP^+$ 15 μM durante 4 h. A: Phase, B: 530 nm, C: 650 nm, D: merge. Regla = 1cm. ➡ Vacuolas ácidas

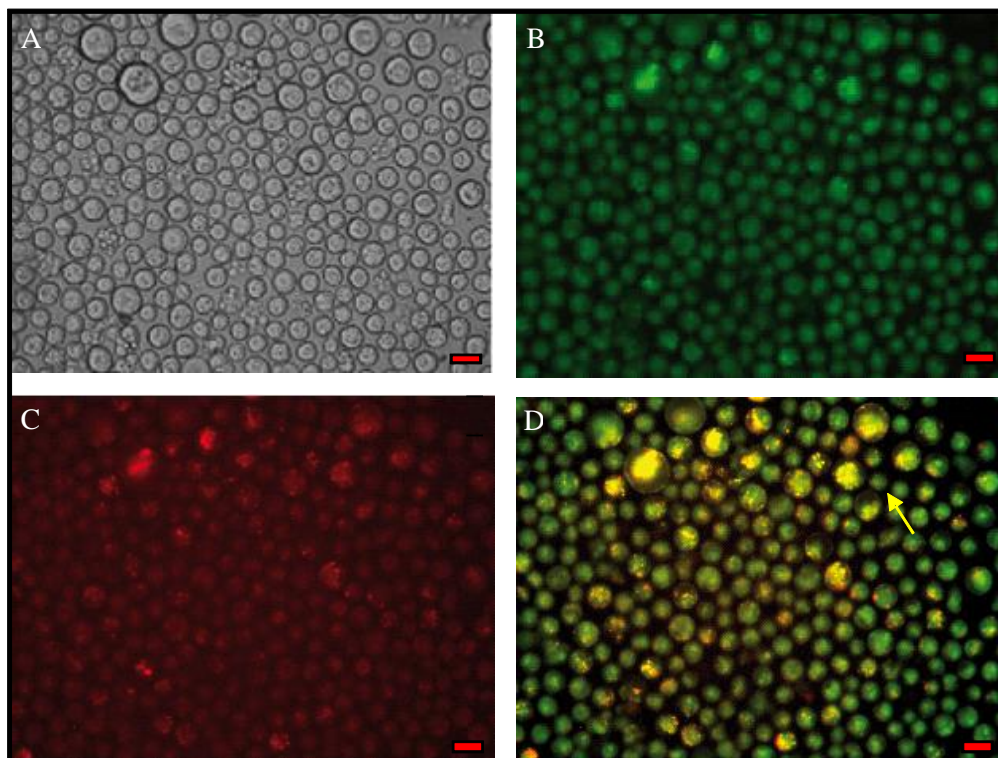


Figura 9. Células TA3 tratadas con $C_{10}TPP^+$ 15 μM durante 6 h. A: Phase, B: 530 nm, C: 650 nm, D: merge. Regla = 1cm. ➡ Vacuolas ácidas

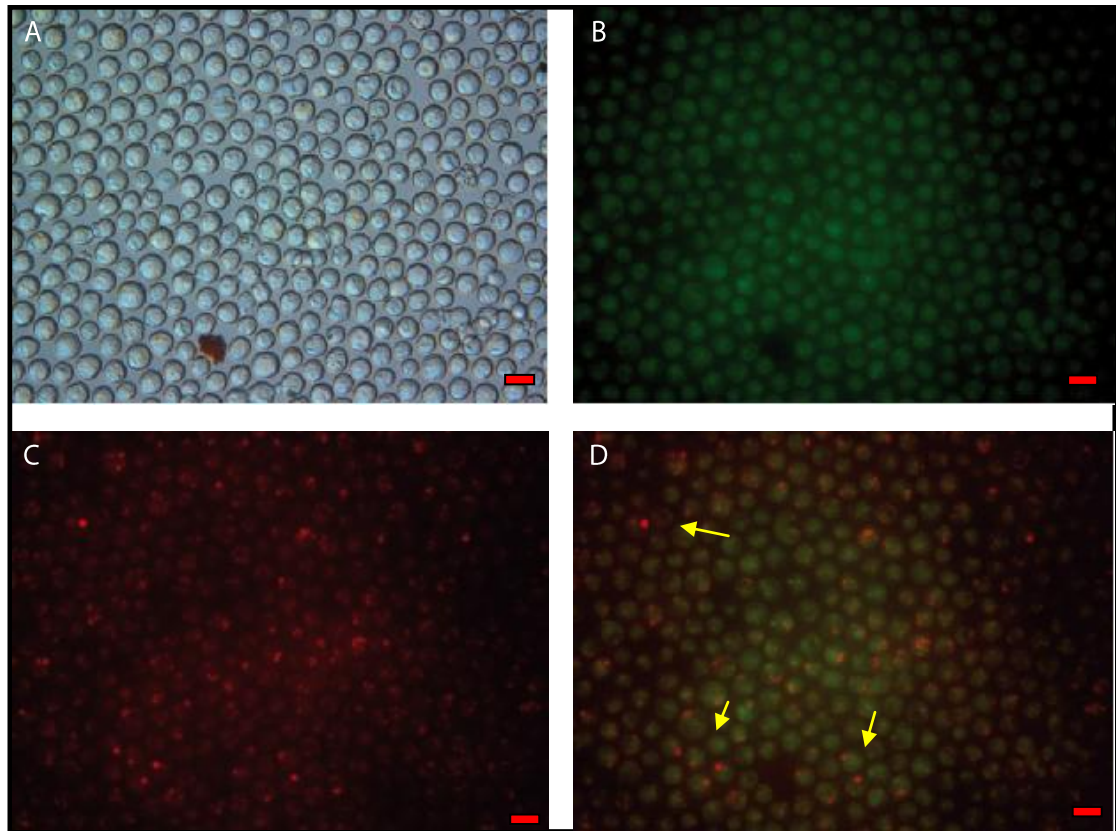


Figura 10. Células TA3 tratadas con $C_{12}TPP^+$ 15 μM durante 6 h. A: Phase, B: 530 nm, C: 650 nm, D: merge. Regla = 1cm. ➡ Vacuolas ácidas

Análisis Morfológico mediante microscopía electrónica de Transmisión.

Para observar los cambios producidos por el catión lipofílico $C_{12}TPP^+$, células TA3 fueron tratadas con el compuesto durante 6 horas utilizando como control DMSO. Estos resultados se muestran en la Figura 11. Las células control mostraron el fenotipo normal que presenta esta línea celular (Miller y cols., 1977); donde las crestas mitocondriales se vieron muy definidas e íntegras, característica importante de la célula viable. En las células tratadas con $C_{12}TPP^+$ (concentración 15 μM , durante 6 h), en cambio, las mitocondrias se percibieron muy hinchadas y las crestas mitocondriales perdieron su integridad. Se observaron además, algunas vacuolas autofágicas, y en aquellas células más afectadas, todo el citoplasma se encontró vacuolizado, aunque se mantuvo la integridad de la membrana celular.

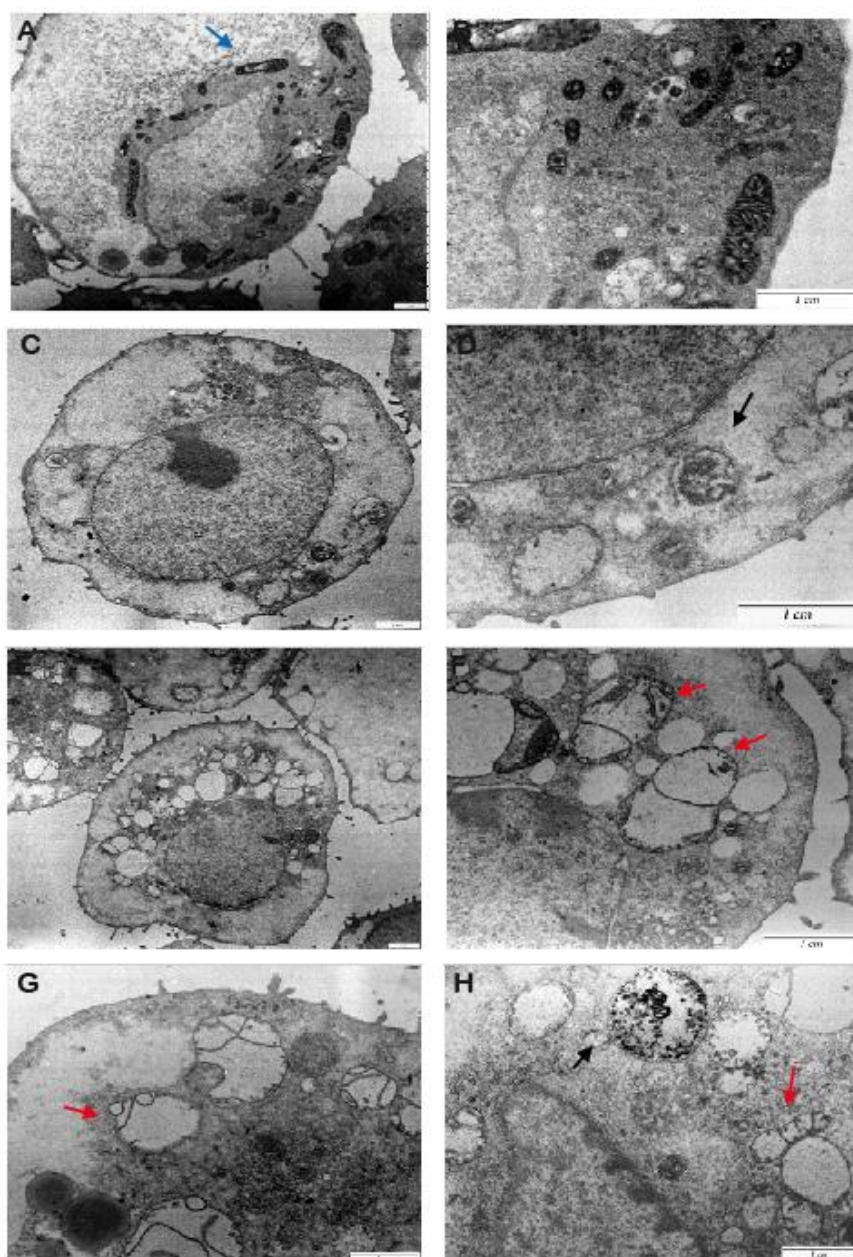


Figura 11. Micrografías electrónicas. **A:** Células control (DMSO), 4400X. **B:** A 12000X. **C:** Células TA3 tratadas con $C_{12}TPP^+$ 15 μ M, 6 h. 4400X **D:** C 12000X. **E:** Células TA3 tratadas con $C_{12}TPP^+$ 15 μ M, 6 h. 4400X. **F:** E 12000X. **G y H:** Células TA3 tratadas con $C_{12}TPP^+$ 15 μ M, 6 h. 7700X. ➡ Mitocondria normal, ➡ Mitocondria dañada, ➡ Vacuolas autofágicas. Regla = 1 cm

Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real. Se comparó la expresión de los genes gabarap, bax y gadd45 alfa en las líneas celulares TA3 y CCRF/CEM con sus respectivas variantes multiresistentes, Ya que los productos de estos genes participan en los procesos de muerte celular. El análisis de expresión relativa se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_T$. Como gen de referencia interna se usó el gen que codifica para la proteína beta -2 microglobulina (bm2), la cual forma parte del complejo MHC clase I que está presente en todas las células nucleadas. El efecto de los cationes lipofílicos sobre la expresión de los genes gabarap, bax y gadd45 alfa en las líneas celulares TA3 y CCRF/CEM con sus respectivas variantes multiresistentes se muestra en la Figura 12. Los valores estadísticos de p se obtuvieron mediante el test *t de Student* (Anexo 3).

El gen gabarap es uno de los homólogos del gen atg8 en mamíferos. Esta proteína está involucrada en distintos procesos relacionados con la formación y transporte intracelular de vesículas, incluido el proceso de autofagia (Nowak y cols., 2009). En las líneas celulares TA3 y TA3 MTX-R no se evidenciaron cambios significativos en la expresión de gabarap en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 12 A y B). El tratamiento con los cationes $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$ 15 μ M durante 2 horas no modificó la expresión del gen gabarap en las líneas celulares CCRF/CEM y su variante multiresistente CEM/C2. Sólo el tratamiento con $C_{12}TPP^+$ 15 μ M durante 6 horas modificó la expresión de gabarap en estas líneas celulares (Figura 12 C y D).

La proteína codificada para el gen bax pertenece a la familia BCL_2 y su función es promover la apoptosis. Bajo un estímulo adecuado, esta proteína cambia de conformación lo que permite su translocación hacia la membrana mitocondrial. Como consecuencia se produce la liberación de citocromo c, el cual desencadena la apoptosis promoviendo la liberación de Caspasa-3 (Duprez y cols., 2009). Existen estudios que demuestran la modulación de la respuesta apoptótica en función del cambio en los niveles de expresión de

bax (Mbazima y cols., 2008). Nuestros resultados sin embargo, no mostraron cambios significativos en la expresión del gen bax en ninguna de las líneas celulares en estudio y tampoco en las diferentes condiciones de ensayo efectuadas (Figura 12).

Los efectos más importantes se encontraron en el gen gadd45alfa. Este gen forma parte de un grupo de genes cuyos niveles transcripcionales aumentan bajo condiciones de estrés celular y bajo el tratamiento con agentes que producen daño al DNA (Referencia en línea ¹). En todas las líneas celulares en estudio se vio aumentado el nivel de expresión de este gen respecto al control (Figura 12), El mayor efecto se observó en la línea TA3, donde los niveles de expresión aumentaron aproximadamente 8 veces respecto al control después del tratamiento con C₁₂TPP⁺ 15 µM durante 6 horas. El tratamiento con C₁₀TPP⁺ 15 µM por 2 horas produjo en la línea celular TA3 un aumento de dos veces la expresión del gen gadd45alfa respecto al control. (Figura 12 A). En la variante resistente de TA3, los tratamientos con C₁₀TPP⁺ 15 µM durante 6 horas y C₁₂TPP⁺ 15 µM por 2 y 6 horas produjeron un aumento significativo en los niveles de expresión del gen gadd45alfa, siendo el tratamiento C₁₀TPP⁺ 15 µM durante 6h el que presentó el mayor efecto (Figura 12 B).

En las líneas leucémicas todas las condiciones de tratamiento ensayadas (15 µM durante 2 y 6 hora) produjeron un aumento significativo de la expresión de gadd45alfa, respecto al control (Figura 12 C y D).

Estos resultados coinciden con distintos estudios en donde se observó un aumento de la expresión del gen gadd45alfa en células tumorales en respuesta a distintos compuestos con propiedades antineoplásicas, incluido el ácido gálico (Chia y cols., 2010).

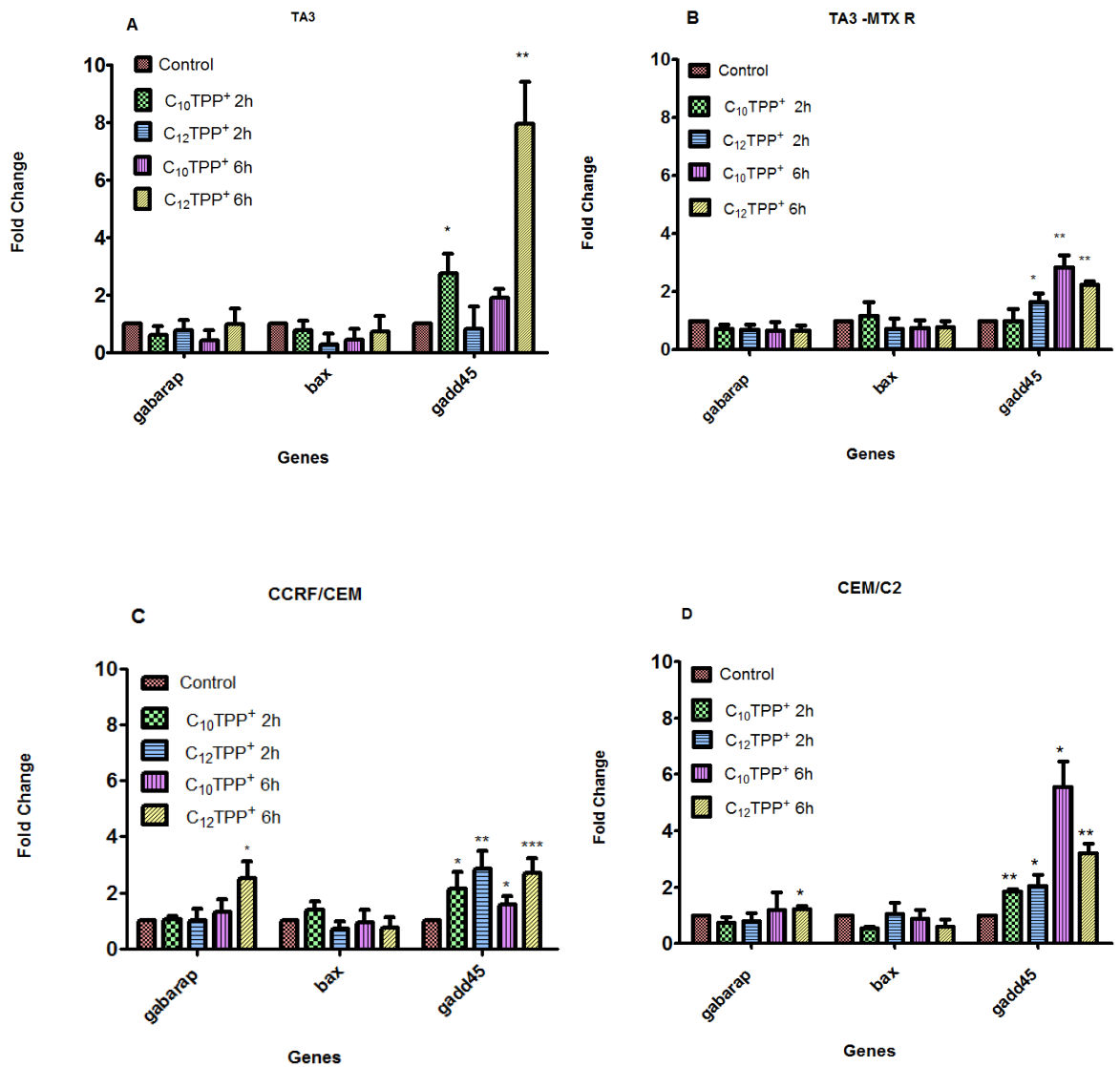


Figura 12. Análisis de la expresión de los genes gabarap, bax y gadd45 alfa en las líneas celulares TA3 y CCRF/CEM con sus respectivas variantes multiresistentes por PCR en tiempo real. Las células fueron tratadas con C₁₀TPP⁺ y C₁₂TPP⁺ 15 μM durante 2 y 6 h. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± DS. Los asteriscos representan valores estadísticamente diferentes al control, cuyo valor se consideró como 100%. ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0,05. **A:** Células TA3, **B:** Células TA3 MTX-R, **C:** Células CCRF/CEM, **D:** Células CEM/C2.

IV. DISCUSIÓN

Los distintos efectos citotóxicos y antitumorales que producen los ésteres derivados del ácido gálico, han sido ampliamente estudiados. En la línea celular de cáncer de próstata humano PC-3 el tratamiento con ácido gálico induce daño en el DNA e inhibe los genes de reparación del mismo (Liu, 2011). En células de melanoma, el tratamiento con ésteres derivados del ácido gálico produjo un aumento en la producción de radicales libres y la disminución de los niveles de GSH y ATP, lo que sugiere que los alquil galatos inducen la muerte de las células tumorales gatillando la apoptosis como consecuencia del estrés oxidativo (Locatelli, 2009). También se ha reportado que los esteres derivados del ácido gálico pueden bloquear la cadena transportadora de electrones, previniendo la síntesis de ATP y provocando la muerte celular (Frey y cols., 2007).

En este estudio quedan demostrados los efectos citotóxicos producidos por los cationes derivados del ácido. Sin embargo, los cationes de cadenas alquílicas de 8 y 11 carbonos no mostraron efectos citotóxicos significativos sobre la viabilidad celular, en nuestras condiciones de ensayo (Figuras 1, 2, 3 y 4). El efecto del largo de las cadenas carbonadas del grupo éster, que contribuye a la lipofilidad de estos compuestos, no fue evidente, por lo que no es posible establecer una clara relación estructura/actividad., Esto concuerda con estudios previos donde se relaciona el largo de la cadena alquílica de los ésteres gálicos con las diferentes interacciones con membranas, fenómeno que podría determinar finalmente si estos compuestos pueden o no atravesar la membrana celular (Takai y cols., 2011;Tammela y cols., 2004). Sin embargo, no se puede descartar la potencial actividad que presentan estos compuestos de 8 y 11 carbonos en otras condiciones de ensayo. Los compuestos $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$ mostraron efectos significativos sobre la viabilidad celular, los cuales fueron tiempo y dosis dependiente, corroborando

así, su actividad citotóxica sobre las células tumorales ensayadas (Figura 1, 2, 3 y 4). La incorporación del grupo trifenilfosfonio mantuvo y potenció los efectos citotóxicos de los alquil galatos. Los ensayos de citotoxicidad sobre las líneas tumorales multiresistentes TA3-MTX-R y CEM/C2 demostraron ser sensibles a la acción de los cationes lipofílicos $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$, aunque las concentraciones necesarias para observar efectos citotóxicos significativo, fueron mayores a las líneas pares sensibles. Al comparar las líneas TA3 y TA3-MTX -R se estima que, aumentar la concentración al doble sería suficiente para lograr los efectos observados en las líneas no resistentes, la resistencia a metotrexato informada anteriormente para esta línea celular es de 20 veces aproximadamente (Plaza y cols., 2009). Para la línea CEM/C2, la resistencia informada es de 970 veces (Referencia en línea ²), en nuestros experimentos se observa una resistencia de sólo 2 veces, aproximadamente. Por lo tanto las líneas celulares TA3-MTX-R y CEM/C2 no presentan una resistencia trascendente a la acción de los compuestos $C_{10}TPP^+$ y $C_{12}TPP^+$. Este fenómeno es importante de destacar, pues uno de los mayores impedimentos para lograr el tratamiento exitoso del cáncer es el desarrollo de resistencia a fármacos que presentan las células tumorales (Persidis, 1999).

La condición de cationes lipofílicos con carga deslocalizada que poseen las moléculas ensayadas, les confieren la capacidad de dirigirse preferentemente hacia la mitocondria (Murphy, 2008). En las imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (Figura 11), queda evidenciado el efecto directo que ejerce el compuesto $C_{12}TPP^+$ sobre la mitocondria de las células tumorales. El hinchamiento y la pérdida de la integridad de la crestas mitocondriales son características que han sido reportados por otros autores, quienes han estudiado el comportamiento de compuestos con estructura de cationes lipofílicos sobre distintos tipos de células tumorales (Delikatny y cols., 2002; Modica-Napolitano y cols., 1996). La modificación de la ultraestructura mitocondrial alteraría la permeabilidad de la membrana, provocando la

liberación de factores pro apoptóticos, gatillando así, la muerte celular (Marchetti y cols., 1996).

Además del daño mitocondrial, se observó la presencia de vacuolas ácidas, las que corresponderían a autolisosomas (Figuras 7, 8, 9, y 10). Esto implicaría la ocurrencia además, de un proceso autofágico gatillado por el catión lipofílico ensayado.

A nivel transcripcional se comprobó la capacidad de los cationes para modificar los patrones de expresión de ciertos genes relacionados con muerte celular: *gabarap*, *bax* y *gadd45alfa*. La expresión del gen *bax* no fue modificada luego del tratamiento con los cationes lipofílicos (Figura 12). Puesto que se conoce la implicancia de este gen, tanto en los procesos de apoptosis como en los de autofagia, (Yee y cols., 2009; Chia y cols., 2010) y considerando que se han reportado cambios en los niveles de expresión de este gen mediados por la acción de agentes antitumorales (Mbazima y cols., 2008), se esperaba un efecto similar con el tratamiento de cationes lipofílicos del ácido gálico. Sin embargo es importante considerar, que este resultado negativo, no descarta que los procesos de apoptosis o autofagia ocurran con el tratamiento ensayado, ni que, en otras condiciones, se puedan obtener resultados positivos.

Para el gen *gabarap*, se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión en las líneas celulares leucémicas humanas CCRF/CEM y CEM/C2, línea resistente (Figura 12 C y D) Dado que el gen *gabarap* es importante en el proceso de autofagia, su regulación positiva como consecuencia del efecto inducido por el catión $C_{12}TPP^+$, indicaría que este tratamiento gatilla el proceso de autofagia en las condiciones de este estudio. En la línea celular TA3 y su variante resistente no se evidenciaron cambios significativos en los niveles de expresión del gen *gabarap*, aun cuando señales

de autofagia se observaron en los ensayos de microscopia electrónica y naranja de acridina para esta línea. Ambos ensayos mostraron un proceso de autofagia avanzado, donde los cambios transcripcionales responsables de gatillar este fenotipo debiesen haber ocurrido previamente. Las condiciones ensayadas no permitieron evidenciar los posibles cambios en los niveles de expresión del gen *gabarap*; sin embargo, estos resultados no descartan el posible aumento en la expresión de este gen. Probablemente, nuevas condiciones de ensayo en donde el proceso autofágico no se encuentre tan avanzado, podrían dilucidar este postulado.

El estudio del gen *gadd45alfa* mostró cambios significativos en sus niveles de expresión en ambas líneas celulares ensayadas (TA3 y CCRF/CEM) incluidas sus variantes multiresistentes (Figura 12 A, B, C y D). Se ha reportado la sobre expresión de este gen en respuesta al tratamiento con agentes genotóxicos, que resulta en inducción de la apoptosis (Li y cols., 2004). Además, se ha observado un aumento en los niveles de expresión de este gen en respuesta al tratamiento con el fármaco docetaxel (Ramachandran y cols., 2009) Los efectos pro-apoptóticos que desencadenan la sobre expresión de *gadd45alfa*, podrían estar relacionados con la inducción de la proteína *Gadd45alfa*. Este fenómeno produciría la disociación de la proteína *Bim* (miembro de la familia *Bcl2*), la cual se transloca a la mitocondria, donde su acumulación aumenta la interacción *Bim/Bcl2*, liberando a *Bax* para ejercer su efecto pro-apoptótico. Los efectos de la sobre expresión del gen *gadd45alfa* representan parte importante del mecanismo por el cual los cationes lipofílicos derivados del ácido gálico ejercen su acción citotóxica.

V. CONCLUSIONES

Todos los resultados obtenidos avalan el potencial efecto antitumoral de los cationes lipofílicos derivados del ácido gálico. Cabe señalar que tanto los procesos de apoptosis, autofagia y necrosis pueden ser gatillados paralelamente por los cationes lipofílicos, dependiendo de la severidad de las condiciones de ensayo.

El mecanismo por el cual ejercen estos compuestos su acción, estaría relacionado con su estructura química: la carga catiónica que le da especificidad hacia la mitocondria de la célula tumoral, la lipofilicidad dada por la cadena alquílica, y la actividad citotóxica del ácido gálico. El efecto mitocondriotrópico hacia las células tumorales, les conferiría una especificidad por dichas células, característica que no aparece en los actuales fármacos antitumorales. Es nuestra tarea, entonces, ampliar el estudio de estas moléculas para explotar al máximo su potencial como fármaco antineoplásico mitocondriotrópico.

VI. REFERENCIAS

Altenberg, B. & Greulich, K. (2004), 'Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes', *Genomics* **84**(6), 1014–1020.

Armstrong, J. S. (2007), 'Mitochondrial Medicine: Pharmacological targeting of mitochondria in disease', *British Journal of Pharmacology* **151**, 1154-1165.

Chen, L. B. (1988), 'Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells' *Annual Review of Cell Biology* **4**, 155-181.

Chia YC., Rajbanshi, R., Calhoun, C & Chiu, R. H. (2010.), 'Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of toona sinensis leaf extract, on oral squamous carcinoma cells.', *Molecules* **15**, 8377- 8389.

Davis, S., Weiss, M. J., Wong, J. R., Lampidis, T. J. & Chen, L. B. (1985), 'Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived mcf-7 cells.', *Journal of Biological Chemistry* **260**(25), 13844–50.

Delikatny, E. J., Cooper, W. A., Brammah, S., Sathasivam, N. & Rideout, D. C. (2002), 'Nuclear magnetic resonance-visible lipids induced by cationic lipophilic chemotherapeutic agents are accompanied by increased lipid droplet formation and damaged mitochondria', *Cancer Research* **62**(5), 1394–1400.

Dengler, W.A., Schulte, J., Berger, D.P., Mertelsmann, & Fiebig, H.H. (1995.), 'Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays', *Anti Cancer Drugs* **6**(4),522-32.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. V. & Vandenabeele, P. (2009), 'Major cell death pathways at a glance', *Microbes and Infection* **11**(13), 1050 – 1062.

Edinger, A. L. & Thompson, C. B. (2004), 'Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy', *Current Opinion in Cell Biology* **16**(6), 663 – 669.

Eswaran, J., Cyanam, D., Mudvari, P., Reddy, S. D. N., Pakala, S. B., Nair, S. S., Florea, L., Fuqua, S. A. W., Godbole, S. & Kumar, R. (2012), 'Transcriptomic landscape of breast cancers through mRNA sequencing', *Scientific Report*. **2**, 264.

Frey, C., Pavan, M., Cordano, G., Muñoz, S., Rivera, E., Medina, J., Morello, A., Maya, D., Ferreira J. (2007), 'Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes' *Comparative Biochemistry and Physiology* **146**, 520–527.

Hanahan, D. & Weinberg, R. (2011), 'Hallmarks of cancer: The next generation'. *Cell* **144**(5), 646-674.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996), 'Real time quantitative pcr.', *Genome Research* **6**(10), 986–994.

Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., Jiang, B.Y. & Chen Y.(1995), 'Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid.' *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **18**(11), 1526-30.

Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T., Sakaguchi, N., Ogihara, Y. & Yabu, Y. (1994), 'Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in hl-60rg cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **204**(2), 898 – 904.

Ji, B., Hsu, W., Yang, J., Hsia, T., Lu, C., Chiang, J., Yang, J., Lin, C, Lin, J, Suen, L., Gibson, W. & Chung, J.(2009) 'Gallic Acid Induces Apoptosis via Caspase-3 and Mitochondrion-Dependent Pathways in Vitro and Suppresses Lung Xenograft Tumor Growth in Vivo' *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 7596-7604.

Jurišić V. & Bumbaširević V. (2008) 'In vitro assays for cell death determination' *Archive of Oncology* **16**(3), 49-54.

Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., Kondo, S. & Germano, I. (2003), 'Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide', *Cancer Research* **63**(9), 2103–2108.

Kiaris, H. & Schally, A. V. (1999), 'Apoptosis versus necrosis: Which should be the aim of cancer therapy?' *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* **221**(2), 87–88.

Klionsky, D. J., Cuervo, A. M. & Seglen, P. O. (2007), 'Methods for monitoring autophagy from yeast to human', *Autophagy* **3**, 181–206.

Koppan, M., Nagy, A., Schally, A. V., Arencibia, J. M., Plonowski, A. & Halmos, G. (1998), 'Targeted cytotoxic analogue of somatostatin an-238 inhibits growth of androgen-independent dunning r-3327-at-1 prostate cancer in rats at nontoxic doses', *Cancer Research* **58**(18), 4132–4137.

Kourtis, N. & Tavernarakis, N. (2008), 'Autophagy and cell death in model organisms', *Cell Death Differ* **16**(1), 21–30.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. & Melino, G. (2009), 'Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009', *Cell Death Differ* **16**(1), 3–11.

Li, Y., Li, X., Hussain, M. & Sarkar, F. (2004), 'Regulation of microtubule, apoptosis, and cell cycle-related genes by taxotere in prostate cancer cells analyzed by microarray.', *Neoplasia* **6**(2), 158–167.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001), 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method', *Methods* **25**(4), 402 – 408.

Locatelli, C.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J. & Creczynski-Pasa, T. B. (2009), 'Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death', *Chemico-Biological Interactions* **181**, 175 - 184

Liu, K.C., Ho, H.C, Huang, A.C, Ji, B.C., Lin, H.Y., Chueh, F.S., Yang, J.S., Lu, C.C., Chiang, J.H., Meng & M., Chung, J.G. (2011), 'Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells', *Environmental Toxicology* , Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).DOI 10.1002/tox.20752

Madar, I., Weiss, L. & Izbicki, G. (2002), 'Preferential accumulation of (3)H-tetraphenylphosphonium in Non-small cell lung carcinoma in mice: Comparison with 99mTc-mibi', *Journal of Nuclear Medicine* **43**(2), 234–238.

Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M. & Kroemer, G. (1996) 'Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis', *Journal of Experimental Medicine* **184**(3), 1155-1160.

Mbazima, V., Mokgotho, M. ,1, February, F., Rees J., & Mampuru L (2008) 'Alteration of Bax-to-Bcl-2 ratio modulates the anticancer activity of methanolic extract of *Commelina benghalensis* (Commelinaceae) in Jurkat T cells'. *African Journal of Biotechnology* **7** (20), 3569-3576.

Millard, M., Pathania, D., Shabaik, Y., Taheri, L., Deng, J. (2010) 'Preclinical Evaluation of Novel Triphenylphosphonium Salts with Broad-Spectrum Activity.' *PLoS ONE* **5**(10), e13131.

Miller, S.C., Hay, E.D. & Codington, J. F. (1977), 'Ultrastructural and histochemical differences in cell surface properties of strain-specific and nonstrain-specific TA3 adenocarcinoma cells.' *The Journal of Cell Biology* **72**(3), 511-29.

Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. (2010), 'Methods in mammalian autophagy research', *Cell* **140**(3), 313 – 326.

Modica-Napolitano, J. S. & Singh, K. K. (2004), 'Mitochondrial dysfunction in cancer', *Mitochondrion* **4**(5-6), 755–762.

Modica-Napolitano, J. S.; Koya, K.; Weisberg, E.; Brunelli, B. T.; Li, Y. & Chen, L. B. (1996) 'Selective Damage to Carcinoma Mitochondria by the Rhodacyanine MKT-077', *Cancer Research* **56**, 544-550.

Murphy, M. P. (2008), 'Targeting lipophilic cations to mitochondria', *Biochimica et Biophysica Acta* **1777**, 1028–1031.

Nowak, J., Archange, C., Tardivel-Lacombe, J., Pontarotti, P., Pabusque, M.J., Vaccaro, M. I., Velasco, G., Dagorn, J. & Iovanna, J. (2009) 'The TP53INP2 Protein Is Required for Autophagy in Mammalian Cells'. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 870-881

Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D. & Yahalom, J. (2001), 'A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles', *Cancer Research* **61**(2), 439–444.

Pedersen, P. (2007^a), 'The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: An overview', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**, 1–12.

Pedersen, P. (2007^b), 'Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers most common phenotypes, the Warburg Effect, i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**, 211-222.

Plaza, C., Pavani, M., Araya-Maturana, R., Pezoa, J., Maya, J., Morello, A., Becker, M., DE Loannes, A., & Ferreira, J. (2009) 'Chemosensitizing effect of nordihydroguaiaretic acid and its tetra-acetylated derivative on parental and multiresistant TA3 mouse mammary adenocarcinoma cells' *In Vivo* 23(6), 959-967.

Persidis, A., (1999), 'Cancer multidrug resistance', *Nature Biotechnology* **17**, 94 – 95.

Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G. & Gabai, V. L. (2003), 'Necrosis: a specific form of programmed cell death?', *Experimental Cell Research* **283**(1), 1 – 16.

Rabinowitz, J. D. & White, E. (2010), 'Autophagy and metabolism', *Science* **330**, 1344–1348.

Ramachandran, K., Gopisetty, G., Gordian, E., Navarro, L., Hader, C., Reis, I. M., Schulz, W. A. & Singal, R. (2009), 'Methylation-Mediated Repression of *GADD45α* in Prostate Cancer and Its Role as a Potential Therapeutic Target', *Cancer Research* **69**(4), 1527- 1535.

Ross, M. Kelso, G., Kelso, G., Blaikie, F., James, A., Cocheme, H., Filipovska, A., Da Ros, T., Hurd, T., Smith R. & Murphy, M. (2005) 'Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology', *Biochemistry* **70**(2), 222-230.

Rosignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J. & Capaldi, R. A. (2004), 'Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells', *Cancer Research* **64**(3), 985–993.

Takai, E., Hirano, A & Shiraki, K. (2011), 'Effects of alkyl chain length of gallate on self-association and membrane binding.', *J Biol Chem* **150**(2), 165–171.

Tammela, P., Laitinen, L., Galkin, A., Wennberg, T., Heczko, R., Vuorela, H., Slotte, J. & Vuorela, P. (2004), 'Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in caco-2 cells and in phospholipid vesicles', *Archives of Biochemistry and Biophysics* **425**(2), 193 – 199.

Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009), 'Rna-seq: a revolutionary tool for transcriptomics', *Nature Reviews Genetics* **10**(1), 57–63.

Warburg, O. (1956), 'On respiratory impairment in cancer cells', *Science* **124**, 269–270.

Yee, K. S., Wilkinson, S., James, J., Ryan, K. M. & Vousden, K. H. (2009), 'Puma- and bax-induced autophagy contributes to apoptosis', *Cell Death Differ* **16**(8), 1135–1145.

Zeiss, C. J. (2003), 'The apoptosis-necrosis continuum: Insights from genetically altered mice', *Veterinary Pathology Online* **40**(5), 481–495.

Zong, W.X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z.Q. & Thompson, C.B. (2004), 'Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death', *Genes & Development* **18**(11), 1272–1282.

Zong, W.-X. & Thompson, C. B. (2006), 'Necrotic death as a cell fate', *Genes & Development* **20**(1), 1–15.

Referencias en linea.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1647>

² <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2264&Template=cellBiology>

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de preparación de células aisladas para MET.

Prof. Nancy Olea R. Unidad de Microscopía Electrónica - Cesat

1. Fijación del pellet en Glutaraldehído 3% en buffer fosfato de Sörensen 0,1M, pH 7,3 ; 4°C, durante toda la noche.
 - Centrifugación a 1500 rpm durante 8 minutos para realizar cada cambio de solución.
2. Lavados 3X , 20 min en buffer fosfato de Sörensen.
3. Posfijación en tetróxido de osmio 2%,1h a temperatura ambiente.
4. Lavados 3X , 10 min en buffer fosfato de Sörensen.
5. Deshidratación en alcoholes graduados: 40,70 ,90 y 2 x100 etanol, 2X acetona, 8 min cada uno.
6. Impregnación Epon 812 / Acetona 1:1 durante 1 hora.
7. Inclusión en Epon y polimerización 48h a 70°C
8. Realización de cortes de 1 μ m teñidos con azul de toluidina 1% en borato de sodio 1% para localizar área de corte fino. Ultramicrótomo Sorvall Porter Blum MT2.
9. Cortes finos de 600 A⁰ recogidos en grillas de 200 mesh, teñidos con tinción doble de uranilo y plomo.
10. Observación en el MET Zeiss EM 109.

Anexo 2: Tabla *p value* figuras 1, 2, 3 y 4. Incorporación de yoduro de propidio a células tumorales.

Ta3 2h	p value 0,5µM	p value 15µM	p value 30µM	p value 50µM
C8	0,5607	0,4203	0,6223	0,3329
C10	0,1449	0,0212	0,0004	P<0.0001
C11	0,4848	0,1410	0,4211	0,3119
C12	0,3254	0,7374	0,0008	0,00020
TA3 4h				
C8	0,2049	0,0802	0,6670	0,3991
C10	0,3214	0,0223	0,0008	0,0005
C11	0,6478	0,8917	0,4692	0,1772
C12	0,6445	0,3616	0,0001	P<0.0001
TA3 MTX-R 2h				
C8	0,3813	0,4859	0,8017	0,2650
C10	0,9435	0,2778	0,0007	0,0006
C11	0,3997	0,5978	0,5208	0,3660
C12	0,7725	0,1733	0,8260	0,0087
TA3 MTX-R 4h				
C8	0,9087	0,7053	0,5662	0,4055
C10	0,4970	0,0158	0,0002	0,0007
C11	0,5716	0,5319	0,7465	0,7226
C12	0,8989	0,2752	0,0018	0,0005

CCRF/CEM 2h				
C8	0,9144	0,7253	0,4414	0,2581
C10	0,4290	0,6698	0,0107	0,0002
C11	0,9516	0,7215	0,5292	0,6068
C12	0,4717	0,4410	0,0296	0,0005
CCRF/CEM 4h				
C8	0,5150	0,5061	0,2656	0,5747
C10	0,0557	0,0008	0,0009	P<0.0001
C11	0,2569	0,3447	0,1548	0,4070
C12	0,4060	0,1035	0,0024	P<0.0001
CEM/C2 2h				
C8	0,7733	0,0517	0,9689	0,3459
C10	0,4308	0,1836	0,0015	P<0.0001
C11	0,3210	0,5876	0,8518	0,7547
C12	0,4061	0,2713	0,1928	0,0003
CEM/C2 4h				
C8	0,3864	0,5075	0,7728	0,5536
C10	0,8360	0,0321	P<0.0001	P<0.0001
C11	0,3605	0,2167	0,2349	0,8494
C12	0,9783	0,3001	0,0030	P<0.0001

Anexo 3: Tabla *p value* Figura 12. Análisis de la expresión de los genes gabarap, bax y gadd45 alfa en las líneas celulares tumorales.

TA3	P value	TA3 MTX-R	P value
gabarap C10TPP ⁺ 2h	0,7430	gabarap C10TPP ⁺ 2h	0,1013
bax C10TPP ⁺ 2h	0,2709	bax C10TPP ⁺ 2h	0,5954
gadd45α C10TPP ⁺ 2h	0,0195	gadd45α C10TPP ⁺ 2h	0,9475
gabarap C12TPP ⁺ 2h	0,231	gabarap C12TPP ⁺ 2h	0,1020
bax C12TPP ⁺ 2h	0,1052	bax C12TPP ⁺ 2h	0,3077
gadd45α C12TPP ⁺ 2h	0,1988	gadd45α C12TPP ⁺ 2h	0,0496
gabarap C10TPP ⁺ 6h	0,0645	gabarap C10TPP ⁺ 6h	0,0617
bax C10TPP ⁺ 6h	0,5958	bax C10TPP ⁺ 6h	0,2595
gadd45α C10TPP ⁺ 6h	0,7575	gadd45α C10TPP ⁺ 6h	0,0032
gabarap C10TPP ⁺ 6h	0,9879	gabarap C10TPP ⁺ 6h	0,0823
bax C10TPP ⁺ 6h	0,2908	bax C10TPP ⁺ 6h	0,1208
gadd45α C10TPP ⁺ 6h	0,0024	gadd45α C10TPP ⁺ 6h	0,0034
CCRF/CEM	P value	CEM/C2	P value
gabarap C10TPP ⁺ 2h	0,4431	gabarap C10TPP ⁺ 2h	0,1535
bax C10TPP ⁺ 2h	0,0948	bax C10TPP ⁺ 2h	0,4423
gadd45α C10TPP ⁺ 2h	0,0330	gadd45α C10TPP ⁺ 2h	0,0029
gabarap C12TPP ⁺ 2h	0,9448	gabarap C12TPP ⁺ 2h	0,3410
bax C12TPP ⁺ 2h	0,0982	bax C12TPP ⁺ 2h	0,8178
gadd45α C12TPP ⁺ 2h	0,0029	gadd45α C12TPP ⁺ 2h	0,0148
gabarap C10TPP ⁺ 6h	0,3960	gabarap C10TPP ⁺ 6h	0,6322
bax C10TPP ⁺ 6h	0,8172	bax C10TPP ⁺ 6h	0,6127
gadd45α C10TPP ⁺ 6h	0,0320	gadd45α C10TPP ⁺ 6h	0,0129
gabarap C10TPP ⁺ 6h	0,0469	gabarap C10TPP ⁺ 6h	0,0485
bax C10TPP ⁺ 6h	0,2478	bax C10TPP ⁺ 6h	0,1120
gadd45α C10TPP ⁺ 6h	0,0010	gadd45α C10TPP ⁺ 6h	0,0096

*Esta tesis ha sido financiada por los proyectos FONDECYT 1090075 y ANILLO ACT
112.*