

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“ÉSTERES DE LOS ÁCIDOS PROTOCATECUICO Y GENTÍSICO, CON TROPISMO MITOCONDRIAL, COMO POTENCIALES AGENTES CITOTÓXICOS EN CÉLULAS DE CÁNCER MAMARIO HUMANO”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctor en Farmacología**

**Por:**

**CRISTIAN SANDOVAL ACUÑA**

**Director de Tesis**

**Dr. Jorge Ferreira Parker**

**Co-director de Tesis**

**Dr. Hernán Speisky Cosoy**

**SANTIAGO- CHILE  
2016**

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

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

**Cristian Sandoval Acuña**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 24 de Noviembre de 2016.

**Directores de Tesis:**

Dr. Jorge Ferreira P. \_\_\_\_\_

Dr. Hernán Speisky C. \_\_\_\_\_

**Comisión Informante:**

Dr. Marcelo Kogan B. (Presidente) \_\_\_\_\_

Dra. Lilian Jara S. \_\_\_\_\_

Dra. María Inés Becker C. \_\_\_\_\_

Dr. Luis Valladares B. \_\_\_\_\_

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

**Marie Curie**

“La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" sino 'Es extraño...!'.”

**Isaac Asimov**

“RWGWGWARAGHHHHWWRGG  
WRWRW.”

**Chewbacca**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis directores de Tesis, por su apoyo, enseñanzas y consejos en este largo, pero reconfortante camino.*

*A mi comisión de tesis por su mirada crítica, por siempre empujarme a pensar más allá y no conformarme con lo sencillo, por sus consejos y guía.*

*A mi madre, siempre presente, por su amor y sus palabras, siempre justas, siempre cálidas, siempre a tiempo. A mi padre por su amor, por su apoyo, por creer en mí siempre.*

*A mis hermanos Pablo y Llacolén por demostrarme que la distancia no es sino un número, por su amor incondicional y su alegría interminable. Gracias por ser parte de mí, por ayudarme a crecer y acompañarme durante toda mi vida, y por ser un constante ejemplo. Los amo mucho.*

*A mi tío Ricardo, mi tía Sandy y mis primos Martín y Macarena, por ser un pilar durante mi vida en Chile, por ayudarme a vivir lejos de mi familia, y por su amor inmenso. Ustedes son parte vital de lo que hoy he conseguido.*

*A toda mi familia repartida alrededor del mundo, por siempre creer en mí y acompañarme en cada paso de mi vida, por hacerme sentir querido y apoyado. La alegría de ser parte de ustedes no se puede expresar con palabras.*

*A mis abuelas Sylvia y Elsa, por ser mis segundas madres. A mis abuelos Héctor y Eduardo, por ser un ejemplo de la clase de hombre que espero algún día llegar a ser.*

*A mis suegros Jorge y María Eugenia, a mis cuñados Coke y Dani, a mi nueva abuela Jovita y a mis cuñados Víctor e Irina, la nueva familia que el amor me dio, gracias por quererme tal como soy desde el primer momento, por hacerme sentir como en casa junto a ustedes y por su amor sin fronteras.*

*A mis compañeros del laboratorio, Seba, Lili, Michel, Caro, Vicky, José, Dany, Fabi, Mabel, gracias por hacer de cada día una nueva alegría, por sufrir y celebrar conmigo y por sus sabios consejos.*

*A mis compañeros de doctorado, por las risas, por hacer que me echen de clases, por los coffee breaks, por las enseñanzas y los estudios interminables, por compartir conmigo triunfos y sinsabores.*

*A mis compañeros de vóley, por enseñarme el valor de la amistad y el compromiso por un ideal común.*

*A mis amigos, por su compañía y apoyo constante.*

*To my new Czech friends, thank you for your awesome welcome, for all the help in the hardest adventure of my life, thanks for all the laughs and great conversations, thank you for making me feel home at 12.000 km from home.*

*Finalmente, pero aún más importante, gracias al amor de mi vida, gracias Nati por hacer de mí cada día una mejor persona, por mantenerme gordito, por reírte de mis tonteras y por aceptar compartirlo todo conmigo, por las aventuras que pasaron y por las que vendrán, simplemente gracias por amarme tanto como yo te amo a ti. Mis triunfos son tanto tuyos como míos y amo que seas parte de ellos.*

### **Publicación de la tesis**

**2016: Sandoval-Acuña C.**, Fuentes-Retamal S., Guzmán-Rivera D., Peredo-Silva L., Madrid-Rojas M., Rebolledo S., Castro-Castillo V., Pavani M., Catalán M., Maya J.D., Jara J.A., Parra E., Calaf G.M., Speisky H., Ferreira J. “*Destabilization of mitochondrial functions as a target against breast cancer progression: Role of TPP+-linked-polyhydroxybenzoates*”. Toxicol Appl Pharmacol. (2016) 309:2-14.

### **Publicaciones en el periodo doctoral**

**2013:** Aliaga M.E., Andrade-Acuña D., López-Alarcón C., **Sandoval-Acuña C.**, Speisky H. “*Cu(II)-disulfide complexes display simultaneous superoxide dismutase- and catalase-like activities*”. J Inorg Biochem. (2013) 129:119-26.

**2014: Sandoval-Acuña C.**, Ferreira J., Speisky H. “*Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions*”. Arch Biochem Biophys. (2014) 559:75-90.

**2014:** Aliaga M.E., **Sandoval-Acuña C.**, López-Alarcón C., Fuentes J., Speisky H. “*Cu(II)-disulfide complexes with superoxide dismutase- and catalase-like activities protect mitochondria and whole cells against oxidative stress*”. Free Radic Biol Med. (2014) 75 Suppl 1:S50.

**2016:** Peredo-Silva L., Fuentes-Retamal S., **Sandoval-Acuña C.**, Pavani M., Castro-Castillo V., Madrid-Rojas M., Rebolledo S., Parra E., Maya J.D., Kemmerling U., Ferreira J. “*Alkylgallate triphenylphosphonium-derivatives exhibit antitumor activity in a syngeneic murine model of mammary adenocarcinoma*”. Reenviada a la revista *Molecular Cancer Therapeutics* tras la segunda revisión.

### **Pasantía**

Realizada en el Laboratorio de Resistencia Tumoral del Instituto de Biotecnología, en la Academia Checa de Ciencias, Praga, República Checa, entre Septiembre de 2015 y Enero de 2016, bajo la tutela del Dr. Jaroslav Truksa.

## **Presentaciones en Congresos**

### **Nacionales:**

- **Sandoval-Acuña C.**, Fuentes-Retamal S., Guzmán-Rivera D., Pavani M., Speisky H., Castro-Castillo V., Madrid-Rojas M., Ferreira J. Efecto desacoplante mitocondrial de los ácidos gentísico y protocatecuico unidos a cationes lipofílicos deslocalizados y su potencial citotoxicidad en células de cáncer mamario humano. XXXVI CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD DE FARMACOLOGIA DE CHILE. Noviembre 5-7, 2014. Chillán, Chile. Presentación de Poster.
- **Sandoval-Acuña C.**, Fuentes-Retamal S., Speisky H., Madrid-Rojas M., Castro-Castillo V., Ferreira J. Efecto desacoplante mitocondrial débil de polihidroxibenzoatos unidos a trifenilfosfonio y su potencial citotóxico en células de cáncer mamario humano. Primera Feria de Grados Académicos 2016. Abril 6, 2016. Santiago, Chile. Presentación de Poster

### **Internacionales:**

- **Sandoval-Acuña C.**, Speisky H. Polifenoles y su potencial como moduladores de la actividad mitocondrial., II Reunión de Coordinación y Jornada INSA-UB/CORNUCOPIA: NUTRICIÓN Y SEGURIDAD I+D. Mayo 9-11, 2013. Barcelona, España. Presentación Oral.
- **Sandoval-Acuña C.**, Fuentes-Retamal S., Guzman-Rivera D., Speisky H., Castro-Castillo V., Madrid-Rojas M., Ferreira J. "*Cytotoxic effect of gentisic acid and protocatechuic acid triphenylphosphonium derivatives in human breast cancer cells: Possible mechanism and bioenergetic implications*". 9th International Conference of Anticancer Research. Octubre 6-10, 2014. Sithonia, Grecia. Presentación Oral.
- **Sandoval-Acuña C.**, Fuentes-Retamal S., Speisky H., Madrid-Rojas M., Castro-Castillo V., Truksa J., Ferreira J. "*Possible mechanism underlying the cytotoxic effect of gentisic acid and protocatechuic acid triphenylphosphonium derivatives in human breast cancer cells*". Pharmacology 2015. Diciembre 15-17, 2015. Londres, Inglaterra. Presentación de Poster.

## **ABREVIATURAS**

<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>AMPK</b>	Enzima quinasa dependiente de AMP
<b>Ap5A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> -di(adenosina-5')pentafofato
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AV</b>	Anexina V
<b>BrdU</b>	Bromodesoxiuridina
<b>C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup></b>	Decil-trifenilfosfonio
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CCCP</b>	Carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CM</b>	Cáncer de mama
<b>CSCs</b>	Células troncales de cáncer
<b>CTE</b>	Cadena de transporte de electrones
<b>DCFDA</b>	2',7'-diclorofluoresceina diacetato
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle
<b>DMEM/F12</b>	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle + mezcla de nutrientes F12
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ER</b>	Receptores de estrógeno
<b>GA</b>	Ácido gentísico
<b>GA-C<sub>10</sub></b>	Decil-2,5-dihidroxibenzoato

<b>GA-TPP<sup>+</sup></b>	(10-((2,5-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>HER2/neu</b>	Receptor de factor de crecimiento epidermal humano 2
<b>HK2</b>	Hexokinasa-2
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50%
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MPTP</b>	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>mSOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>MTT</b>	Sal de tetrazolio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>OCR</b>	Tasa de consumo de oxígeno
<b>PBS</b>	Amortiguador fosfato salino
<b>PCA</b>	Ácido protocatecuico
<b>PCA-C<sub>10</sub></b>	Decil-3,4-dihidroxibenzoato
<b>PCA-TPP<sup>+</sup></b>	(10-((3,4-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>PR</b>	Receptor de progesterona
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno

<b>RPMI</b>	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SFE</b>	Suero fetal equino
<b>STS</b>	Estaurosporina
<b>TICs</b>	Células iniciadoras de tumores
<b>TMRM</b>	Tetrametilrodamina metil éster
<b>TNBC</b>	Cáncer de mama triple negativo
<b>TPP<sup>+</sup></b>	Trifenilfosfonio
<b>UCPs</b>	Proteínas desacoplantes
<b>URF</b>	Unidades relativas de fluorescencia
<b>VDAC</b>	Canal aniónico dependiente de voltaje
<b><math>\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiología y tratamientos actuales para el cáncer de mama .....	1
1.2. La mitocondria como un nuevo blanco farmacológico contra el cáncer de mama.....	3
1.3. Nuevas moléculas con potencial toxicidad mitocondrial.....	7
1.4. La mitocondria en el contexto de los receptores hormonales .....	11
1.5. Modelo celular a utilizar.....	13
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivo General .....	15
3.2. Objetivos Específicos .....	15
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
4.1. Compuestos en estudio.....	17
4.2. Líneas celulares y cultivo celular.....	18
4.3. Ensayos de viabilidad celular .....	19
4.4. Extracción de RNA, transcripción inversa y qPCR .....	22
4.5. Ensayo de consumo de oxígeno celular.....	24

4.6. Ensayos de cuantificación de ROS .....	25
4.7. Ensayo de determinación de niveles de GSH y GSSG .....	27
4.8. Ensayos de determinación de potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) .....	28
4.9. Ensayo de determinación de ATP celular .....	30
4.10. Ensayo de actividad ATPasa del complejo V .....	31
4.11. Ensayo de marcación con Anexina V/yoduro de propidio .....	31
4.12. Ensayo de migración celular .....	32
4.13. Análisis estadístico.....	33
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
5.1. Efecto de los ácidos unidos a TPP <sup>+</sup> sobre la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer mamario humano .....	35
5.2.- Efecto de los ácidos unidos a TPP <sup>+</sup> sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.....	52
5.3.- Efecto de los ácidos unidos a TPP <sup>+</sup> sobre la producción de ROS y los niveles de GSH/GSSG .....	56
5.4.- Efecto de los ácidos unidos a TPP <sup>+</sup> sobre el potencial de membrana mitocondrial.....	62
5.5.- Efecto de los ácidos unidos a TPP <sup>+</sup> sobre el nivel de ATP celular y la activación de sensores metabólicos.....	65
5.6.- Efecto de los ácidos unidos a TPP <sup>+</sup> sobre la activación de marcadores de la biogénesis mitocondrial .....	74

5.7.- Mecanismo de inducción de muerte celular por parte de los ácidos unidos a TPP+ .....	78
5.8.- Efecto de los ácidos unidos a TPP+ sobre la migración celular.....	83
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de los ácidos unidos a TPP <sup>+</sup> y las moléculas control.....	17
<b>Figura 2.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> sobre la viabilidad de células de cáncer mamario humano.....	35
<b>Figura 3.</b> Efecto de GA-TPP <sup>+</sup> sobre la viabilidad de células de cáncer mamario humano.....	36
<b>Figura 4.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> , GA-TPP <sup>+</sup> , C <sub>10</sub> -TPP <sup>+</sup> y PCA- C <sub>10</sub> sobre la viabilidad de células BT-474 y MCF7 .....	38
<b>Figura 5.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> , GA-TPP <sup>+</sup> y C <sub>10</sub> -TPP <sup>+</sup> sobre la viabilidad de células MCF7 modificadas en el laboratorio .....	40
<b>Figura 6.</b> Efecto de GA- C <sub>10</sub> , GA-TPP <sup>+</sup> y C <sub>10</sub> -TPP <sup>+</sup> sobre la liberación de LDH en células MCF7 y MDA-MB-231 .....	42
<b>Figura 7.</b> Expresión de transportadores dependientes de ATP en células de cáncer mamario humano y efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> , GA-TPP <sup>+</sup> y C <sub>10</sub> -TPP <sup>+</sup> sobre dicha expresión.....	46
<b>Figura 8.</b> Efecto de GA-TPP <sup>+</sup> y PCA-TPP <sup>+</sup> sobre la capacidad formadora de colonias de células MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F .....	48
<b>Figura 9.</b> Efecto de GA-TPP <sup>+</sup> y PCA-TPP <sup>+</sup> sobre viabilidad de células MCF7 y MCF 10F.....	50
<b>Figura 10.</b> Efecto de GA-TPP <sup>+</sup> y PCA-TPP <sup>+</sup> sobre la respiración de células MCF7 y MDA-MB-231.....	54
<b>Figura 11.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> y GA-TPP <sup>+</sup> sobre parámetros oxidativos mitocondriales y celulares.....	59
<b>Figura 12.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> , GA-TPP <sup>+</sup> y C <sub>10</sub> -TPP <sup>+</sup> sobre los niveles de expresión de enzimas antioxidantes en células MCF7, BT-474 y MCF 10F.....	61
<b>Figura 13.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> y GA-TPP <sup>+</sup> sobre el potencial de transmembrana mitocondrial en células MCF7 y MDA-MB-231 .....	63

<b>Figura 14.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> y GA-TPP <sup>+</sup> sobre el potencial de transmembrana mitocondrial en células MCF7, BT-474 y MCF 10F .....	64
<b>Figura 15.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> y GA-TPP <sup>+</sup> sobre los niveles de ATP en células MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F, en ausencia y presencia de los inhibidores Dorsomorfina y Ap5A.....	68
<b>Figura 16.</b> Efecto re-polarizante mitocondrial de ATP en células MCF7 y MDA-MB-231 .....	71
<b>Figura 17.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> , GA-TPP <sup>+</sup> y C <sub>10</sub> -TPP <sup>+</sup> sobre la expresión de AMPK y UCPs en células MCF7, BT-474 y MCF 10F .....	72
<b>Figura 18.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> y GA-TPP <sup>+</sup> sobre la expresión de PGC-1 $\alpha$ y los transcritos mitocondriales en células MCF7, BT-474 y MCF 10F .....	76
<b>Figura 19.</b> Expresión basal de PGC-1 $\alpha$ y los transcritos mitocondriales en células MCF7, BT-474, MCF7-rho0 y MCF 10F .....	77
<b>Figura 20.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> y GA-TPP <sup>+</sup> sobre marcadores de muerte celular en células MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F .....	79
<b>Figura 21.</b> Efecto de GA-TPP <sup>+</sup> sobre el tamaño y complejidad de células MCF7 y MDA-MB-231 .....	81
<b>Figura 22.</b> Efecto de PCA-TPP <sup>+</sup> y GA-TPP <sup>+</sup> sobre marcadores de muerte celular en células MCF7 y MCF7-TAMR.....	82
<b>Figura 23.</b> Efecto de GA-TPP <sup>+</sup> y PCA-TPP <sup>+</sup> sobre la capacidad migratoria de células MDA-MB-231 .....	84

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Valores de IC <sub>50</sub> de los compuestos en estudio en células MDA-MB-361, AU565, MCF7 y MDA-MB-231 .....	37
<b>Tabla II.</b> Valores de IC <sub>50</sub> de los compuestos en estudio en células MCF7 y BT-474.....	39
<b>Tabla III.</b> Valores de IC <sub>50</sub> de los compuestos en estudio en células MCF7, MCF7-rho0, MCF7-TAMR y MCF7-Sph .....	41

## RESUMEN

La mitocondria ha sido recientemente reconocida como potencial blanco molecular en el tratamiento del cáncer, dado que exhibe un potencial de transmembrana ( $\Psi_m$ ) significativamente mayor en células tumorales que en células normales y por tanto sería más susceptible de ser atacada con cationes lipofílicos deslocalizados con trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>). Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que derivados TPP<sup>+</sup> del ácido gálico son citotóxicos y eficaces desacoplantes de la generación de  $\Psi_m$  en células de cáncer de mama de ratón (TA3/Ha). Con el objetivo de incrementar la eficiencia y la eficacia citotóxica, se sintetizaron nuevos derivados TPP<sup>+</sup> de los ácidos gentísico (GA) y protocatecuico (PCA), y se evaluó su potencial citotoxicidad en varias líneas celulares humanas de cáncer de mama, que difieren tanto en su expresión de receptores hormonales y de factores de crecimiento, como en su metabolismo basal. Las líneas celulares utilizadas representan además 4 subtipos distintos de CM: Luminal A (MCF-7; ER<sup>+</sup>/HER2/neu<sup>-</sup>), Luminal B (MDA-MB-361 y BT-474; ER<sup>+</sup>/HER2/neu<sup>+</sup>), HER2/neu sobreexpresado (AU565; ER<sup>-</sup>/HER2/neu<sup>+</sup>) y triple negativo (MDA-MB-231; ER<sup>-</sup>/HER2/neu<sup>-</sup>). Los resultados muestran que GA-TPP<sup>+</sup> y PCA-TPP<sup>+</sup> poseen una alta potencia citotóxica en todas las líneas celulares tumorales ensayadas, y que dicho efecto es significativamente menor en la línea celular MCF 10F de epitelio mamario humano normal. Se observó, sin embargo, que algunas líneas celulares mostraron leves diferencias en su sensibilidad (posiblemente dadas por su capacidad de activar vías metabólicas alternativas o

por su mayor expresión de transportadores dependientes de ATP). Se demostró además que ambos compuestos son capaces de incrementar el consumo de oxígeno celular, desacoplando la fosforilación oxidativa e induciendo una importante pérdida de  $\Psi_m$ , junto con un incremento significativo en el estrés oxidativo celular y una caída en la razón GSH/GSSG, tanto en células altamente oxidativas como en aquellas preferentemente glicolíticas. Ambos derivados indujeron, además, una caída leve de ATP, la cual fue exacerbada tras la co-incubación con inhibidores de AMPK o adenilato quinasa. Esto último sugiere que ambas enzimas podrían activarse como respuesta a la acción de los compuestos a nivel mitocondrial. Adicionalmente, se observó que ambos compuestos incrementan la biogénesis mitocondrial, lo que podría representar un mecanismo compensatorio alternativo frente al efecto de los ácidos unidos a  $TPP^+$ . Todos los efectos antes mencionados desencadenarían la activación de la muerte celular apoptótica. Finalmente, se demostró que PCA- $TPP^+$  y GA- $TPP^+$  son capaces de inhibir de manera importante la migración de células metastásicas de cáncer de mama humano. En base a nuestros resultados, postulamos que GA- $TPP^+$  y PCA- $TPP^+$  alteran de manera importante el funcionamiento mitocondrial, y que tal efecto podría subyacer su citotoxicidad selectiva frente a células de cáncer de mama. Lo anterior nos permite afirmar que ambos compuestos presentan un interesante potencial como posibles agentes farmacológicos anti-tumorales, e invita a continuar la investigación en torno a su efecto citotóxico selectivo en modelos animales de cáncer mamario.

## ABSTRACT

Mitochondria has been recently acknowledged as a potential molecular target in the treatment of cancer, especially considering that such organelle exhibits a significantly higher transmembrane potential ( $\Psi_m$ ) in cancer cells than in normal cells, and is thus more susceptible to be targeted with lipophilic delocalized cations such as triphenylphosphonium (TPP<sup>+</sup>) derivatives. Previous work conducted by our laboratory has shown that TPP<sup>+</sup>-derivatives of gallic acid were cytotoxic and effective uncouplers of the  $\Psi_m$  generation in TA3/Ha mouse breast cancer cells. Therefore, and aiming to further expand our knowledge on the possible mechanisms underlying the cytotoxic effect of TPP<sup>+</sup> derivatives, gentisic acid (GA) and protocatechuic acid (PCA), both linked to the TPP<sup>+</sup> moiety, were evaluated as potential cytotoxic agents in several human breast cancer cell lines, that differ primarily in their expression of estrogen and epidermal growth factor receptors and in their metabolic profile. In addition, the cell lines represent the four clinical subtypes of breast cancer: Luminal A (MCF-7; ER<sup>+</sup>/HER2/neu<sup>-</sup>), Luminal B (MDA-MB-361 y BT-474; ER<sup>+</sup>/HER2/neu<sup>+</sup>), HER2/neu overexpressed (AU565; ER<sup>-</sup>/HER2/neu<sup>+</sup>) and triple negative (MDA-MB-231; ER<sup>-</sup>/HER2/neu<sup>-</sup>). Results obtained show that GA-TPP<sup>+</sup> and PCA-TPP<sup>+</sup> are highly cytotoxic to all tumoral cell lines tested, and that such effect is significantly lower in the normal human breast epithelial cell line MCF 10F. It was observed, nonetheless, that some cell lines showed minor differences in their sensitivity towards the cytotoxic effect (possibly due to their ability to activate alternative metabolic pathways or to

their higher expression of ATP-dependent transporters). Additionally, GA-TPP<sup>+</sup> and PCA-TPP<sup>+</sup> were shown to increase oxygen consumption, uncoupling oxidative phosphorylation and inducing a significant loss of  $\Psi_m$ , together with an increase in cellular oxidative stress and a drop in the GSH/GSSG ratio, both in highly oxidative and highly glycolytic human breast cancer cells. Moreover, both derivatives were able to induce a minor drop in ATP, which was exacerbated upon the co-incubation with inhibitors of either AMPK or adenylate kinase. The latter suggests that the activation of both enzymes could represent a compensatory mechanism in response to the mitochondrial effect of TPP<sup>+</sup> derivatives. In the same line, it was shown that GA-TPP<sup>+</sup> and PCA-TPP<sup>+</sup> are able to enhance mitochondrial biogenesis, an event that could represent another compensatory mechanism against the damage induced by both compounds. All the effects mentioned above would eventually trigger the activation of apoptotic cell death, evidenced as an increase in annexin V-staining. Finally, we demonstrated that both acids linked to TPP<sup>+</sup> strongly inhibit the migration of highly metastatic breast cancer cells. Based on our results, we postulate that the GA-TPP<sup>+</sup> and PCA-TPP<sup>+</sup> derivatives are able to strongly alter mitochondrial functioning, and that such effect would underlie their selective cytotoxicity against cells that belong to different clinical subtypes of breast cancer. Such contention allows us to postulate GA-TPP<sup>+</sup> and PCA-TPP<sup>+</sup> as molecules with pharmacological potential in breast cancer treatment, and warrants future research regarding their Cytotoxicity and selectivity in “*in vivo*” breast cancer models.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- Epidemiología y tratamientos actuales para el cáncer de mama.**

El cáncer de mama (CM) es el tipo de cáncer más frecuente en la población femenina, con una incidencia del 25,1% y una mortalidad aproximada del 14,7% respecto al total de casos de cáncer a nivel mundial. En Chile, el CM representa el 20,4% de todos los nuevos casos de cáncer entre las mujeres, y da cuenta de alrededor del 12% de las muertes asociadas a cáncer [1, 2].

Actualmente, los tratamientos disponibles para el CM incluyen alternativas quirúrgicas, y terapias generalizadas y específicas para el CM [3]. La alternativa quirúrgica comprende la mastectomía parcial o total, con el fin de eliminar el tejido afectado. Si bien la remoción física del tumor es una operación con alto índice de efectividad, es también altamente invasiva, no aplicable en todos los casos de CM y no definitiva en los casos en los que ya se presenta ramificación o metástasis [4]. Las terapias generalizadas incluyen la radioterapia y la quimioterapia, las cuales, aunque representan opciones viables y efectivas de tratamiento, generan numerosos efectos secundarios que a menudo limitan su uso, dados principalmente por su poca especificidad contra las células tumorales, pues al estar dirigidas contra la alta capacidad replicativa de las células cancerosas, afectan de manera importante a las células normales con alta tasa proliferativa, típicamente a las células precursoras hematopoyéticas [5]. Las terapias específicas incluyen la terapia

hormonal y aquellas dirigidas contra blancos específicos de células tumorales de mama, lo que representa una aproximación mucho más dirigida y específica en el tratamiento del CM. En el caso de la terapia hormonal, los fármacos destinados a interrumpir la cascada transduccional asociada a los receptores de estrógeno (ER) o progesterona son utilizados para bloquear el efecto proliferativo y antiapoptótico de dichos receptores [6]. Algunos ejemplos de este tipo de drogas son los moduladores de los receptores de estrógeno, como el tamoxifeno, o los inhibidores de la aromatasa (e.g., exemestano o anastrozol), los cuales han demostrado ser alternativas efectivas para el tratamiento de tumores dependientes de hormonas [7, 8]. La terapia dirigida contra receptores específicos, por otra parte, busca aprovechar la expresión específica o diferencial de macromoléculas de señalización en células de CM, que no existen o se presentan en muy bajas cantidades en células de tejidos normales. Un ejemplo importante de estas macromoléculas es el receptor de factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2/neu) [9], el cual se encuentra altamente expresado en algunos tipos de cáncer de mama y es responsable de la señalización que lleva a la sobreproliferación celular [10]. En base a lo anterior, se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra éste receptor (trastuzumab) e inhibidores de la señalización intracelular del HER2/neu (lapatinib) [11, 12]. Si bien estas dos últimas terapias farmacológicas constituyen alternativas altamente eficaces, considerablemente menos invasivas y presentan una muy baja incidencia de efectos adversos, su alta

especificidad las limita a sólo algunos tipos de CM, como son aquellos dependientes de hormonas en el primer caso y aquellos que sobreexpresan el receptor HER2/neu en el segundo. Desafortunadamente, tanto la terapia hormonal como los inhibidores de la vía HER2/neu no tienen efecto alguno sobre los cánceres de mama denominados triple-negativos (que carecen de receptores de estrógeno, progesterona y HER2/neu) [13, 14], y son justamente éstos tipos de cáncer los que han mostrado ser más agresivos, de peor pronóstico y presentar mayor probabilidad de recurrencia, metástasis y una mayor tasa de mortalidad [15].

## **1.2.- La mitocondria como un nuevo blanco farmacológico contra el cáncer de mama.**

La falta de alternativas actualmente disponibles que conjuguen una alta especificidad para células tumorales con una baja invasividad y mínimos efectos adversos ha llevado a la búsqueda de blancos terapéuticos en las células tumorales, que permitan discriminar claramente entre una célula normal y una alterada, para el diseño de nuevos tratamientos. Tales blancos deberían ser idealmente compartidos por todos los tipos de CM (independiente de su expresión de receptores para factores de crecimiento u hormonas) y estar prácticamente ausentes, o no ser relevantes para la viabilidad de las células normales. Al respecto, uno de los blancos que cobra cada vez mayor

relevancia como un posible sitio de acción de nuevas drogas con potencial anti-cancerígeno es la mitocondria [16-19].

En células nucleadas, la mitocondria es la principal fuente energética, siendo responsable de hasta el 80% de la producción normal de ATP a través de la fosforilación oxidativa. En tales células, la glicólisis es inhibida en presencia de altas concentraciones de oxígeno (efecto Pasteur), lo que permite que la mitocondria oxide el piruvato a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  para la producción de ATP [16]. En ausencia relativa de oxígeno, por el contrario, la glicólisis es activada y mantiene el suministro de energía aun cuando la fosforilación oxidativa no se lleve a cabo. En las células tumorales, en cambio, la glucosa es convertida a lactato aún en presencia de oxígeno mediante la glicólisis aeróbica (efecto Warburg) [20], proceso que contribuye con entre un 50% y un 95% de la síntesis de ATP. Si bien la glicólisis aeróbica es mucho menos eficiente que la fosforilación oxidativa en términos del rendimiento energético por molécula de glucosa (2 moléculas de ATP/molécula de glucosa frente a 30-32 moléculas de ATP/molécula de glucosa, respectivamente), numerosos estudios postulan que el efecto Warburg permite a las células tumorales disponer, además de energía en la forma de ATP, de los intermediarios carbonados (derivados de glucosa y glutamina) necesarios para la altísima síntesis de biomasa requerida para la hiper-proliferación de células tumorales [21]. La capacidad de las células tumorales de cambiar desde un metabolismo mitocondrial a uno primordialmente glicolítico parece minimizar el impacto que podrían tener

moléculas dirigidas a la mitocondria en la sobrevivencia de dichas células. Sin embargo, cabe destacar que una de las principales enzimas (si no la más importante) involucrada en la exacerbación y mantenimiento del metabolismo glicolítico en las células cancerosas, la hexokinasa-2 (HK2) [22], se encuentra anclada a la membrana externa de la mitocondria a través de la interacción con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) [23]. Al estar íntimamente ligada a la membrana mitocondrial, la HK2 posee dos características importantes que le permiten una alta actividad constitutiva, y por ende incrementar el flujo glicolítico en desmedro de la fosforilación oxidativa. La primera característica es su falta de inhibición por producto, lo que conduce a una mayor formación de glucosa-6-fosfato, aun cuando los niveles de dicho metabolito estén incrementados en el citosol de las células tumorales [22]. La segunda característica es el hecho de tener un acceso preferencial al ATP que fluye a través del VDAC desde la mitocondria hacia el citosol, lo que le permite una tasa metabólica muy superior a la normal [21-23]. Ambas características, si bien facilitan la utilización de glucosa a través de la glicólisis a una alta velocidad, obligan además a que el metabolismo de las células tumorales sea muy dependiente de la estabilidad de la estructura mitocondrial y del correcto funcionamiento de la maquinaria mitocondrial de síntesis de ATP (aunque esté disminuido respecto a las células normales) [24-26]. Por lo tanto, fallas en el suministro de ATP desde la mitocondria hacia la HK2, o la disrupción de su interacción con VDAC, tienen como resultado una disminución importante del

flujo de la glicólisis y por ende la detención de la proliferación, lo que de mantenerse en el largo plazo podría llevar a la muerte de las células cancerosas. En efecto, investigaciones dirigidas a disminuir la actividad de la HK2, ya sea a través de silenciamiento génico [27] o mediante el uso de inhibidores químicos [28], han demostrado la efectividad de tales aproximaciones como posibles estrategias anti-tumorales. De manera similar, estrategias dirigidas a inhibir la producción de ATP mitocondrial, mediante la inhibición de la cadena transportadora de electrones, han mostrado una alta capacidad de erradicación de células cancerosas [29]. Es preciso mencionar, sin embargo, que la inhibición en la producción de ATP no es el único evento potencialmente citotóxico a nivel mitocondrial. En efecto, inhibiciones en la cadena transportadora de electrones o el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa conducen también a una pérdida en el potencial de transmembrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) [30], evento que resulta en numerosas alteraciones en la función de dicho organelo, como la pérdida del balance NADH:NADPH necesario para la regeneración del glutatión reducido (GSH) a partir de glutatión oxidado (GSSG) [31, 32], la disminución de la capacidad de la mitocondria para almacenar  $Ca^{2+}$ , necesaria para el mantenimiento de la homeostasis de dicho catión [33, 34], y el incremento de la permeabilidad de la membrana interna y la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) que llevan a la liberación de factores pro-apoptóticos hacia el citosol [35].

### **1.3.- Nuevas moléculas con potencial toxicidad mitocondrial.**

En el contexto del potencial de drogas con blanco mitocondrial como agentes citotóxicos en células cancerígenas (neoplásicas), se ha reportado la capacidad del ácido nordihidroguayarático y de su derivado tetraacetilado para inhibir el crecimiento celular y el consumo de oxígeno mitocondrial, y para disminuir los niveles de ATP y la viabilidad de líneas celulares de cáncer mamario de ratón (TA3 y su variedad resistente a metrotrexato TA3-MTX-R) [36]. Adicionalmente, ambas moléculas han demostrado actividad anti-neoplásica *in vivo*, inhibiendo el crecimiento de células tumorales intramusculares [36]. En la misma línea, se ha demostrado que ésteres del ácido gálico bloquean de forma importante el flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, disminuyendo la síntesis de ATP a nivel de dicho organelo [37]. Estos ésteres además han demostrado inhibir el crecimiento de células tumorales TA3 y TA3-MTX-R, tanto en cultivo como en ratones portadores de tumores derivados de dichas células, tratados con iso-butilgalato. En las mismas investigaciones se demostró que los ésteres de ácido gálico son selectivamente tóxicos hacia células tumorales (y no hacia células normales) [37]. De manera similar, en el laboratorio donde se desarrolló la presente tesis, se ha investigado en torno al uso de polifenoles con tropismo mitocondrial (en particular ésteres de ácido gálico) [38, 39] o moléculas como el 3-hidroxibakuchiol [40] como posibles moléculas anti-tumorales, con acción inhibitoria mitocondrial. Las moléculas investigadas han demostrado ser

efectivos inhibidores del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, particularmente a nivel del complejo I (NADH:Ubiquinona oxidoreductasa), y a través de dicho mecanismo, ser capaces de inducir la muerte apoptótica de células de cáncer mamario de ratón [41]. Cabe destacar que, junto con exhibir la habilidad de eliminar células tumorales, las moléculas mencionadas han demostrado ser selectivas contra este tipo de células, pues prácticamente no tienen efecto citotóxico sobre células normales de tejido mamario.

Otras investigaciones han propuesto polifenoles como el ácido protocatecuico (PCA) [42-45] y el ácido gentísico (GA) [46-48] como potenciales agentes citotóxicos, si bien su acción directa a nivel mitocondrial no ha sido comprobada hasta el momento. Cabe destacar sin embargo, que de manera similar al ácido gálico, los ácidos PCA y GA tienen la capacidad de ser oxidados a quinonas (*o*-quinona [49] y *p*-quinona [50], respectivamente), y que dicha oxidación sería la responsable, al menos en el caso del ácido gálico, de algunas de sus actividades citotóxicas. En efecto, se ha demostrado que *o*-quinonas pueden formar enlaces covalentes con grupos sulfhidrilos o aminas de residuos aminoacídicos, a través de la reacción de Michael [37], alterando la estructura y función de enzimas o proteínas estructurales dentro de la mitocondria, como por ejemplo los complejos respiratorios o la ATP-sintasa mitocondrial. Adicionalmente, ha sido ampliamente documentado el efecto de inhibidores de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, tales como

rotenona (inhibidor del complejo I) o antimicina A (inhibidor del complejo III) para incrementar la producción de superóxido a nivel mitocondrial [51, 52]. Este incremento, de no ser remediado por los mecanismos antioxidantes celulares, como el GSH o las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa mitocondrial (mSOD) y catalasa (CAT), puede derivar en un estrés oxidativo generalizado al interior de la célula, llevando a la alteración de macromoléculas como lípidos, proteínas y ácido nucleicos y, potencialmente, a la muerte celular [53]. Es por esto que moléculas que interrumpen el flujo de electrones a nivel mitocondrial pueden ser citotóxicas no sólo como resultado de una disminución en la síntesis de ATP, sino además como agentes inductores de estrés oxidativo celular.

En lo referente al uso de ésteres de ácido gálico, en el laboratorio se han sintetizado moléculas (derivados unidos a trifenilfosfonio; TPP<sup>+</sup>) con potencial de bio-acumularse en la mitocondria, incrementando su concentración efectiva y disminuyendo por ende la concentración necesaria para inducir el efecto citotóxico. Para lograr tal acumulación se ha aprovechado el potencial transmembrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ), de alrededor de 170 mV, el cual es entre 2 y 6 veces mayor que el de cualquier otro organelo, incluida la membrana plasmática [54]. Este potencial de transmembrana implica una menor carga positiva en el lado interno de la membrana interna mitocondrial (matriz mitocondrial), y permite dirigir una molécula, mediante su unión a cationes lipofílicos deslocalizados, de manera selectiva hacia la mitocondria [55].

Las primeras evidencias de que cationes lipofílicos deslocalizados podían acumularse selectivamente en la membrana interna mitocondrial, fueron dadas por el uso de rodamina 123, la cual posee un grupo funcional catiónico junto a una región apolar, lo que le permite ingresar a la mitocondria utilizando el gradiente de potencial negativo mencionado, pudiendo acumularse hasta 500 veces al interior del organelo [56, 57]. Recientemente, se han desarrollado sales de trifenilfosfonio como chaperonas químicas que, al estar unidas a diversas moléculas, permiten su entrada selectiva y su acumulación al interior de la mitocondria. Ejemplos de esto último son la MitoVit-E [58, 59] y el Mito-Q [28, 60], derivados de la vitamina E y la coenzima Q, respectivamente, unidos a grupos trifenilfosfonio, que han demostrado ser antioxidantes mitocondriales más efectivos que sus moléculas parentales.

Si bien todas las mitocondrias presentan un  $\Psi_m$  significativamente mayor al potencial transmembrana de otros organelos, se ha demostrado que las mitocondrias de tejidos tumorales presentan un  $\Psi_m$  aún mayor que el observado en mitocondrias de tejidos sanos (incluidos los tejidos excitables con alta tasa metabólica), lo que permitiría que los cationes lipofílicos deslocalizados se acumulen preferentemente en mitocondrias de células tumorales, incrementando la selectividad de las moléculas hacia las células cancerosas y evitando la toxicidad en células normales [61, 62].

#### **1.4.- La mitocondria en el contexto de los receptores hormonales.**

El cáncer de mama se clasifica actualmente en 4 subtipos, basados en la expresión o ausencia de receptores para hormonas esteroidales (receptor de estrógeno o progesterona; ER o PR, respectivamente) o receptores HER2/neu. Así, el cáncer de mama se divide en luminal A (ER/PR positivo, HER2/neu negativo), luminal B (ER/PR positivo, HER2/neu positivo), HER2/neu sobreexpresado (ER/PR negativo, HER2/neu positivo) y triple-negativo (ER/PR negativo, HER2/neu negativo) [13, 15, 63]. Dada la actual falta de una alternativa específica que sea efectiva para el tratamiento de los 4 subtipos, se vuelve necesario el desarrollo de moléculas que, manteniendo su toxicidad selectiva hacia células tumorales *versus* células normales, sean capaces de afectar a células cancerígenas independiente de su expresión de receptores hormonales o de factores de crecimiento. En este ámbito, las moléculas dirigidas contra la mitocondria podrían suponer una estrategia viable pues su mecanismo de acción estaría dirigido contra un blanco presente en todas las células tumorales, y no contra uno de los receptores en particular. Sin embargo, es necesario destacar que tanto los receptores hormonales (ER y PR) como el receptor HER2/neu tienen funciones relacionadas con el metabolismo mitocondrial, por lo que no debe descartarse la posibilidad de que la ausencia o presencia de tales receptores modifique la respuesta citotóxica de moléculas dirigidas contra el mencionado organelo. Por ejemplo, el receptor de estrógeno es capaz de estimular la transcripción de los complejos

respiratorios, inhibir el MPTP [64] y la apoptosis intrínseca [65], e incrementar las defensas antioxidantes mitocondriales [64]. En dicho contexto, un reporte de Pons et al. (2015) mostró que la razón  $ER\alpha/ER\beta$  es capaz de modificar la respuesta de células de cáncer mamario humano frente a agentes citotóxicos con actividad mitocondrial (tales como cisplatino, paclitaxel y tamoxifeno). Los autores demostraron que una baja razón  $ER\alpha/ER\beta$  indujo una menor respuesta frente al efecto citotóxico de cisplatino, además de una menor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una menor activación de la apoptosis [66]. Así mismo, la sobreexpresión del  $ER\beta$  fue capaz de incrementar la resistencia de células con una alta razón  $ER\alpha/ER\beta$  frente a la acción de los compuestos anticancerígenos [66].

En la misma línea, se ha reportado que el receptor HER2/neu es capaz de disminuir la actividad respiratoria mitocondrial e incrementar la glicólisis aeróbica, a través de la activación de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDH-A) [67]. En efecto, los distintos tipos de cáncer de mama no sólo se diferencian en su patrón de expresión de los receptores mencionados, sino además presentan importantes diferencias metabólicas. Por ejemplo, las células triple-negativas presentan un metabolismo altamente glicolítico (cercano al 95%), y un mayor tono oxidativo basal, mientras que los otros tres tipos celulares presentan un metabolismo más bien mixto (aprox. 50% oxidativo y 50% glicolítico) y una mayor resistencia frente a incrementos en el estrés oxidativo celular [68, 69]. Por ende, para postular cualquier molécula

como un potencial agente antitumoral con acción inhibitoria mitocondrial, es necesario evaluar su efectividad, de manera inicial, en cultivos celulares de cáncer de mama que representen a los 4 subtipos mencionados. Adicionalmente, se ha reportado que existen diversas mutaciones en la proteína p53 asociadas al cáncer de mama [70-73], así como también se han encontrado tumores en los que dicha proteína se encuentra expresada en su forma nativa (*wild type*). Dada la relevancia de p53 en la quimiorresistencia de células tumorales [74], en la capacidad de respuesta antioxidante [75, 76], y a su potencial apoptótico [77] o anti-apoptótico [78] (dependiendo de la mutación presente), se vuelve necesario además evaluar el efecto de moléculas con potencial antitumoral, en líneas celulares que presenten esta proteína en su forma *wild type* o con distintas mutaciones.

### **1.5.- Modelo celular a utilizar.**

En base a los antecedentes referidos, y con miras a desarrollar nuevas moléculas alternativas con potencial como agentes citotóxicos con actividad inhibitoria mitocondrial, se evaluó la actividad de los ésteres de los ácidos protocatecuico y gentísico, unidos a un grupo trifenilfosfonio por una cadena hidrocarbonada lineal de 10 átomos de carbono, en líneas celulares representativas de los 4 subtipos de cáncer de mama humano: Luminal A (MCF-7; ER<sup>+</sup>/HER2/neu<sup>-</sup>), Luminal B (MDA-MB-361 y BT-474; ER<sup>+</sup>/HER2/neu<sup>+</sup>), HER2/neu sobreexpresado (AU565; ER<sup>-</sup>/HER2/neu<sup>+</sup>) y triple

negativo (MDA-MB-231; ER<sup>-</sup>/HER2/neu<sup>-</sup>). Las líneas celulares a utilizar también presentan expresión de diversas variantes de la proteína p53. Las líneas utilizadas fueron [6, 13, 79]:

- MDA-MB-361 (Luminal B; ER +; HER2/neu +; p53 *wild type*)
- BT-474 (Luminal B; ER +; HER2/neu +; p53 E285K)
- MCF-7 (Luminal A; ER +; HER2/neu -; p53 *wild type*)
- AU565 (HER2/neu sobreexpresado; ER -; HER2/neu +; p53 R175H)
- MDA-MB-231 (Triple negativo; ER -; HER2/neu -; p53 R280K)
- Adicionalmente se utilizaron células modificadas en el laboratorio según las siguientes características: MCF7 resistentes a Tamoxifeno (MCF7-TAMR), MCF7 cultivadas en esferas tridimensionales (MCF7-Sph), y MCF7 carentes de DNA mitocondrial (MCF7-rho0).

Junto con estudiar el potencial citotóxico de las moléculas mencionadas, se evaluó su capacidad para inducir disfunciones mitocondriales y para incrementar el estrés oxidativo tanto mitocondrial como celular, y se estudió el mecanismo por el cual los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> podrían inducir muerte celular. Adicionalmente se evaluó la selectividad de los compuestos hacia las células tumorales, utilizando la línea celular MCF 10F (células de epitelio mamario humano normal inmortalizadas) como un control de células normales [80].

## **2.- HIPÓTESIS**

Los ésteres de los ácidos protocatecuico y gentísico, unidos a cationes trifenilfosfonio, presentan toxicidad selectiva contra células de cáncer de mama humanas respecto a células normales, de manera independiente de la expresión de receptores de hormonas o receptores HER2/neu, del estado de la proteína p53, y del tipo de metabolismo celular.

## **3.- OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General.**

Evaluar el efecto de compuestos con capacidad potencial para alterar las funciones mitocondriales, como posibles agentes citotóxicos selectivos en células de cáncer mamario humano, y estudiar su potencial mecanismo de acción.

### **3.2.- Objetivos Específicos.**

1. Determinar el efecto citotóxico de los ésteres de los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> en células representativas de los 4 subtipos de cáncer de mama humano y compararlo con aquel observado en células de epitelio mamario humano normal.
2. Evaluar el efecto de los ésteres de los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> sobre la respiración celular, el potencial de

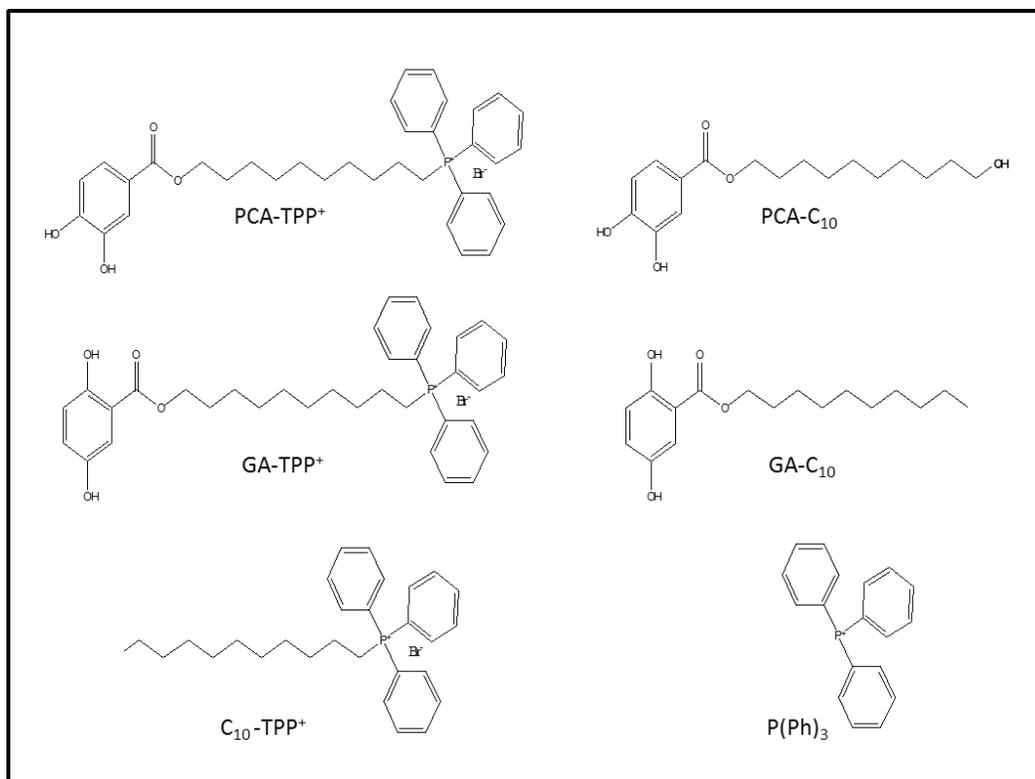
transmembrana mitocondrial, los niveles de ATP y la biogénesis mitocondrial, en células de cáncer mamario humano.

3. Evaluar el efecto de los ésteres de los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> sobre el estrés oxidativo mitocondrial y celular y sobre los niveles de glutatión, en células de cáncer de mama humano.
4. Estudiar el tipo de muerte celular inducido por los ésteres de los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> en células de cáncer de mama humano.

## 4.- MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Compuestos en estudio.

Los compuestos utilizados en la presente tesis (Figura 1) fueron sintetizados en el Laboratorio de Química Experimental, del Departamento de Química de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación (UMCE), según lo descrito por Jara et al. (2014) [39]. Todas las soluciones stock y diluciones posteriores se prepararon en DMSO (Merck, Darmstadt, Alemania) y se agregaron a los cultivos cuidando que la concentración del solvente nunca superara el 1% respecto al medio de cultivo. El protocolo de síntesis se presenta en el Anexo 1.



**Figura 1.** Estructura de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> y las moléculas control.

#### **4.2.- Líneas celulares y cultivo celular.**

Las células de cáncer mamario humano MDA-MB-361 (código ATCC® HTB-27™), BT-474 (código ATCC® HTB-20™), MCF7 (código ATCC® HTB-22™), AU565 (código ATCC® CRL-2351™) y MDA-MB-231 (código ATCC® HTB-26™) fueron adquiridas a la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, E.E.U.U.). La línea celular de epitelio mamario humano normal MCF 10F (código ATCC® CRL-10318™) fue gentilmente donada por la Dra. Gloria Calaf de la Universidad de Tarapacá, Chile.

Las líneas celulares BT-474, MCF7 y MDA-MB-231 fueron cultivadas en medio DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.E.U.U.), la línea celular AU565 fue cultivada en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) y la línea celular MDA-MB-361 en medio Leibovitz's L-15 (Sigma-Aldrich). En todos los casos el medio de cultivo fue suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB), y penicilina (100 UI/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml).

Las células modificadas MCF7-TAMR fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml), y tamoxifeno 5 µM. Las células MCF7-Sph fueron obtenidas al mantener células MCF7 parentales en medio DMEM avanzado (Sigma-Aldrich) suplementado con Neurocult Neural Stem Cell Proliferation Supplement (Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canadá), rhEGF (20ng/ml; Sigma-Aldrich), rhFGF (10ng/ml; Sigma-Aldrich) y penicilina (100 UI/ml) y

estreptomycin (100 µg/ml). Las células modificadas MCF7-rho0 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con SFB al 10 %, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), uridina (50 µg/ml; Sigma-Aldrich) y piruvato de sodio (100 µg/ml; Sigma-Aldrich).

La línea celular MCF 10F fue cultivada en medio DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal equino al 10% (SFE), e insulina, hEGF, gentamicina e hidrocortisona, contenidos en el kit *MEGM SingleQuots* (Lonza, Basilea, Suiza).

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37 °C.

#### **4.3.- Ensayos de viabilidad celular.**

La evaluación del efecto de las moléculas en estudio sobre la viabilidad de las líneas celulares MDA-MB-361, AU565, MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F fue realizada mediante el ensayo de reducción de MTT [81]. Para ello, se sembraron  $1 \cdot 10^4$  células por pocillo en una placa de 96 pocillos, y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se agregaron concentraciones crecientes de cada compuesto en estudio (0,1-200 µM) y se incubaron las células por 24, 48 o 72 horas adicionales. Transcurrida la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS, y se les agregó la sal de MTT (0,5 mg/ml). Tras una hora de incubación, los cristales formados

fueron solubilizados con DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas ELISA (BioRad, Hercules, CA, E.E.U.U.).

El ensayo de tinción por cristal violeta también se utilizó para determinar el efecto de los compuestos en estudio sobre la viabilidad de las líneas celulares MCF7, BT-474, MCF7-rho0 y MCF7-TAMR [82]. La siembra y la incubación de cada línea con los compuestos se realizaron de la misma forma que en el ensayo de reducción de MTT. Una vez transcurrido el tiempo de incubación (48 o 72 horas), las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, y lavadas con PBS. A continuación, las células fueron incubadas con cristal violeta (0,05% en agua) a temperatura ambiente durante 2 horas y lavadas nuevamente con PBS. Finalmente, se agregó SDS 1% para disolver los cristales, se incubó durante 1 hora (bajo agitación constante) y se midió la absorbancia de cada pocillo a 595 nm, utilizando un lector de placas ELISA (BioRad).

El análisis del efecto citotóxico de los compuestos en estudio sobre la viabilidad de células MCF7-Sph se realizó mediante la evaluación del contenido de ATP celular, utilizando el kit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, WI, E.E.U.U.). En breve, se sembraron  $1 \cdot 10^4$  células por pocillo en una placa de 96 pocillos, y se incubaron por 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la formación de las esferas. A continuación, se agregaron concentraciones crecientes de cada compuesto en estudio (0,1-200 µM) y se

incubaron las células por 48 o 72 horas adicionales. Finalmente, las células fueron lisadas según las instrucciones del kit, el contenido total de cada pocillo transferido a una placa opaca y la luminiscencia determinada mediante un lector de placas Varioskan® Flash (Thermo Scientific, Waltham, MA, E.E.U.U.). Se realizó el mismo procedimiento con células MCF7 parentales con el fin de comparar el efecto citotóxico de los compuestos en ambas líneas celulares.

De manera similar, el ensayo de formación de colonias se utilizó para determinar el efecto de los compuestos en estudio sobre la proliferación celular [83]. En resumen, 500 células/pocillo fueron sembradas en placas de 6 pocillos e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de cada compuesto por 24 horas (0,1 – 2,5 µM para las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, 1-10 µM para la línea celular MCF 10F). A continuación, las células se lavaron con PBS, se renovó el medio de cultivo por uno libre de compuestos y las células fueron incubadas por 5 días adicionales a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la formación de colonias. Finalmente, las colonias fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol por 30 minutos, lavadas con PBS y fotografiadas.

Adicionalmente, el efecto citotóxico de los compuestos fue evidenciado mediante la cuantificación de la liberación de LDH al medio extracelular, utilizando el kit *LDH-Cytotoxicity Assay Kit II* (Abcam, Cambridge, R.U.). En resumen, 2·10<sup>4</sup> células/pocillo fueron sembradas en placas de 96 pocillos e

incubadas durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se agregó cada compuesto (10 y 20 µM) y se incubaron las células por 24 horas adicionales. Finalmente, el sobrenadante de cada pocillo fue transferido a una nueva placa (10 µl/pocillo) y sobre éste último se agregó el Mix de Reacción de LDH (contenido en el kit; 100 µl/pocillo). La placa fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia a 450 nm fue cuantificada utilizando un lector de placas Varioskan® Flash (Thermo Scientific). Todos los valores se expresan como porcentaje de actividad de LDH respecto al obtenido de células incubadas con la Solución de Lisis Celular (contenida en el kit) por 24 horas (correspondiente al 100% de liberación de LDH).

En todos los ensayos de citotoxicidad, los resultados fueron comparados con el control, el cual corresponde a células incubadas con DMSO en igual concentración a la utilizada al agregar los compuestos.

#### **4.4.- Extracción de RNA, transcripción inversa y qPCR.**

La evaluación del efecto de los compuestos en estudio sobre los niveles de diferentes *mRNA* se realizó mediante qPCR, según lo descrito por Truksa et al. (2015) [59]. Para ello,  $1 \cdot 10^7$  células fueron sembradas en una placa Petri de 60 mm e incubadas durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente las células fueron tratadas con cada uno de los compuestos en estudio (5 µM) durante 24 horas. El control corresponde a células incubadas con DMSO en ausencia de compuestos. El RNA total fue extraído mediante el kit *RNAzo*®

*RT* (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, E.E.U.U.) según las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron guardadas a -80 °C para su posterior uso.

La transcripción inversa se realizó mediante el kit *RevertAid cDNA First Strand Synthesis* (Thermo Scientific). En breve, 0,5 µg de RNA total fueron incubados con oligo-dT durante 5 minutos a 65 °C para denaturar el RNA y posteriormente enfriados a 4 °C. A la mezcla se le añadió un inhibidor de RNAasa, nucleótidos y la enzima transcriptasa reversa y se incubó durante 60 minutos a 45 °C para permitir la transcripción inversa, durante 5 minutos a 75 °C para inactivar la enzima, y finalmente las muestras de DNA complementario (cDNA) se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

El análisis de qPCR se realizó mediante el kit *5x HOT FIREpol Eva Green qPCR mix* (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), utilizando un equipo *Illumina Eco Real-Time PCR System* (Illumina, San Diego, CA, E.E.U.U.). En breve, 100 ng de cDNA se mezclaron con *5x Eva Green mastermix* (contenido en el kit) y los respectivos partidores (directo e inverso, 10 µM c/u). Todos los partidores se obtuvieron de Sigma-Aldrich según lo reportado por Truksa et al. (2015) [59], y sus secuencias se muestran en el Anexo 2. Tras mezclar el contenido de la placa por inversión, se incubó durante 12 minutos a 95 °C para la denaturación inicial de la muestra y el qPCR se realizó de acuerdo al siguiente protocolo (38 ciclos):

- 10 segundos a 95 °C (denaturación)
- 20 segundos a 60 °C (hibridación)
- 20 segundos a 72 °C (extensión y cuantificación).

La cuantificación de la expresión relativa de cada *mRNA* se realizó mediante el método de  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando los genes “*house-keeping*” POLR2a y RPLP0 para la comparación.

#### **4.5.- Ensayo de consumo de oxígeno celular.**

El efecto de los compuestos en estudio sobre el consumo de oxígeno celular fue evaluado polarográficamente, utilizando un electrodo de Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, E.E.U.U.), acoplado a un monitor YSI (modelo 53) conectado a un módulo DI-148U con interfaz USB. La medición fue monitoreada mediante el software Windaq Acquisition Waveform Recorder (DataQ Instruments, E.E.U.U.) [39].

Para cada medición,  $4 \cdot 10^6$  células fueron resuspendidas en 600  $\mu$ l de PBS y se agregaron a una cámara hermética. La cuantificación de los niveles de oxígeno se inició inmediatamente después de la adición de las células y los siguientes compuestos fueron adicionados en orden: oligomicina (2,5  $\mu$ g/ml) como un inhibidor del complejo V, uno de los compuestos en estudio (en concentración 10, 20 o 50  $\mu$ M), y finalmente rotenona (10  $\mu$ M) como un inhibidor de la respiración mitocondrial. La respiración celular máxima se

definió como la obtenida tras la adición de oligomicina y posteriormente del desacoplante CCCP (0,5  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se expresan como la razón entre el consumo de oxígeno medido tras la adición del compuesto en estudio (o CCCP) y el consumo de oxígeno observado tras la adición de oligomicina.

#### **4.6.- Ensayos de cuantificación de ROS.**

El efecto de los compuestos en estudio sobre los niveles de superóxido mitocondrial fue estudiado utilizando la sonda fluorescente MitoSOX Red<sup>®</sup> [84]. Para ello, células MCF7 y MDA-MB-231 ( $1 \cdot 10^5$  células/pocillo) fueron sembradas en placas de 24 pocillos e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron incubadas con la sonda MitoSOX (5  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, protegidas de la luz, y lavadas con PBS. A continuación, se agregó cada uno de los compuestos en estudio en concentraciones crecientes (1-100  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron las células por 2 horas a 37 °C. Finalmente, las células fueron recolectadas mediante tripsinización, resuspendidas en PBS y la fluorescencia debida a la oxidación de MitoSOX (530<sub>Ex</sub>/580<sub>Em</sub> nm) fue cuantificada mediante citometría de flujo (FACSAria<sup>®</sup>III, BD Biosciences). El control corresponde a células pre-incubadas con MitoSOX a las que se les adicionó DMSO 1% (como vehículo de adición de los compuestos) y los resultados se expresan como %URF respecto al control. Rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) se utilizó como control positivo de producción de superóxido.

En un experimento similar, células MCF7, BT-474 y MCF 10F ( $1 \cdot 10^5$  células/pocillo) fueron sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, las células fueron co-incubadas con cada uno de los compuestos en estudio ( $20 \mu\text{M}$ ) durante 5, 15, 30 y 60 minutos y con MitoSOX ( $5 \mu\text{M}$ ) durante 15 minutos. Tras la incubación, las células fueron recolectadas mediante tripsinización, resuspendidas en PBS y la fluorescencia debida a la oxidación de MitoSOX fue analizada según lo descrito anteriormente.

De manera similar, el efecto de los compuestos en estudio sobre el nivel celular de especies reactivas de oxígeno fue estudiado utilizando la sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) [85]. Para ello,  $1 \cdot 10^5$  células/pocillo fueron sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, las células fueron co-incubadas con cada uno de los compuestos en estudio ( $20 \mu\text{M}$ ) durante 5, 15, 30 y 60 minutos y con DCFDA ( $5 \mu\text{M}$ ) durante 15 minutos. Tras la incubación, las células fueron recolectadas mediante tripsinización, resuspendidas en PBS y la fluorescencia debida a la oxidación de DCFDA fue analizada mediante citometría de flujo (FACS Aria®III, BD Biosciences) a las longitudes de onda  $495_{\text{Ex}}/529_{\text{Em}}$  nm.

En todos los casos, se utilizaron células pre-incubadas con cada una de las sondas fluorescentes, a las cuales se les adicionó DMSO a igual concentración que a aquellas incubadas con los compuestos en estudio, como control.

#### **4.7.- Ensayo de determinación de niveles de GSH y GSSG.**

La determinación del efecto de los compuestos en estudio sobre los niveles intracelulares de glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG, respectivamente) se realizó mediante el kit *Glutathione Fluorometric Assay* (BioVision, Milpitas, CA, E.E.U.U.) [86]. En resumen, células MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F ( $3 \cdot 10^6$  células/pocillo) fueron sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron incubadas con cada uno de los compuestos en estudio (5 µM) por 24 horas, recolectadas mediante tripsinización y resuspendidas en 100 µl de *Assay Buffer* (contenido en el kit). De la anterior suspensión, 60 µl fueron añadidos a un tubo con 20 µl de ácido perclórico 6 N, y la mezcla fue agitada, incubada en hielo durante 5 minutos y centrifugada por 2 minutos (13.000g a 4 °C). Al sobrenadante se le añadieron 40 µl de hidróxido de sodio 6 N frío y se mantuvo en hielo por 5 minutos. Tras una nueva centrifugación (2 minutos a 13.000g a 4 °C), se transfirieron 10 µl de cada muestra a una placa negra de 96 pocillos en triplicado (para la cuantificación diferencial de GSH, GSSG y glutatión total). Para la cuantificación de GSH se adicionaron 80 µl de *Assay Buffer* a uno de los pocillos anteriormente mencionados. Para la determinación de GSSG, se

añadieron 60  $\mu\text{l}$  de *Assay Buffer* y 10  $\mu\text{l}$  de *Quencher* (contenido en el kit). Tras 10 minutos de incubación, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de *Reducing Agent* (contenido en el kit) y se incubó por 10 minutos adicionales. Para la determinación de glutatión total, se añadieron 70  $\mu\text{l}$  de *Assay Buffer* y 10  $\mu\text{l}$  de *Reducing Agent* al tercer pocillo y se incubó por 10 minutos. Finalmente, se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de o-ftalaldehído (contenido en el kit) a cada uno de los pocillos, se incubó por 40 minutos y la fluorescencia se cuantificó mediante un lector de placas Varioskan® Flash (Thermo Scientific) a 340<sub>Ex</sub>/420<sub>Em</sub> nm. Los resultados se expresan como la razón entre las concentraciones de GSH y GSSG, las cuales fueron calculadas mediante interpolación en una curva estándar de GSH obtenida utilizando el mismo kit. Células incubadas con DMSO (a igual concentración que la utilizada para la adición de los compuestos) fueron utilizadas como control.

#### **4.8.- Ensayos de determinación de potencial de transmembrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ).**

El efecto de los compuestos en estudio sobre el potencial de transmembrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) fue estudiado mediante la sonda fluorescente safranina-O [87-89]. En resumen,  $2\cdot 4\cdot 10^6$  células (4 mg de proteína total) fueron pre-incubadas con glutamato + malato (4 mM c/u), safranina-O (5  $\mu\text{M}$ ) y digitonina (8  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 5 minutos en una cámara de fluorímetro. La medición de fluorescencia (485<sub>Ex</sub>/586<sub>Em</sub> nm) se inició a continuación y se monitorearon 200

segundos para permitir el establecimiento de una línea base. A continuación, cada uno de los compuestos en estudio se agregó a la cámara (en concentraciones de 5, 10 o 20  $\mu\text{M}$ ) y la fluorescencia fue monitoreada por 800 segundos adicionales utilizando un espectrofluorímetro JASCO FP-6200 (Jasco Applied Sciences, Halifax, Nova Scotia, Canadá). La pérdida total de  $\Psi_m$  fue determinada en una medición independiente mediante la adición de CCCP (0,5  $\mu\text{M}$ ), 200 segundos después de iniciada la medición, en ausencia de cualquier derivado con TPP<sup>+</sup>.

Alternativamente, se determinó el potencial de transmembrana mitocondrial, y el efecto de los compuestos en estudio sobre éste último, utilizando la sonda fluorescente tetrametilrodamina metil éster (TMRM) [90]. En resumen,  $1 \cdot 10^5$  células/pocillo fueron sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron co-incubadas con cada uno de los compuestos en estudio (10  $\mu\text{M}$ ) durante 5, 15, 30 y 60 minutos y con TMRM (50 nM) durante 15 minutos. Tras la incubación, las células fueron recolectadas mediante tripsinización, resuspendidas en PBS y la fluorescencia de TMRM fue analizada mediante citometría de flujo (FACS Aria® III, BD Biosciences) a las longitudes de onda 548<sub>Ex</sub>/573<sub>Em</sub> nm. En ambos casos el control corresponde a células tratadas con DMSO a una concentración igual a la utilizada para la adición de los compuestos en estudio.

#### **4.9.- Ensayo de determinación de ATP celular.**

El nivel de ATP celular, y el efecto de los compuestos sobre éste, se determinó mediante el kit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega). Para ello,  $1 \cdot 10^4$  células/pocillo fueron sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se agregaron los compuestos en estudio (10-20 µM) y se incubaron por 4 horas. Finalmente, las células fueron lisadas según las instrucciones del kit, el contenido total de cada pocillo transferido a una placa opaca y la luminiscencia determinada mediante un lector de placas Varioskan® Flash (Thermo Scientific).

Con el fin de determinar si la caída del ATP está asociada a alguna de las enzimas sensores de ATP: AMPK y adenilato quinasa, se repitió la medición en presencia del inhibidor de la AMPK, dorsomorfina (1 µM) [91], o del inhibidor de la adenilato quinasa, Ap5A (5 µM) [92]. Para permitir la entrada del Ap5A a las células, se agregó digitonina (0,625 µg/ml) durante la última hora de la incubación. Tras las incubaciones, las células fueron lisadas y la luminiscencia cuantificada según se describió anteriormente. Los controles corresponden a células incubadas con DMSO (a igual concentración que la utilizada para añadir los compuestos) en ausencia o presencia de dorsomorfina y Ap5A.

#### **4.10.- Ensayo de actividad ATPasa del complejo V.**

La actividad ATPasa del complejo V mitocondrial también fue estudiada mediante la sonda fluorescente safranina-O. En resumen, células MCF7 y MDA-MB-231 fueron pre-incubadas con safranina, digitonina y glutamato + malato como se indicó anteriormente. Tras establecer la línea base por 200 segundos, se agregó CCCP (0,5  $\mu$ M) o uno de los compuestos en estudio (10  $\mu$ M) como desacoplantes, o rotenona (5  $\mu$ M) como inhibidor del complejo I y se monitoreó la fluorescencia por 400 segundos adicionales. Una vez alcanzado el máximo de fluorescencia, se agregó ATP (5 mM) para activar la actividad ATPasa del complejo V y la fluorescencia se monitoreó por otros 400 segundos.

#### **4.11.- Ensayo de marcación con Anexina V/yoduro de propidio.**

El tipo de muerte celular inducido por los compuestos fue estudiado por medio del doble marcaje con anexina V/yoduro de propidio (AV/PI), utilizando el kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (Abcam, Cambridge, R.U.). En resumen,  $5 \cdot 10^4$  células/pocillo fueron sembradas en placas de 24 pocillos e incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de los compuestos en estudio (2.5-5  $\mu$ M para las líneas MCF7 y MCF 10F, 10-20  $\mu$ M para la línea MDA-MB-231) durante 48 horas. Finalmente, las células fueron recolectadas mediante tripsinización, resuspendidas en buffer *annexin V binding 1X* (contenido en el

kit), y se les adicionó anexina V y yoduro de propidio. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente (protegidas de la luz), la fluorescencia de cada muestra se determinó mediante citometría de flujo (FACSAria®III, BD Biosciences). Las longitudes de onda utilizadas fueron 488<sub>Ex</sub>/530<sub>Em</sub> nm para AV-FITC y 488<sub>Ex</sub>/575<sub>Em</sub> nm para PI. Los resultados se expresan como % de células apoptóticas respecto al total (suma de células AV+/PI- y AV+/PI+), % de células necróticas (células AV-/PI+) y % de células vivas (células AV-/PI-). El software Cyflogic (versión32, no-comercial, CyFlo Ltd.) se utilizó para el procesamiento y análisis de los datos.

Un experimento similar se realizó incubando células MCF7 y MCF-TAMR (5·10<sup>4</sup> células/pocillo) con PCA-TPP<sup>+</sup> o GA-TPP<sup>+</sup> (2,5-10 μM), o C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> (10 μM) durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido dicho período, las células fueron recolectadas, tratadas y analizadas según se describió anteriormente.

En ambos casos el control correspondió a células incubadas con DMSO, a una concentración equivalente a la utilizada para la adición de los compuestos en estudio.

#### **4.12.- Ensayo de migración celular.**

El efecto de los compuestos en estudio sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 se determinó mediante el ensayo de cierre de herida [93].

Brevemente, se sembraron  $1 \cdot 10^5$  células/pocillo en placas de 24 pocillos, y se incubaron en medio DMEM suplementado con 10% SFB a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar confluencia. Posteriormente, se realizó una herida en cada pocillo mediante una punta de micropipeta de 200 µL, se lavó tres veces con PBS estéril y los compuestos analizados fueron agregados en concentraciones crecientes (1, 2,5 y 5 µM) en medio DMEM sin SFB. Como control positivo de migración se utilizó bromodesoxiuridina (BrdU; 30 y 50 µM) en DMEM suplementado con 10% de SFB y como control de vehículo se utilizó DMSO (a la misma concentración utilizada para añadir los compuestos) en DMEM sin SFB. Cada pocillo fue fotografiado tres veces a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas utilizando un microscopio Olympus CKX41, y el análisis de las imágenes se realizó mediante el software Image J (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.). Para la cuantificación de la migración celular, cada pocillo fue comparado con su propia herida registrada a tiempo 0 y los resultados se expresan como % área de herida vs. Tiempo.

#### **4.13.- Análisis estadístico.**

Todos los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM y son producto de a lo menos tres experimentos independientes. Los valores de IC<sub>50</sub> fueron obtenidos desde datos ajustados a una curva semi-logarítmica de dosis-respuesta, utilizando el software GraphPadPrism 5.0 y las comparaciones entre las distintas curvas fueron realizadas mediante ANOVA de dos vías con

post-test de Bonferroni. La comparación entre los diferentes grupos en los gráficos de barras se realizó mediante ANOVA de una o dos vías con post-test de Bonferroni utilizando el mismo software anteriormente mencionado. Se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1.- Efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer mamario humano.

El primer objetivo de la presente tesis consistió en estudiar la capacidad citotóxica de los ácidos protocatecuico y gentísico, unidos a trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>) en líneas celulares de cáncer de mama humano, representativas de los cuatro subtipos distintos de cáncer (con diferente patrón de expresión de los receptores ER y HER2/neu). Dichas líneas celulares se diferencian además en el estado de la proteína p53 y en su tipo de metabolismo.

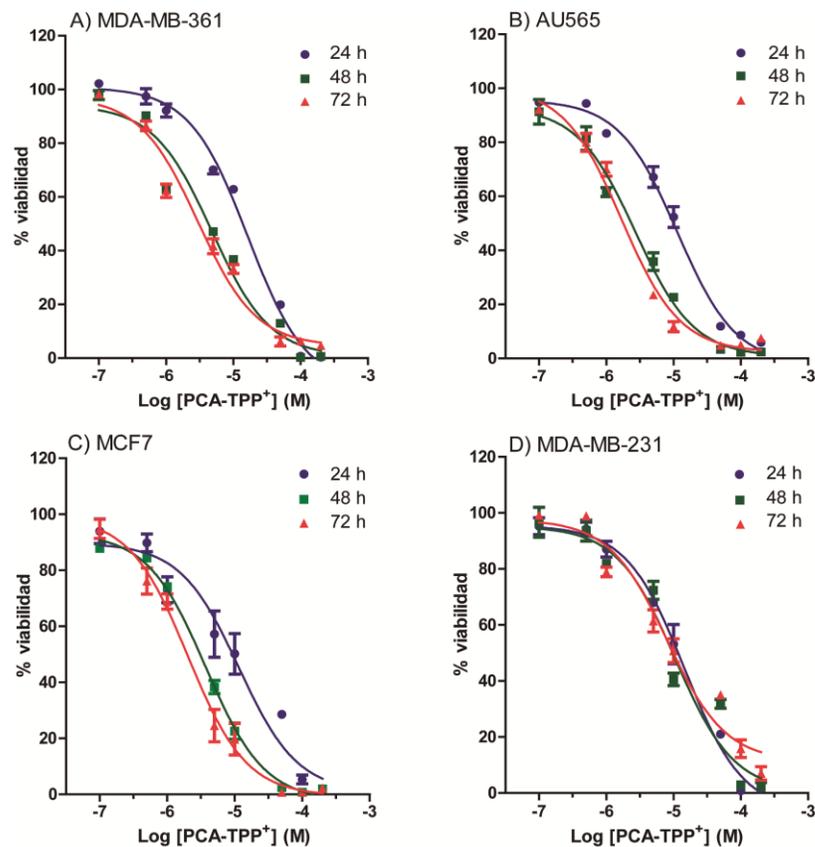
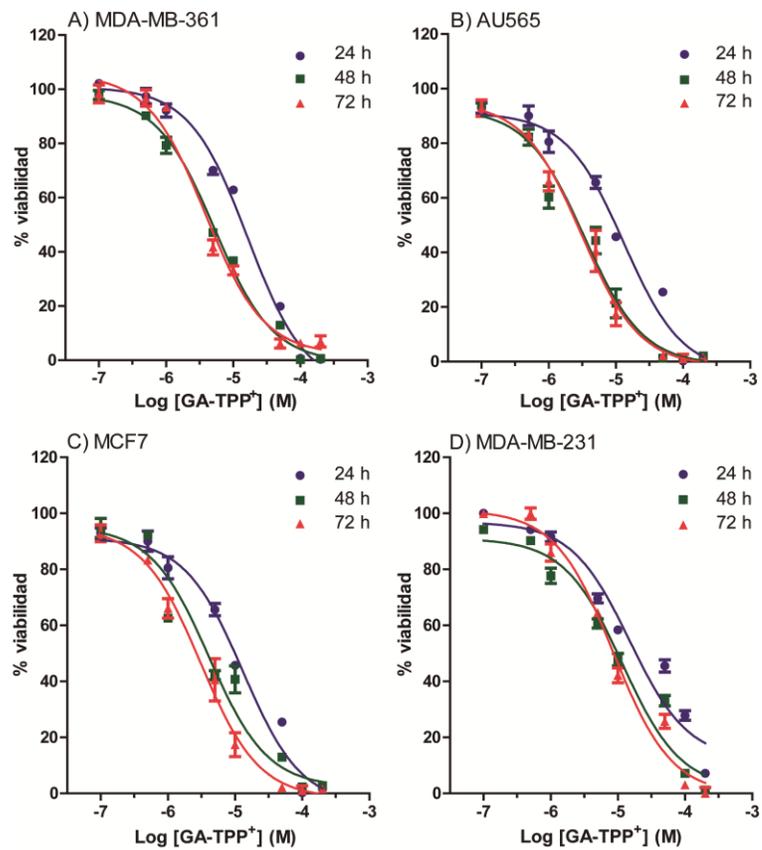


Figura 2. Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> sobre la viabilidad de células de cáncer mamario humano.

La evaluación inicial de la potencia citotóxica se realizó mediante la técnica de reducción de sales de tetrazolio (MTT) obtenida tras la incubación de cada línea celular durante 24, 48 y 72 horas con concentraciones crecientes de cada uno de los ácidos (0,1-200  $\mu$ M). Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3, como curvas sigmoidales % viabilidad vs logaritmo de la concentración de ácido-TPP<sup>+</sup>.



**Figura 3.** Efecto de GA-TPP<sup>+</sup> sobre la viabilidad de células de cáncer mamario humano.

Como se puede observar, ambos compuestos muestran una acción citotóxica concentración-dependiente en las 4 líneas celulares ensayadas. Sin embargo, si bien las células MDA-MB-361, AU565 y MCF7 muestran una diferencia en su sensibilidad tras 24 y 48 horas, la línea celular MDA-MB-231 exhibe curvas muy

similares a los tres tiempos ensayados. El mismo experimento se realizó incubando las células con cada uno de los compuestos mostrados en la figura 1 durante 24, 48 y 72 horas (resultados mostrados en Tabla I como valores de IC<sub>50</sub>).

**Tabla I.** Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos en estudio en células MDA-MB-361, AU565, MCF7 y MDA-MB-231.

A)

MDA-MB-361 (μM)			
Compuesto	24 horas	48 horas	72 horas
PCA-TPP*	16,44 ± 0,46	4,75 ± 0,50 <sup>a</sup>	2,96 ± 0,49 <sup>a,b</sup>
GA-TPP*	16,39 ± 0,49	5,25 ± 0,45 <sup>a</sup>	3,86 ± 0,49 <sup>a,b</sup>
PCA-C <sub>10</sub>	> 400	> 400	> 400
GA-C <sub>10</sub>	> 400	> 400	> 400
C <sub>10</sub> -TPP*	16,60 ± 0,64	8,60 ± 0,53 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,50 <sup>a,b</sup>
P(Ph) <sub>3</sub>	232,03 ± 13,40	225,12 ± 8,64	203,90 ± 7,16

B)

AU565 (μM)			
Compuesto	24 horas	48 horas	72 horas
PCA-TPP*	11,41 ± 0,46	2,70 ± 0,47 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,45 <sup>a,b</sup>
GA-TPP*	13,11 ± 0,46	4,90 ± 0,49 <sup>a</sup>	3,07 ± 0,49 <sup>a,b</sup>
PCA-C <sub>10</sub>	> 400	> 400	> 400
GA-C <sub>10</sub>	> 400	> 400	> 400
C <sub>10</sub> -TPP*	17,59 ± 0,75	6,74 ± 0,60 <sup>a</sup>	3,35 ± 0,58 <sup>a,b</sup>
P(Ph) <sub>3</sub>	185,41 ± 10,54	181,47 ± 6,04	175,84 ± 5,37

C)

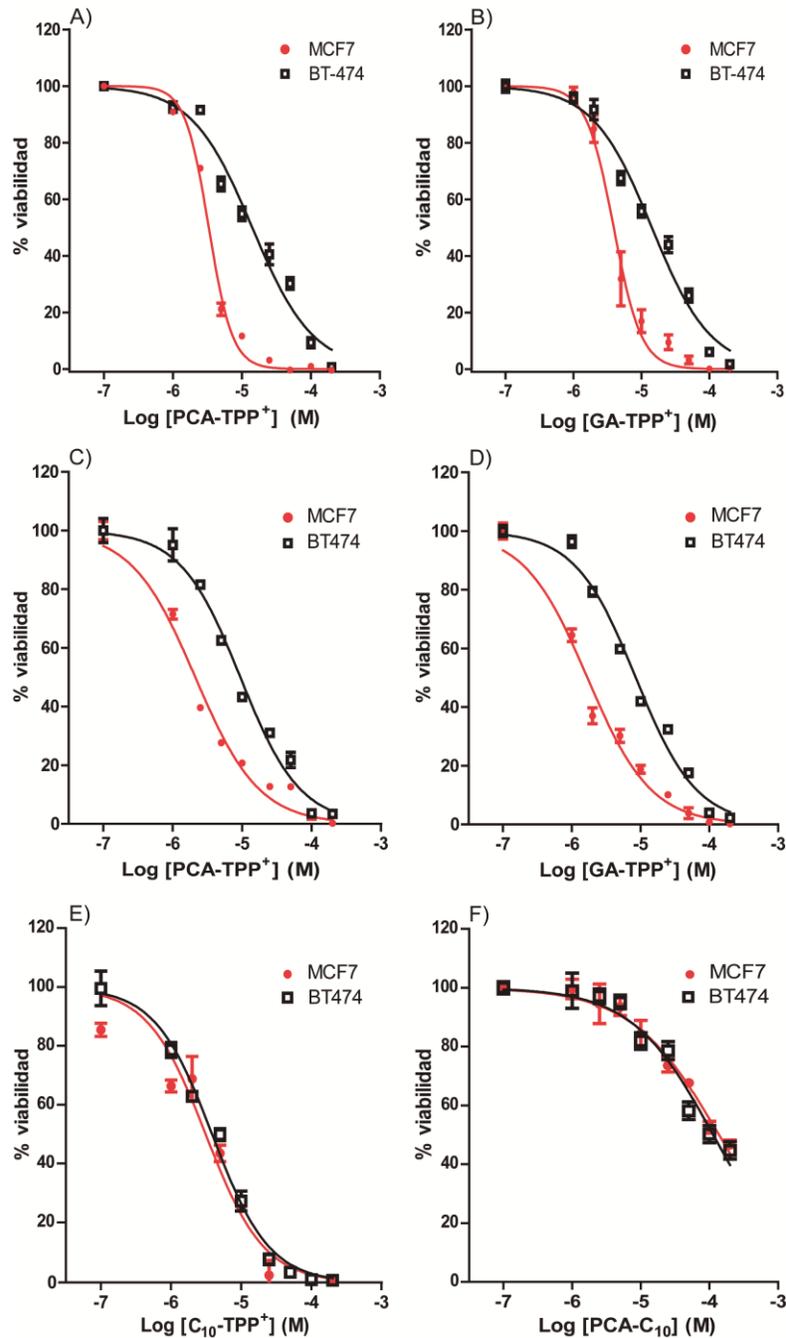
MCF7 (μM)			
Compuesto	24 horas	48 horas	72 horas
PCA-TPP*	11,54 ± 0,55	3,72 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,48 <sup>a,b</sup>
GA-TPP*	9,42 ± 0,45	3,12 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,49 <sup>a,b</sup>
PCA-C <sub>10</sub>	> 400	> 400	> 400
GA-C <sub>10</sub>	> 400	> 400	> 400
C <sub>10</sub> -TPP*	16,01 ± 0,55	7,44 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,07 ± 0,64 <sup>a,b</sup>
P(Ph) <sub>3</sub>	75,89 ± 1,33	72,08 ± 2,12	73,05 ± 0,94

D)

MDA-MB-231 (μM)			
Compuesto	24 horas	48 horas	72 horas
PCA-TPP*	14,62 ± 0,47	10,63 ± 0,53	8,03 ± 0,49
GA-TPP*	15,03 ± 0,45	11,68 ± 0,45	8,55 ± 0,45
PCA-C <sub>10</sub>	> 400	> 400	> 400
GA-C <sub>10</sub>	> 400	> 400	> 400
C <sub>10</sub> -TPP*	18,16 ± 0,67	5,62 ± 0,59 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,50 <sup>a,b</sup>
P(Ph) <sub>3</sub>	202,03 ± 11,00	205,77 ± 5,57	210,30 ± 6,29

Los valores de IC<sub>50</sub> para cada uno de los compuestos fueron calculados mediante interpolación a partir de las respectivas curvas dosis-respuesta para la reducción de MTT (promedio ± SEM). a: p < 0,05 respecto al mismo compuesto a 24 horas. b: p < 0,05 respecto al mismo compuesto a 48 horas.

De manera similar, se estudió el efecto citotóxico de los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> mediante el ensayo de tinción con cristal violeta.



**Figura 4.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup>, GA-TPP<sup>+</sup>, C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> y PCA- C<sub>10</sub> sobre la viabilidad de células BT-474 y MCF7.

Los resultados de dichos experimentos, graficados en la figura 4, muestran que, si bien los ácidos poseen un efecto citotóxico dependiente de la concentración en ambas líneas celulares utilizadas tras 48 horas de incubación, las células BT-474 parecen ser más resistentes a la acción citotóxica de ambos compuestos que la línea celular MCF7 (Figuras 4A y 4B). Dicha diferencia se mantiene cuando la incubación se realiza por 72 horas (Figuras 4C y 4D). De manera interesante, el efecto de las moléculas controles PCA-C<sub>10</sub> y TPP<sup>+</sup>-C<sub>10</sub> no muestra diferencias entre las líneas celulares MCF7 y BT-474 tras 72 horas de incubación (Figuras 4E y 4F). Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en los experimentos arriba mencionados se muestran en la Tabla II.

**Tabla II.** Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos en estudio en células MCF7 y BT-474.

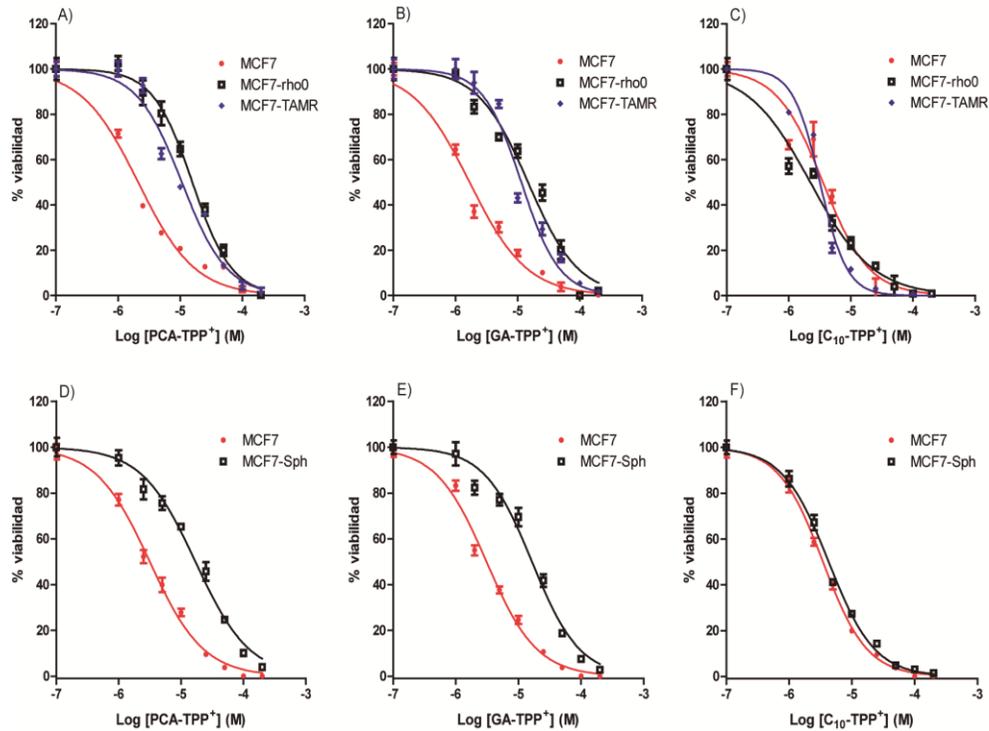
A)			B)		
Línea celular	PCA-TPP <sup>+</sup> (μM)		Línea celular	GA-TPP <sup>+</sup> (μM)	
	48 horas	72 horas		48 horas	72 horas
MCF7	3,32 ± 0,34	2,11 ± 0,29	MCF7	3,92 ± 0,27	1,69 ± 0,31
BT-474	14,15 ± 0,36 <sup>a</sup>	9,41 ± 0,38 <sup>a</sup>	BT-474	14,29 ± 0,26 <sup>a</sup>	8,53 ± 0,24 <sup>a</sup>

C)		
Línea celular	72 horas (μM)	
	C <sub>10</sub> -TPP <sup>+</sup>	PCA-C <sub>10</sub>
MCF7	3,14 ± 0,48	137,90 ± 5,29
BT-474	3,88 ± 0,27	113,40 ± 4,95

Los valores de IC<sub>50</sub> para cada uno de los compuestos fueron calculados mediante interpolación a partir de las respectivas curvas dosis-respuesta para la tinción con cristal violeta (promedio ± SEM). a: p < 0,05 respecto a MCF7 al mismo tiempo de incubación.

Adicionalmente, se estudió el efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre la viabilidad de células modificadas en el laboratorio (MCF7-rho0, MCF7-TAMR y MCF7-Sph).



**Figura 5.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup>, GA-TPP<sup>+</sup> y C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> sobre la viabilidad de células MCF7 modificadas en el laboratorio.

De manera interesante, podemos observar que las células MCF7-rho0 (carentes de DNA mitocondrial), MCF7-TAMR (resistentes a tamoxifeno) y MCF7-Sph (crecidas como esferas), muestran una menor sensibilidad que la línea parental MCF7 a la acción citotóxica de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> tras 72 horas de incubación (Figuras 5A, 5B, 5D y 5E). Por otra parte, el compuesto C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> se mostró igualmente potente frente a todas las líneas celulares ensayadas (Figuras

5C y 5F). Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos a partir de la figura 5 se muestran en la Tabla III.

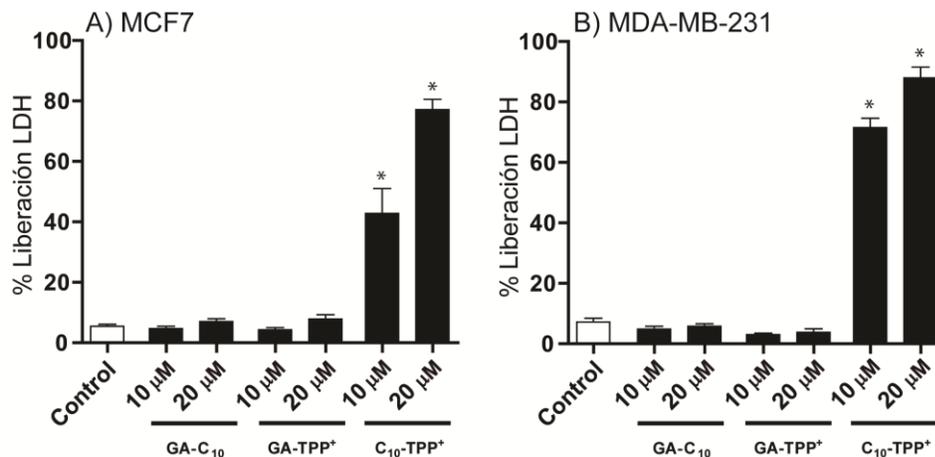
**Tabla III.** Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos en estudio en células MCF7, MCF7-rho0, MCF7-TAMR y MCF7-Sph.

Línea celular	72 horas (μM)		
	PCA-TPP <sup>+</sup>	GA-TPP <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> -TPP <sup>+</sup>
<b>MCF7</b>	3,16 ± 0,22	3,10 ± 0,20	3,47 ± 0,14
<b>MCF7-rho0</b>	15,72 ± 0,30 <sup>a</sup>	14,72 ± 0,37 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,47
<b>MCF7-TAMR</b>	10,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	11,47 ± 0,30 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,20
<b>MCF7-Sph</b>	16,99 ± 0,29 <sup>a</sup>	16,47 ± 0,30 <sup>a</sup>	4,27 ± 0,18

Los valores de IC<sub>50</sub> para cada uno de los compuestos fueron calculados mediante interpolación a partir de las respectivas curvas dosis-respuesta para la tinción con cristal violeta (MCF7-rho0 y MCF7-TAMR) o contenido de ATP (MCF7 y MCF7-Sph) (promedio ± SEM). a: p < 0,05 respecto al mismo compuesto en MCF7.

Con el fin de comparar los diferentes resultados de los ensayos de citotoxicidad, se utilizaron los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para cada compuesto en cada una de las líneas celulares estudiadas (Tablas I, II y III). Como se puede observar, los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> poseen una potencia citotóxica similar entre ellos, sin importar la línea celular de CM. Cabe indicar que tres de los compuestos utilizados como control (cada uno de los ácidos unidos a una cadena alifática de 10 átomos de carbono, pero sin TPP<sup>+</sup>, y la trifenilfosfina sola) poseen una potencia mucho menor que los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>, lo que indicaría que se requiere del catión lipofílico para incrementar la acción citotóxica de los

compuestos. Así también, es interesante notar que la molécula que consiste de la función TPP<sup>+</sup> unida a una cadena de 10 carbonos, pero que carece de ácido benzoico, muestra un efecto citotóxico similar al de los compuestos que si incorporan un polihidroxibenzoato en su estructura, en la mayoría de las líneas celulares. Sin embargo, la incubación de células MCF7 y MDA-MB-231 durante 24 horas con concentraciones similares de los tres tipos de moléculas en estudio (GA-TPP<sup>+</sup>, GA-C<sub>10</sub> y C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup>) mostró que éste último compuesto, a diferencia de las otras dos moléculas, induce una liberación importante de la enzima LDH (aproximadamente 80% liberación a 20 μM; Figura 6).



**Figura 6.** Efecto de GA- C<sub>10</sub>, GA-TPP<sup>+</sup> y C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> sobre la liberación de LDH en células MCF7 y MDA-MB-231. \*: p < 0,05 respecto al control.

Analizando los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en los ensayos de citotoxicidad para los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> en todas las líneas celulares parentales utilizadas, es interesante mencionar que si bien la capacidad citotóxica de los compuestos parece ser similar en todas las líneas estudiadas, las líneas celulares BT-474

(ER<sup>+</sup>/HER2/neu<sup>+</sup>, p53 E285K) y MDA-MB-231 (ER<sup>-</sup>/HER2/neu<sup>-</sup>, p53 R280K) muestran una resistencia ligeramente mayor, dado que sus valores de IC<sub>50</sub> a las 48 y 72 horas son significativamente más altos que los observados en las otras líneas celulares (Tablas I y II). De acuerdo a lo anterior, es posible suponer que la presencia de los receptores ER y HER2/neu no tendría mayor relevancia en la sensibilidad frente a los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>, puesto que la línea celular MDA-MB-361 no muestra la misma resistencia, pese a poseer patrones de expresión de ambos receptores idénticos a la línea BT-474 [6, 13, 79, 94]. Sin embargo, dado el reporte de Pons et al. (2015) [66], que relaciona una mayor expresión de la isoforma β del ER con una menor sensibilidad frente a moléculas con acción tóxica mitocondrial, futuras investigaciones dirigidas a establecer si la razón ERα/ERβ es capaz de impactar la respuesta de células de cáncer mamario humano frente a la acción de los ácidos benzoicos unidos a TPP<sup>+</sup> cobran una gran relevancia.

Otro de los factores que diferencia a las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas entre sí es el estado de la proteína p53, la cual se encuentra expresada en su forma nativa (*wild type*) en algunas líneas y presenta diferentes mutaciones en otras. De acuerdo a la literatura, las mutaciones de p53 en su mayoría inducen un incremento en la función citoprotectora de dicha proteína, lo que podría implicar que células que expresen p53 mutada serían más resistentes frente a agentes citotóxicos [95]. Sin embargo, dado que la línea celular AU565 (p53 R175H) [96] no mostró una resistencia mayor que aquellas líneas que expresan

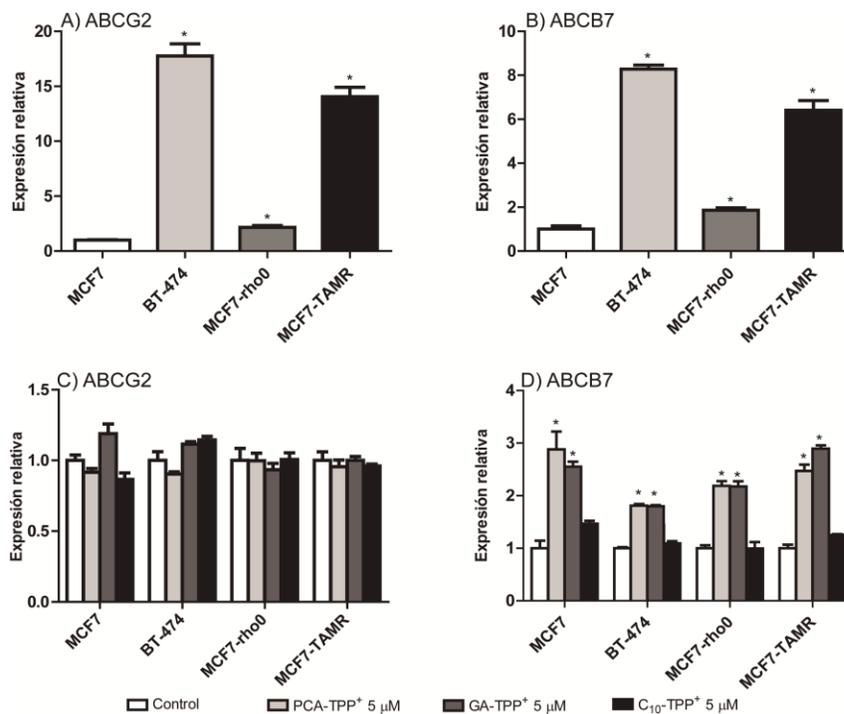
p53 nativa (MDA-MB-361 y MCF7) [97], podemos suponer que el estado de p53 no estaría relacionado con la sensibilidad a los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>. A pesar de lo anterior, y basados en el hecho de que p53 presenta numerosos tipos de mutaciones que podrían alterar de manera diferencial su funcionalidad [98], futuras investigaciones que estudien la relación entre las distintas mutaciones en dicha proteína y la función mitocondrial podrían aportar evidencia significativa en torno al efecto de compuestos con toxicidad mitocondrial en células cancerosas con p53 mutado.

Dentro de las líneas celulares ensayadas, la línea MDA-MB-231 destaca por ser la única del subtipo triple-negativo (TNBC), el cual se caracteriza por presentar propiedades de cáncer mamario avanzado [99]. Lo anterior implica que su tenor oxidativo basal está muy aumentado, y poseen una alta capacidad metastásica e invasiva. Además, se ha reportado que las células de TNBC poseen una alta actividad glicolítica, a diferencia de líneas celulares de cánceres con presencia de los receptores ER o HER2/neu, cuyo metabolismo se considera mixto [68, 100]. En la misma línea, se ha reportado que las células MDA-MB-231 son también capaces de obtener energía a partir de la glutaminólisis, lo que les permitiría resistir a inhibiciones tanto de la glicólisis como de la fosforilación oxidativa [101]. Por lo tanto, la diferencia en la sensibilidad frente a los ácidos-TPP<sup>+</sup> observada por parte de las células MDA-MB-231 podría estar dada por una mayor capacidad de respuesta metabólica frente a las interrupciones en el metabolismo energético ocasionadas por los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>.

Adicionalmente, se ha reportado que las líneas celulares modificadas MCF7-TAMR y MCF7-Sph presentan características similares a las llamadas células troncales de cáncer (CSCs) o células iniciadoras de tumores (TICs), las cuales expresan un grupo de genes fetales y han demostrado ser más resistentes a compuestos citotóxicos, además de poseer un metabolismo altamente glicolítico [102-104]. En línea con lo anterior, ambas líneas celulares modificadas mostraron ser más resistentes frente a la acción citotóxica de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> que su contraparte parental, evidenciando que cambios fenotípicos conducentes a una elevada tasa glicolítica y a un aumento en la plasticidad metabólica podrían conferir cierto grado de resistencia frente a la acción de drogas con tropismo mitocondrial. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no es posible descartar que la mayor resistencia frente al efecto citotóxico de los compuestos esté también relacionada con la inducción de la expresión de la isoforma  $\beta$  del receptor de estrógeno (lo que no ha sido determinado en las mencionadas líneas celulares).

Es preciso mencionar además que el hecho de que la depleción del DNA mitocondrial en células MCF7-rho0 confiera un alto grado de resistencia frente al efecto citotóxico de los compuestos en estudio, reafirma el concepto de que dicho efecto depende de un correcto funcionamiento de la maquinaria de la cadena de transporte de electrones (CTE) y del mantenimiento de un potencial de membrana mitocondrial alto [25, 26].

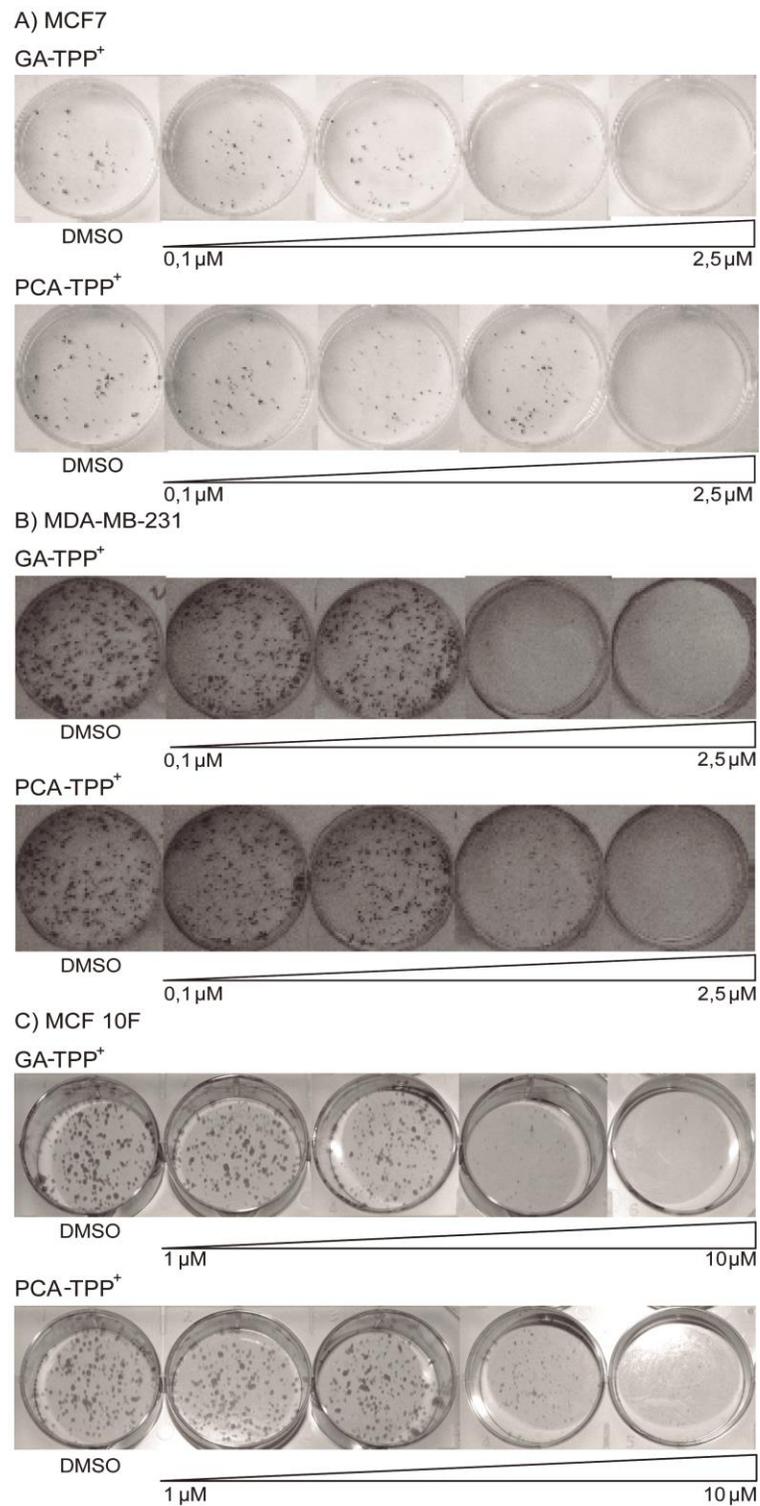
Por otra parte, si bien las células BT-474 (que también mostraron una mayor resistencia frente al efecto citotóxico de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>) poseen un metabolismo similar a las líneas celulares menos resistentes, su expresión de transportadores dependientes de ATP (transportadores ABC) mostró ser mucho mayor que aquella encontrada en células MCF7 (Figuras 7A y 7B).



**Figura 7.** Expresión de transportadores dependientes de ATP en células de cáncer mamario humano y efecto de PCA-TPP<sup>+</sup>, GA-TPP<sup>+</sup> y C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> sobre dicha expresión. A) y B) \*: p < 0,05 respecto a MCF7. C) y D) \*: p < 0,05 respecto al control.

La figura muestra que la expresión de los transportadores ABCG2 (también conocido como “*Breast Cancer Resistance Protein 1*”; BCRP1) y ABCB7 en células BT-474 es 17 y 8 veces mayor, respectivamente, que aquella observada en células MCF7. Es importante mencionar que la proteína ABCG2 es una bomba

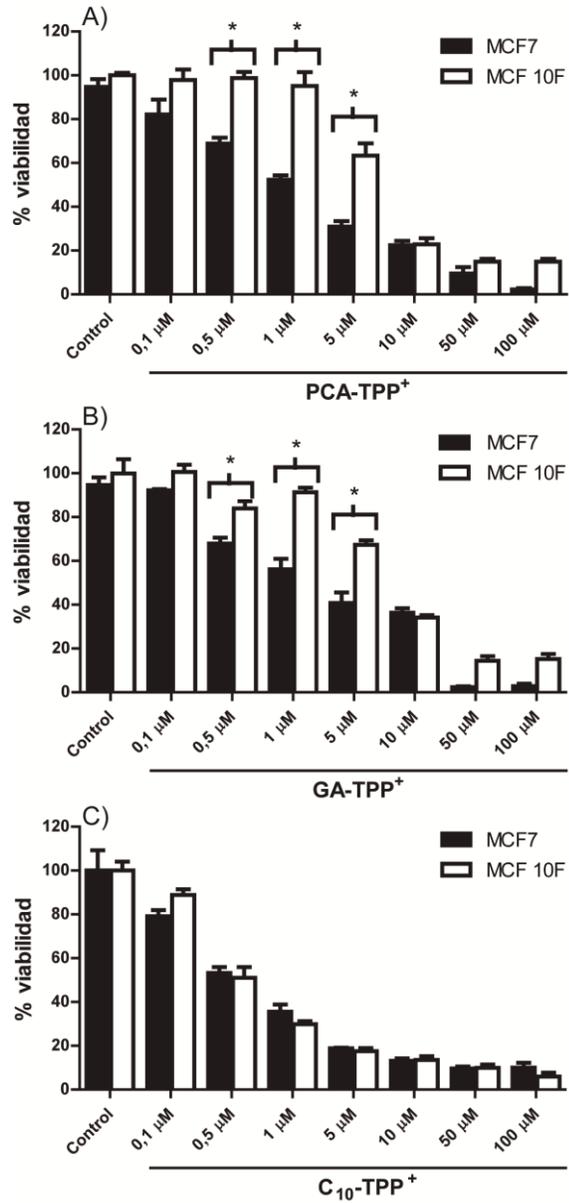
de eflujo, altamente expresada en diversos tipos de cáncer mamario humano y es considerada como un importante protector frente al efecto de drogas citotóxicas [105]. La proteína ABCB7 por su parte, es un transportador mitocondrial dependiente de ATP, y su función se caracteriza por expulsar drogas exógenas desde los espacios mitocondriales hacia el citosol [106]. Así, es posible que la sobreexpresión de ambas proteínas sea el factor subyacente a la menor sensibilidad mostrada por las células BT-474 frente al efecto tóxico de los compuestos en estudio. De manera similar, la mayor expresión de transportadores ABC mostrada por las células MCF7-TAMR también podría contribuir a su mayor resistencia frente al efecto citotóxico de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup>. Por otra parte, dado que los niveles de expresión de ambos transportadores fueron prácticamente similares entre las células MCF7 y MCF7-rho0, podemos sugerir que la mayor resistencia de las células carentes de DNA mitocondrial no estaría dada por una aumentada capacidad para eliminar los compuestos unidos a TPP<sup>+</sup>. Es interesante notar, además, que ambos compuestos, sin alterar la expresión del gen ABCG2 (Figura 7C), incrementaron significativamente la expresión del gen ABCB7 (Figura 7D), resultado que se condice con la hipótesis de que su efecto citotóxico implicaría una acumulación mitocondrial. El compuesto C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> por otra parte, no fue capaz de inducir cambios en los niveles de expresión de ninguno de los transportadores, lo que podría indicar que dicha molécula no es sustrato de ninguno de ellos, o que su efecto citotóxico impide un aumento en la síntesis de RNA (Figuras 7C y 7D).



**Figura 8.** Efecto de GA-TPP<sup>+</sup> y PCA-TPP<sup>+</sup> sobre la capacidad formadora de colonias de células MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F.

En forma paralela, la capacidad citotóxica de los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> se estudió mediante el ensayo de formación de colonias, el cual evalúa la capacidad clonogénica de las células de CM. Los resultados de dichos experimentos muestran que tanto las células MCF7 como las células MDA-MB-231, disminuyen su capacidad formadora de colonias tras ser incubadas durante 24 horas con cada uno de los compuestos en estudio (Figuras 8A y 8B). Sin embargo, es preciso notar que a pesar de que ambas líneas celulares fueron afectadas, la línea MDA-MB-231 nuevamente parece ser ligeramente más resistente que su contraparte MCF7, como se puede inferir de la mayor cantidad de colonias observadas a las concentraciones más bajas de cada ácido.

Una vez establecida la capacidad citotóxica de los compuestos en células de CM, se procedió a estudiar si dicho efecto es selectivo frente a células cancerígenas, utilizando para ello la línea celular de epitelio mamario humano MCF 10F como un modelo de célula normal. Los resultados obtenidos mediante la técnica de reducción de MTT, muestran que a concentraciones cercanas al IC<sub>50</sub> para cada uno de los compuestos en células MCF7 (entre 0,5 y 5 µM) las células normales muestran una sobrevivencia mucho mayor que las cancerígenas tras 48 horas de incubación (Figura 9A y 9B). En el experimento mostrado se utilizó la línea MCF7 como comparación frente a la línea normal, dado que sus características metabólicas y su patrón de expresión de receptores de estrógeno y factor de crecimiento son similares [107].



**Figura 9.** Efecto de GA-TPP<sup>+</sup> y PCA-TPP<sup>+</sup> sobre viabilidad de células MCF7 y MCF 10F.

\*:  $p < 0,05$  respecto a MCF7.

Un resultado similar puede observarse mediante los ensayos de capacidad formadora de colonias, en los que las células MCF 10F mostraron una

sensibilidad mucho menor frente al efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>, siendo capaces de formar colonias aún a concentraciones de 5 μM (Figura 8C).

Por lo tanto, es posible concluir que en el rango de concentraciones entre 0,5 y 5 μM ambos ácidos son relativamente selectivos frente a células cancerígenas. Dichas concentraciones se utilizarán en adelante en todos los experimentos que busquen comparar el efecto de los compuestos en células normales *versus* células de CM a mediano o largo plazo.

Los ensayos realizados con el fin de comparar el efecto citotóxico de las moléculas en células tumorales MCF7 y su contraparte normal MCF 10F, muestran también que si bien los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> poseen una selectividad en el rango de concentraciones de 0,5-5 μM, la molécula C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> no sería capaz de discriminar entre células normales de epitelio mamario y aquellas transformadas o tumorales (Figura 9C). Así, si bien la potencia citotóxica de la molécula sin ácido benzoico puede compararse a los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>, su mecanismo de acción implicaría una muerte no selectiva y generalizada, posiblemente de tipo necrótica y resultante en la liberación del contenido intracelular, evidenciando que su potencial farmacológico futuro sería más bien limitado.

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de citotoxicidad, en su conjunto, muestran que los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> poseen características interesantes en cuanto a su efectividad y selectividad como

agentes citotóxicos en células de cáncer mamario humano. Tales resultados están en línea con lo reportado por otros autores en torno al potencial de agentes con actividad mitocondrial unidos a cationes trifenilfosfonio como agentes con proyección farmacológica en el tratamiento del cáncer de mama [108-111]. Además es preciso mencionar que si bien el presente trabajo se realizó exclusivamente en líneas celulares de cáncer mamario, la definición de la mitocondria como blanco terapéutico se extiende a prácticamente todos los tipos de cáncer humano, por lo que la potencialidad farmacológica de las moléculas estudiadas no estaría limitado sólo al cáncer de mama, sino que podría aplicarse en otros canceres de relevancia, como el cáncer de pulmón, colon, estómago, entre otros [59, 112, 113].

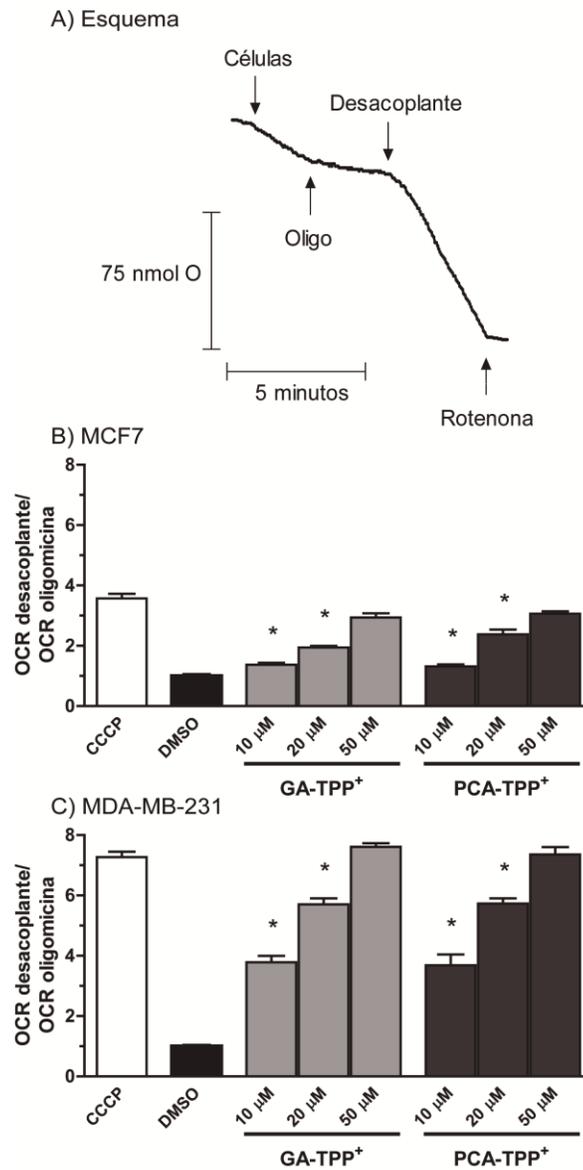
## **5.2.- Efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.**

Con el fin de estudiar el posible mecanismo mediante el cual los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> inducen la toxicidad celular, se comparó el efecto de ambos compuestos sobre una serie de parámetros metabólicos, tanto mitocondriales como celulares, utilizando las células MCF7 o BT-474 como modelo de células cancerígenas primarias, y las células MDA-MB-231 como un modelo de células cancerígenas de estadio avanzado. Como se mencionó anteriormente, el hecho de que sólo las células MDA-MB-231 y BT-474 aparecieran como más resistentes frente a la acción citotóxica de los ácidos, hace

presumir que no sería la presencia o ausencia de receptores de estrógeno o factores de crecimiento, o el estado de la proteína p53 lo que explicaría dicha resistencia. Parece ser, más bien, que ésta diferencia podría deberse a características como una mayor expresión de proteínas transportadoras o al metabolismo diferencial que presentan las células de cánceres en etapas más avanzadas de su desarrollo, tales como la mayor resistencia a estrés oxidativo o un metabolismo primordialmente glicolítico.

Así, el primer ensayo consistió en estudiar el efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre la respiración a través de la cadena transportadora de electrones. Dicha cadena es la responsable de convertir el poder reductor originado en la glicólisis y el ciclo de Krebs, en un gradiente de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranas, el cual luego es utilizado por la ATP-sintasa mitocondrial para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico [114]. En el proceso de generación del gradiente, intervienen principalmente tres complejos multiprotéicos llamados complejo I, III y IV. Como un conjunto, los tres complejos mencionados transfieren electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular, reduciendo este último a agua en la llamada respiración mitocondrial. Cualquier perturbación en dicho proceso lleva a una alteración en el gradiente de protones, también llamado potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ), lo cual, de no ser remediado, puede desencadenar una disminución en los niveles de ATP mitocondriales y celulares [114]. Para evaluar si los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> son capaces de alterar la respiración mitocondrial, se

midió el consumo de oxígeno por parte de células intactas en ausencia o presencia de cada uno de los compuestos, mediante el uso de un electrodo de Clark.



**Figura 10.** Efecto de GA-TPP<sup>+</sup> y PCA-TPP<sup>+</sup> sobre la respiración de células MCF7 y MDA-MB-231. \*: p < 0,05 respecto a CCCP.

Los resultados, graficados en la figura 10, muestran que ambos compuestos son capaces de incrementar de manera importante, y concentración-dependiente, la respiración mitocondrial inhibida por oligomicina (según esquema en Figura 10A). Dicho incremento en el consumo de oxígeno corresponde a un efecto característico de compuestos con capacidad desacoplante mitocondrial. Como se puede observar en esta figura, si bien ambos compuestos tuvieron un efecto cualitativamente similar en ambas líneas celulares estudiadas, es importante mencionar que el incremento en la respiración celular fue mucho más evidente en las células altamente glicolíticas MDA-MB-231 (Figura 10B) que en las células mixtas (glicolíticas y oxidativas) MCF7 (Figura 10A). Lo anterior, además de permitir afirmar que las células MDA-MB-231 poseen mitocondrias intactas y 100% funcionales (a diferencia de lo que podría esperarse de su metabolismo primordialmente glicolítico) permite postular al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa como un posible mecanismo subyacente a la capacidad citotóxica de los ácidos. Es preciso mencionar que los resultados obtenidos no parecen condecirse con la diferencia en la potencia citotóxica mostrada por los ácidos frente a ambos tipos celulares. En efecto, un mayor efecto desacoplante de los compuestos en las células MDA-MB-231 parece contradecir la menor sensibilidad de dichas células a la muerte inducida por los compuestos. Sin embargo cabe destacar que al no depender en una gran proporción del ATP mitocondrial, las células MDA-MB-231 podrían tener activados mecanismos

alternativos de síntesis de ATP (como la glutaminólisis o la glicólisis) y ser capaces de sobrevivir manteniendo un  $\Psi_m$  menor que las células MCF7 [101].

### **5.3.- Efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre la producción de ROS y los niveles de GSH/GSSG.**

Existen dos mecanismos principales a través de los cuales un compuesto puede aumentar el consumo de oxígeno mitocondrial. El primero consiste en la inducción de un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo cual disminuye los niveles de oxígeno molecular dentro de la mitocondria sin alterar de manera importante el  $\Psi_m$  ni la producción de ATP mitocondrial [115]. El segundo, por el contrario, induce un incremento del consumo como consecuencia de la disipación del gradiente de protones mediado por el reingreso de protones hacia la matriz mitocondrial por mecanismos distintos a la ATP sintasa. Este proceso se conoce como desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, e induce una disminución importante del  $\Psi_m$  y una caída en la producción de ATP [116].

Con el fin de comprobar el mecanismo mediante el cual los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> inducen un incremento en la respiración mitocondrial, se estudió su efecto sobre la producción de especies reactivas de oxígeno. Inicialmente, dado el tropismo mitocondrial de dichos compuestos, se estudió su capacidad para incrementar la producción de superóxido a nivel mitocondrial, dado que dicho anión es la principal ROS generada intra-mitocondrialmente, y parece ser la causante de las

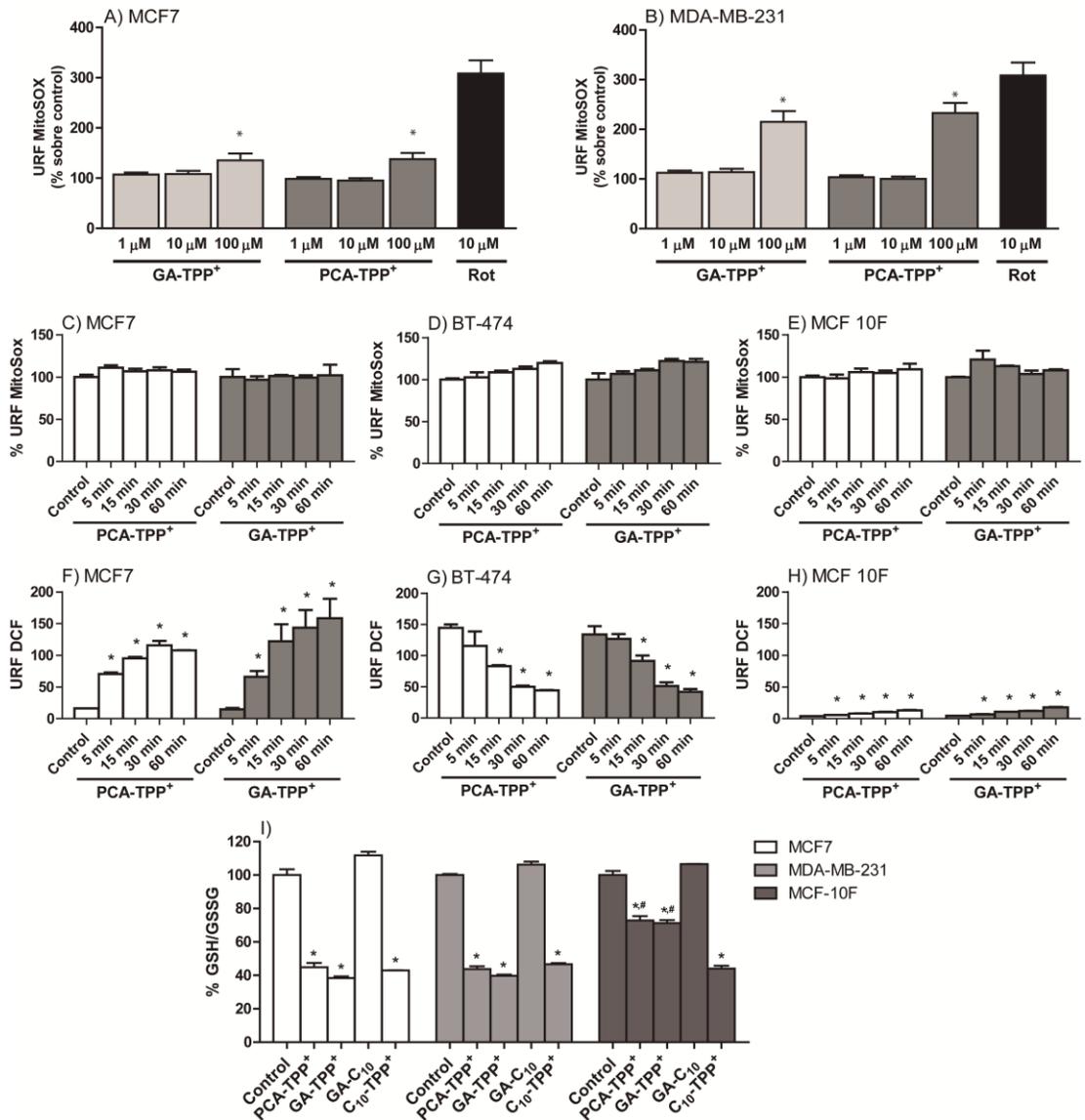
perturbaciones del organelo relacionadas con estrés oxidativo [115]. Como se muestra en las figuras 11A y 11B, la incubación de células MCF7 y MDA-MB-231 con los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> (1 y 10 μM) durante 2 horas, no resultó en ningún cambio en la producción de superóxido mitocondrial. Si bien la concentración de 100 μM de cada compuesto incrementó los niveles de superóxido en un 50% en células MCF7 y en un 100% en células MDA-MB-231, la ausencia de efecto a concentraciones que sí mostraron ser citotóxicas y capaces de inducir un incremento en el consumo de oxígeno llevan a inferir que el estrés oxidativo mitocondrial no estaría relacionado con el mecanismo de citotoxicidad de los ácidos, ni tampoco permitiría explicar su efecto sobre la respiración mitocondrial. De manera similar, la ausencia de efecto de ambos ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> (20 μM) sobre los niveles de superóxido mitocondrial en células MCF7 (Figura 11C), BT-474 (Figura 11D) y MCF 10F (Figura 11E) tras 60 minutos de incubación reafirma la idea de que los compuestos en estudio no inducen cambios en la producción de dicho anión.

Por otra parte, experimentos realizados utilizando la sonda DCFDA muestran que PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> (20 μM) son capaces de aumentar de manera importante el estrés oxidativo celular en células MCF7 (Figura 11F), incluso tras 5 minutos de incubación. Lo anterior parece indicar que, si bien el efecto de los ácidos a nivel mitocondrial no estaría relacionado con la producción de ROS, su efecto citotóxico sí podría involucrar un estrés oxidativo celular. De manera interesante, la incubación de células BT-474 con los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> indujo una

disminución en los niveles de estrés oxidativo celular (Figura 11G). Es preciso mencionar, sin embargo, que dichos niveles son casi 7 veces superiores que los observados en células MCF7. Por lo tanto, la disminución observada en los niveles de oxidación de DCFDA podría deberse a un efecto antioxidante de los compuestos (atrapamiento de ROS mediante sus grupos hidroxilo) al encontrarse en un ambiente altamente oxidativo. Cabe mencionar, además, que si bien la incubación de células MCF 10F con PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> indujo un aumento significativo de los niveles de ROS celulares (Figura 11H), el nivel máximo alcanzado tras 60 minutos de incubación fue menor que el nivel basal observado en células tumorales, por lo que dicho aumento podría ser fácilmente revertido por los mecanismos antioxidantes intracelulares.

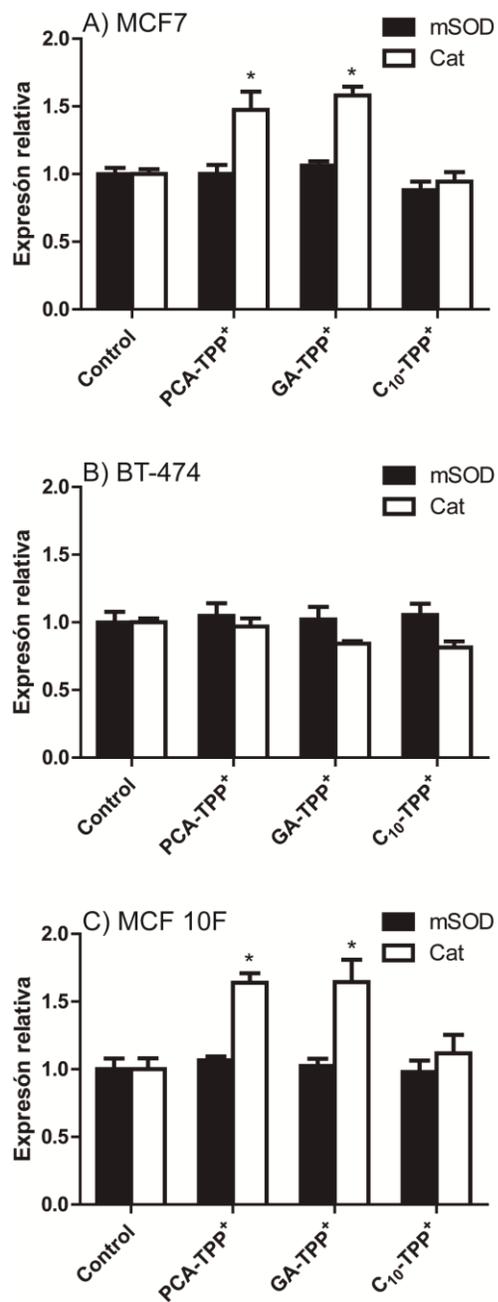
Otro parámetro que podría dar cuenta de un aumento en el estrés oxidativo celular es la razón glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG). Una disminución de dicha razón podría evidenciar un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno que supera la capacidad de respuesta de los mecanismos antioxidantes celulares llevando a una acumulación de GSSG [32]. En efecto, la figura 11I muestra que PCA-TPP<sup>+</sup>, GA-TPP<sup>+</sup> y C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> (5 μM) son capaces de disminuir de manera significativa la razón GSH/GSSG en células MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F tras 24 horas de incubación, mientras que el compuesto GA-C<sub>10</sub> no tuvo efecto alguno sobre dicha razón. Cabe destacar, sin embargo, que el efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>, a diferencia de aquel observado con C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup>, fue significativamente menor en las células normales

MCF 10F, lo que se condice con los resultados obtenidos en la figura 11H y con la menor sensibilidad de dichas células al efecto citotóxico de los compuestos en estudio.



**Figura 11.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sobre parámetros oxidativos mitocondriales y celulares. \*: p < 0,05 respecto a Control. #: p < 0,05 respecto a MCF7 y MDA-MB-231.

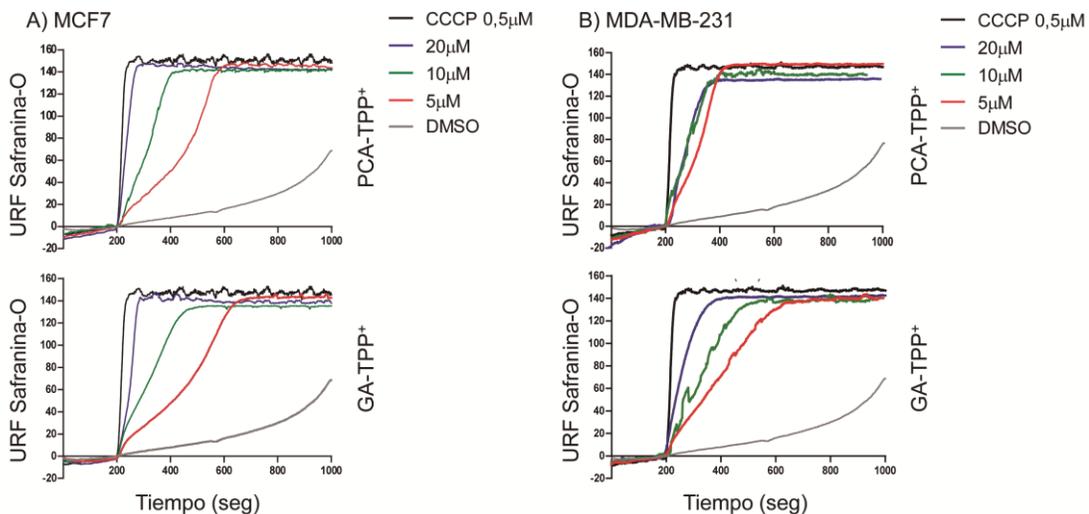
Consistente con los resultados obtenidos con las sondas MitoSOX y DCF-DA, experimentos dirigidos a determinar el efecto de los compuestos en estudio sobre la expresión de genes antioxidantes muestran que la incubación de células MCF7 (Figura 12A) y MCF 10F (Figura 12C) durante 24 horas con PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> (5 μM) resulta en un incremento significativo en la expresión del gen que codifica para la enzima catalasa (CAT) sin alterar la expresión del gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (mSOD). Por otra parte, ninguno de los dos genes mencionados fue alterado en su expresión tras la incubación de células BT-474 con los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> (Figura 12B). Sorprendentemente, el compuesto C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> (5 μM) no indujo cambios en la expresión de CAT y mSOD en ninguna línea celular, lo que nuevamente parece indicar que su mecanismo de acción impide el aumento en la síntesis de *mRNA*.



**Figura 12.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup>, GA-TPP<sup>+</sup> y C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> sobre los niveles de expresión de enzimas antioxidantes en células MCF7, BT-474 y MCF 10F. \*: p < 0,05 respecto a Control.

#### **5.4.- Efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre el potencial de transmembrana mitocondrial.**

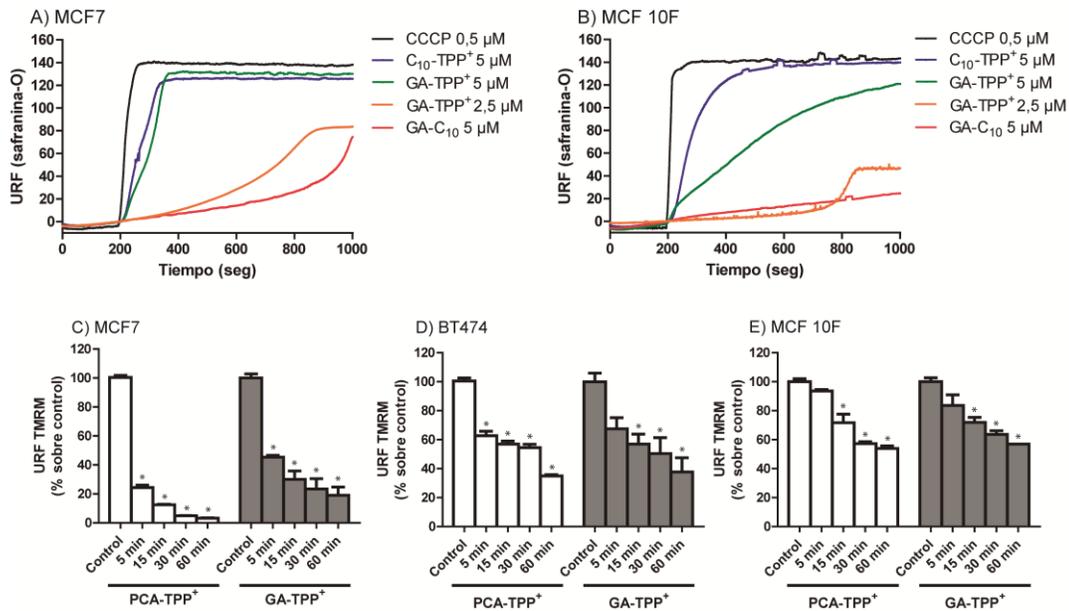
Dado que un incremento en la producción de superóxido mitocondrial no parece ser el efecto gatillante del incremento en el consumo de oxígeno inducido por los compuestos, se estudió el efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sobre el potencial de transmembrana mitocondrial mediante el uso de la sonda fluorescente safranina-O, la cual es captada por mitocondrias altamente energizadas (con alto  $\Psi_m$ ), disminuyendo su intensidad de fluorescencia al formar una empalizada al interior de la mitocondria. Al ser desacopladas las mitocondrias, la safranina-O es expulsada del interior del organelo, aumentando su intensidad de fluorescencia debido a un cambio conformacional al salir de la empalizada intramitocondrial [87, 88]. Los resultados muestran que ambos ácidos son capaces de inducir una despolarización mitocondrial, tanto en células MCF7 como en células MDA-MB-231 (Figura 13). Es preciso notar, sin embargo, que el efecto observado en las primeras células parece ser mucho más abrupto, lo cual indicaría una mayor propensión de dichas células a la pérdida de potencial mitocondrial. Lo anterior podría significar que las células MDA-MB-231 son más resistentes frente al efecto desacoplante de los ácidos, lo que consistiría una primera evidencia que permitiría explicar la menor sensibilidad de dichas células frente al efecto citotóxico de los compuestos.



**Figura 13.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sobre el potencial de transmembrana mitocondrial en células MCF7 y MDA-MB-231.

Utilizando la misma técnica, se estudió el efecto de los compuestos C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> (5 µM), GA-TPP<sup>+</sup> (2,5 y 5 µM) y GA-C<sub>10</sub> (5 µM) sobre el  $\Psi_m$  en células MCF7 (Figura 14A) y MCF 10F (Figura 14B). Los resultados muestran que si bien el compuesto C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> es capaz de inducir una despolarización similar de la membrana mitocondrial en ambas líneas celulares, el efecto de GA-TPP<sup>+</sup> parece ser mucho menor en las células normales MCF 10F. En efecto, si bien a una concentración de 2,5 µM de GA-TPP<sup>+</sup> no parece haber un efecto distinto entre ambas líneas celulares (dado que la despolarización no llega a ser total en el rango de tiempo utilizado), podemos observar que una concentración de 5 µM es capaz de inducir una rápida y completa despolarización mitocondrial en células MCF7, mientras que dicho efecto parece ser mucho más lento en células MCF 10F (en las que el efecto no llega a ser total tras 800 segundos de medición). Lo anterior está en

concordancia con la observación previa de que los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> muestran una selectividad hacia células tumorales, y permite implicar a la despolarización mitocondrial como un evento importante en la citotoxicidad inducida por los compuestos en estudio. Aún más, la observación de que el compuesto GA-C<sub>10</sub> no indujo una caída importante del  $\Psi_m$  nos permite afirmar que la presencia del catión lipofílico deslocalizado es importante tanto para el efecto citotóxico como para la inducción de la despolarización mitocondrial.



**Figura 14.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sobre el potencial de transmembrana mitocondrial en células MCF7, BT-474 y MCF 10F. \*: p < 0,05 respecto al control.

De manera similar, experimentos realizados utilizando la sonda TMRM muestran que si bien PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> inducen una caída rápida y significativa del  $\Psi_m$  en células MCF7 (Figura 14C), dicho efecto parece ser mucho menor en células normales MCF 10F (Figura 14E), reafirmando la noción de que el efecto de los

ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sería selectivo hacia células tumorales. Además, el hecho de que las células BT-474, cuya sensibilidad frente al efecto citotóxico de los compuestos fue menor, muestren una menor sensibilidad frente a la despolarización mitocondrial inducida por PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup>, apoya el concepto de que ambos eventos estarían relacionados causalmente.

#### **5.5.- Efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre el nivel de ATP celular y la activación de sensores metabólicos.**

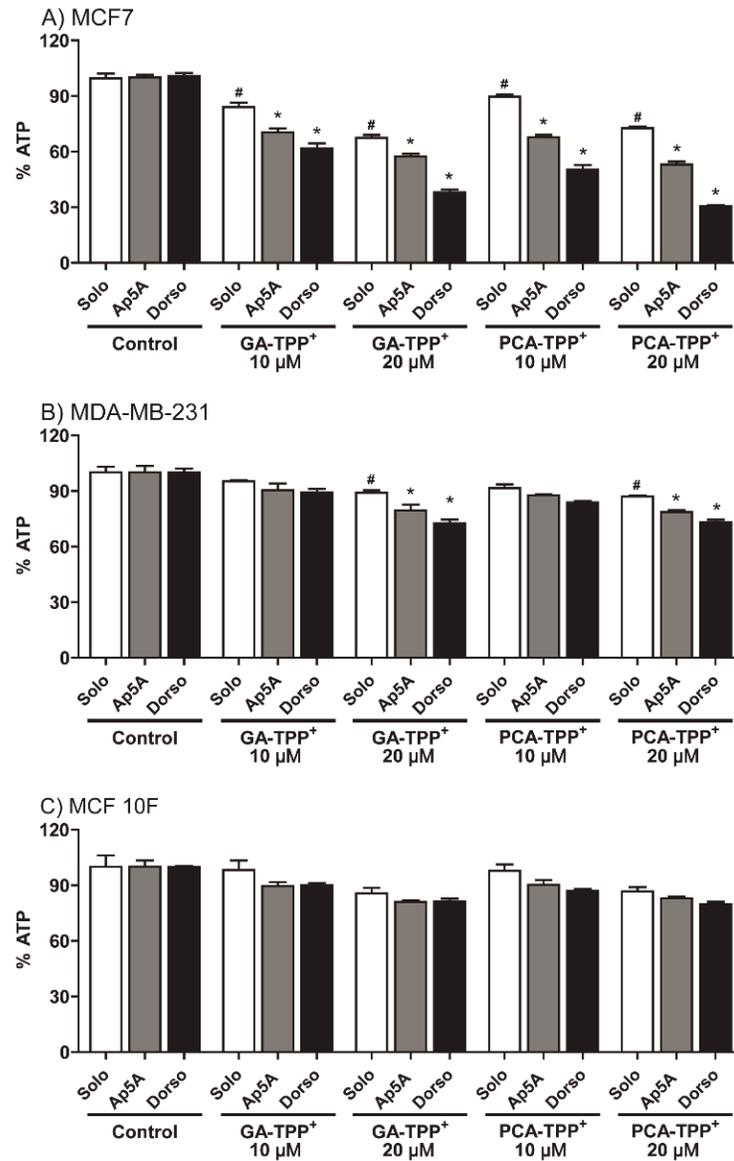
Como se mencionó anteriormente, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (capaz de gatillar una disminución en el  $\Psi_m$ ) puede resultar en una disminución de los niveles de síntesis de ATP mitocondrial [114, 117]. Experimentos dirigidos a comprobar si el efecto desacoplante de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> redundaba en una alteración a nivel del ATP celular, muestran que ambos ácidos (10 y 20  $\mu$ M) son capaces de disminuir de manera significativa los niveles de ATP intracelular en células MCF7, tras cuatro horas de incubación (Figura 15A; barras blancas). La adición de cualquiera de los dos ácidos a células MDA-MB-231 por el contrario, parece afectar sólo de manera marginal los niveles del metabolito, siendo la disminución significativa solamente a una concentración de 20  $\mu$ M (Figura 15B; barras blancas). Cabe destacar que la adición de cualquiera de los dos ácidos a células de epitelio mamario normal MCF 10F no fue capaz de inducir una disminución significativa de los niveles de ATP incluso a una concentración de 20  $\mu$ M (Figura 15C; barras blancas). Si bien la

diferencia anteriormente mencionada parece concordar con la menor sensibilidad de las células MCF 10F frente a la acción de los compuestos, es difícil justificar el hecho de que las células MDA-MB-231, aun siendo menos sensibles, sí sufren una muerte celular apreciable al ser tratadas con los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sin evidenciar una caída importante de sus niveles de ATP.

Si bien las células tumorales altamente glicolíticas, tales como las MDA-MB-231 obtienen su energía principalmente a través de la glicólisis, el primer paso de dicho proceso citosólico continúa siendo dependiente de la generación de ATP mitocondrial. Lo anterior está dado por el hecho de que la hexokinasa-2, la isoforma de la hexoquinasa que permite la exacerbación de la glicólisis en presencia de oxígeno (fenómeno conocido como efecto “Warburg”) [20, 21], está anclada a la membrana mitocondrial, mediante su interacción con la proteína VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), la cual le proporciona acceso preferencial al ATP generado en la fosforilación oxidativa, además de evitar la inhibición por producto que normalmente sufre la forma libre de la hexoquinasa [21-23]. Por lo tanto, si bien las células glicolíticas pueden ser menos sensibles que las células normales a moléculas que disminuyan la producción de ATP mitocondrial, ésta resistencia requiere otros mecanismos distintos a la fosforilación oxidativa para poder mantener la viabilidad de dichas células. La activación de dichos mecanismos compensatorios depende principalmente de la acción de sensores metabólicos, los cuales ante un estímulo inicial de disminución de los niveles de ATP, son capaces de inducir vías metabólicas de

generación de ATP (tales como la glicólisis, la beta-oxidación de ácidos grasos y el ingreso de glucosa) al tiempo que inhiben vías de alto consumo energético (como la síntesis de macromoléculas) [118]. Uno de los principales sensores metabólicos intracelulares es la enzima quinasa dependiente de AMP (AMPK), la cual es activada ante incrementos bruscos de AMP o calcio intracelular. Con el fin de comprobar si la actividad de la AMPK está relacionada con la falta de efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre los niveles de ATP celular, se utilizó un inhibidor específico de dicha enzima (Dorsomorfina). Los resultados muestran que la co-incubación de células MCF7 con PCA-TPP<sup>+</sup> o GA-TPP<sup>+</sup> y dorsomorfina (1 μM) disminuye de manera significativa los niveles de ATP respecto a células incubadas en ausencia de dorsomorfina (Figura 15A; barras negras). Un efecto similar, aunque menor en magnitud se observó en células MDA-MB-231 (Figura 15B; barras negras), en las que la disminución de los niveles de ATP sólo fue significativa a la concentración más alta de ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>. Si bien los resultados discutidos anteriormente parecen indicar que la actividad de la enzima AMPK es importante en el mantenimiento de los niveles de ATP tras el desacoplamiento mitocondrial inducido por PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup>, el hecho de que la activación de AMPK dependa de incrementos tanto de AMP como de calcio intracelular no permite afirmar que el efecto resultante del desacoplamiento sea una menor síntesis de ATP mitocondrial, puesto que dicho desacoplamiento también es capaz de disminuir la capacidad tamponante de calcio de la

mitocondria, induciendo una mayor concentración de calcio extra-mitocondrial [33, 34].



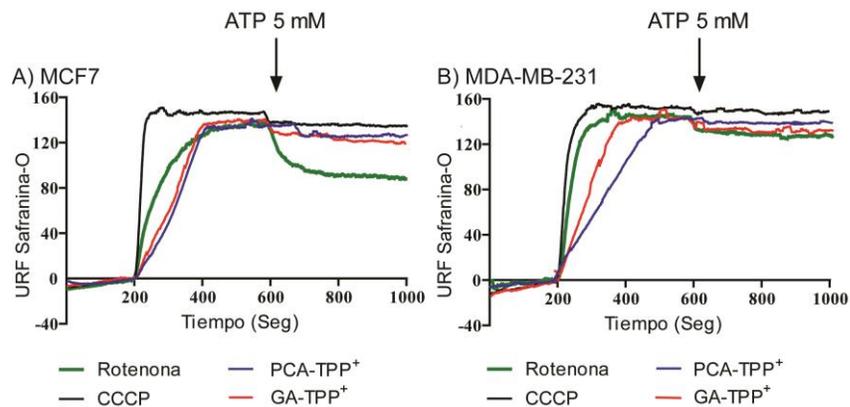
**Figura 15.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sobre los niveles de ATP en células MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F, en ausencia y presencia de los inhibidores Dorsomorfin (1 μM) y Ap5A (5 μM). #: p < 0,05 respecto al control. \*: p < 0,05 respecto al mismo compuesto en ausencia de inhibidores.

Con el fin de determinar si efectivamente los compuestos tienen un efecto sobre los niveles de ATP, se utilizó un inhibidor de otro sensor metabólico, la enzima intramitocondrial adenilato quinasa. Esta última enzima es capaz de detectar incrementos en los niveles de ADP, y mediante su mecanismo catalítico sintetizar ATP y AMP a partir de dos moléculas de ADP [119]. Por lo tanto, la activación de la adenilato quinasa permite mantener los niveles de ATP celular a costa de generar AMP, lo que a su vez es capaz de inducir la activación de la AMPK rio-abajo [118]. En efecto, resultados obtenidos adicionando el inhibidor de adenilato quinasa, P<sup>1</sup>,P<sup>5</sup>-di(adenosina-5')pentafofato, (Ap5A; 5 μM) a células MCF7 muestran que dicho compuesto es capaz de disminuir de manera significativa los niveles de ATP al ser adicionado junto con cualquiera de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> (Figura 15A; barras grises). Si bien dicha disminución no fue tan evidente como en el caso de la adición de dorsomorfina, cabe destacar que debido al tamaño y carga del Ap5A, se requiere la adición de digitonina (0,625 μg/ml) como un permeabilizante leve, lo que limita el tiempo máximo de incubación con el inhibidor (1 hora versus 4 horas con dorsomorfina). Un resultado similar se observó en células MDA-MB-231, en las que Ap5A indujo una disminución significativa de los niveles de ATP al ser co-adicionada con PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> a una concentración de 20 μM (Figura 15B; barras grises) aunque nuevamente dicha disminución fue significativamente menor que la observada en células MCF7. Cabe destacar que ninguno de los inhibidores tuvo un efecto significativo en los niveles de ATP de células MCF 10F, lo que permite inferir que la

producción de ATP de dichas células no se ve afectada de manera importante por la acción desacoplante de los compuestos en estudio.

Si bien los estudios con los inhibidores de la AMPK y la adenilato quinasa muestran dos posibles vías de mantenimiento de los niveles de ATP ante la disminución de su síntesis mitocondrial putativamente inducida por los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> en las células altamente glicolíticas MDA-MB-231, también es posible que dichas células posean otros mecanismos para mantener su tasa metabólica aún en ausencia de ATP mitocondrial. En efecto, ha sido reportado que algunos tipos celulares de cánceres de estadíos avanzados sobreexpresan una proteína llamada IF1 (inhibidor de la ATP sintasa), lo que las hace independientes del metabolismo mitocondrial. Este inhibidor disminuye de manera importante los niveles de ATP producidos a partir de la fosforilación oxidativa, generando un cambio metabólico hacia otras fuentes como la glicólisis o la glutaminólisis [120-122]. A su vez, la inhibición de la ATP sintasa previene también el efecto re-polarizante de la actividad ATPásica del complejo V en presencia de altos niveles de ATP. Con el fin de estudiar si las células MDA-MB-231 muestran una alta actividad de IF1, se estudió la capacidad de células MCF7 y MDA-MB-231 para restaurar el potencial de membrana mitocondrial, perdido tras la adición de rotenona o los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> a dichas células. Como se puede observar en la figura 16, tras una despolarización inducida por rotenona (inhibidor del complejo I que disminuye la actividad de la CTE y por ende la generación de  $\Psi_m$ ) la adición de ATP (5 mM) a células MCF7 fue capaz de

generar una re-polarización mitocondrial (Figura 16A). Este efecto del ATP sobre el gradiente de protones esta mediado por el funcionamiento reverso del complejo V, el cual permite el ingreso de protones desde el espacio intermembranas hacia la matriz mitocondrial a través de la región  $F_0$  de la ATP sintasa, a expensas de la hidrólisis de ATP extra-mitocondrial.

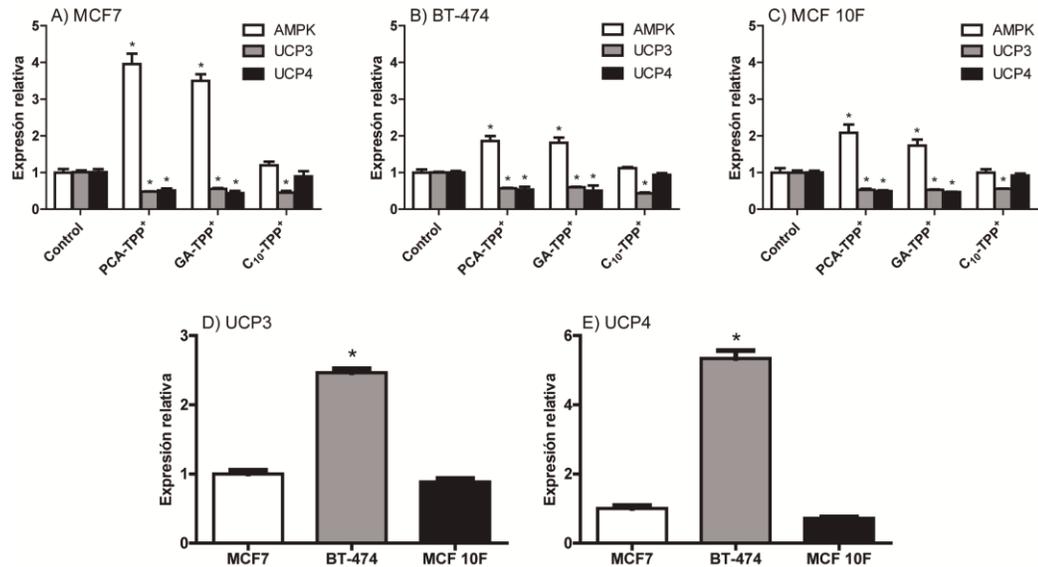


**Figura 16.** Efecto re-polarizante mitocondrial de ATP en células MCF7 y MDA-MB-231.

La ausencia de dicho efecto re-polarizante en células MDA-MB-231 (Figura 16B) permite inferir que dichas células tienen inhibida la actividad ATPásica del complejo V, posiblemente debido a una alta expresión de IF1. Por otra parte, la ausencia de efecto re-polarizante del ATP tras la adición de los ácidos unidos a  $TPP^+$  en ambas líneas celulares indica que dicha pérdida de  $\Psi_m$  estaría relacionada con un aumento de permeabilidad de la membrana mitocondrial y no con una disminución de la actividad de la CTE.

Evidencia adicional de la activación de AMPK tras la incubación de células de cáncer mamario humano con los ácidos unidos a  $TPP^+$  se obtuvo al cuantificar

los niveles de expresión de la enzima en células incubadas durante 24 horas con cada uno de los compuestos en estudio (Figura 17).



**Figura 17.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup>, GA-TPP<sup>+</sup> y C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> sobre la expresión de AMPK y UCPs en células MCF7, BT-474 y MCF 10F. A), B) y C) \*: p < 0,05 respecto al control. D) y E) \*: p < 0,05 respecto a MCF7.

Como se puede observar, PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> indujeron un aumento significativo en la expresión de AMPK en células MCF7 (Figura 17A; barras blancas). De manera similar, la incubación de células BT-474 y MCF 10F con los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> indujo un aumento en los niveles de expresión de AMPK, aunque dicho aumento fue de menor magnitud que el observado en células MCF7 (Figuras 17B y 17C; barras blancas). Una vez más, se comprobó que la incubación de los tres tipos celulares con el compuesto C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> no indujo cambios en la expresión de la *mRNA*.

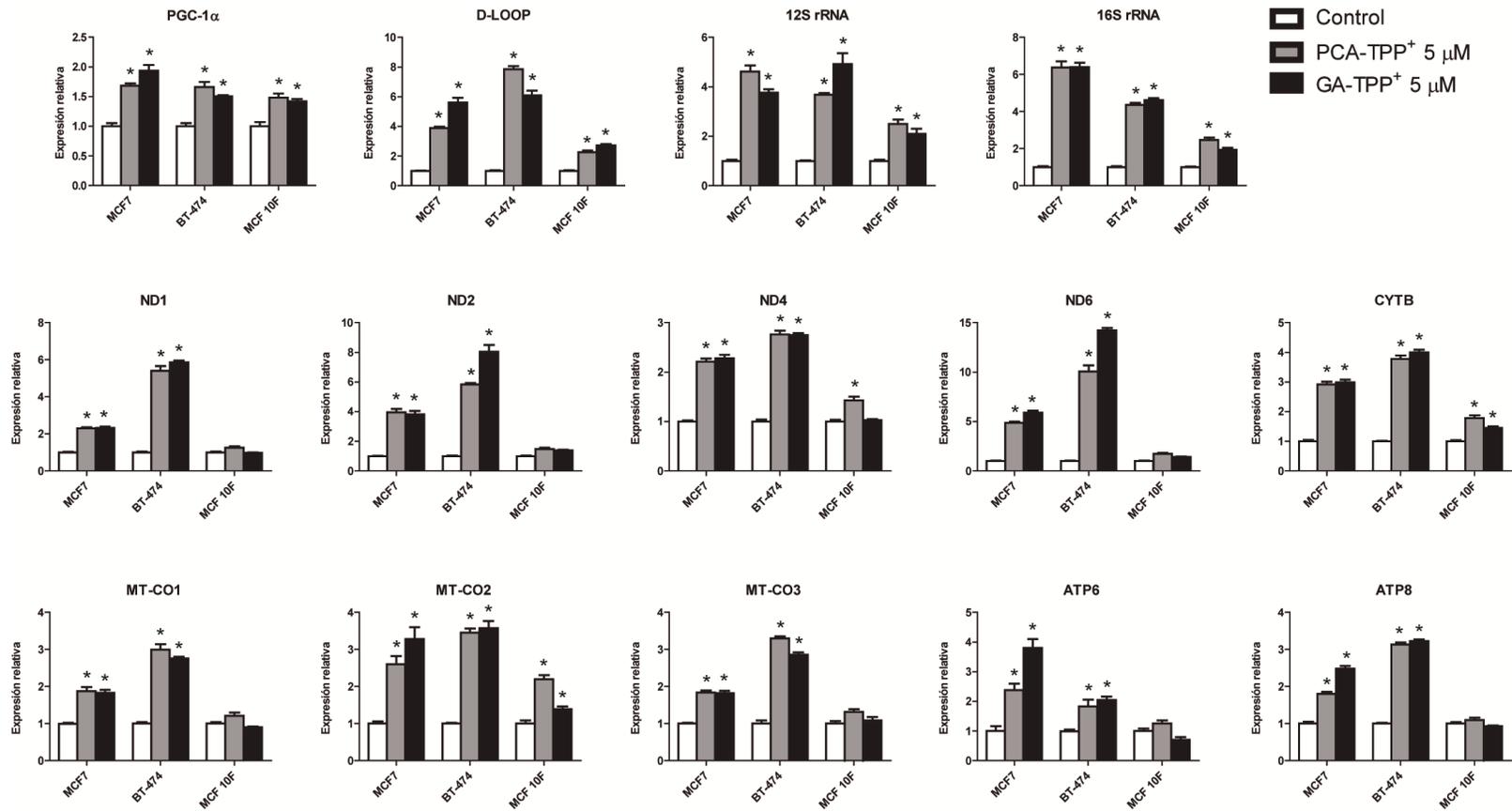
Si bien el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa se considera, por lo general, un evento nocivo para el metabolismo celular, existen proteínas específicas cuya función consiste precisamente en inducir un desacoplamiento mitocondrial [123]. La actividad de estas proteínas (conocidas como proteínas desacoplantes; UCPs) permite que las células regulen de manera precisa el  $\Psi_m$ , además de constituir un mecanismo de generación de calor mediado por la actividad ATPásica del complejo V, activada ante disminuciones de  $\Psi_m$  en condiciones de exceso de ATP [124, 125]. De manera interesante, se demostró que los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> (5  $\mu$ M) fueron capaces de inducir una disminución significativa en los niveles de las proteínas desacoplantes (UCP3 y UCP4) en células MCF7, BT-474 y MCF 10F tras 24 horas, lo que es consistente con su mecanismo propuesto de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Figuras 17A, 17B y 17C; barras grises y negras). Así mismo, se demostró que las células BT-474 poseen una expresión basal de UCPs mucho mayor que células MCF7 (Figuras 17D y 17E), lo que podría ayudar también a explicar su mayor resistencia frente al efecto citotóxico de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>, puesto que implicaría que las células BT-474 utilizan mecanismos de desacoplamiento de manera fisiológica y por tanto dependen en menor medida del mantenimiento de un  $\Psi_m$  alto para su funcionamiento [123].

## **5.6.- Efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre la activación de marcadores de la biogénesis mitocondrial.**

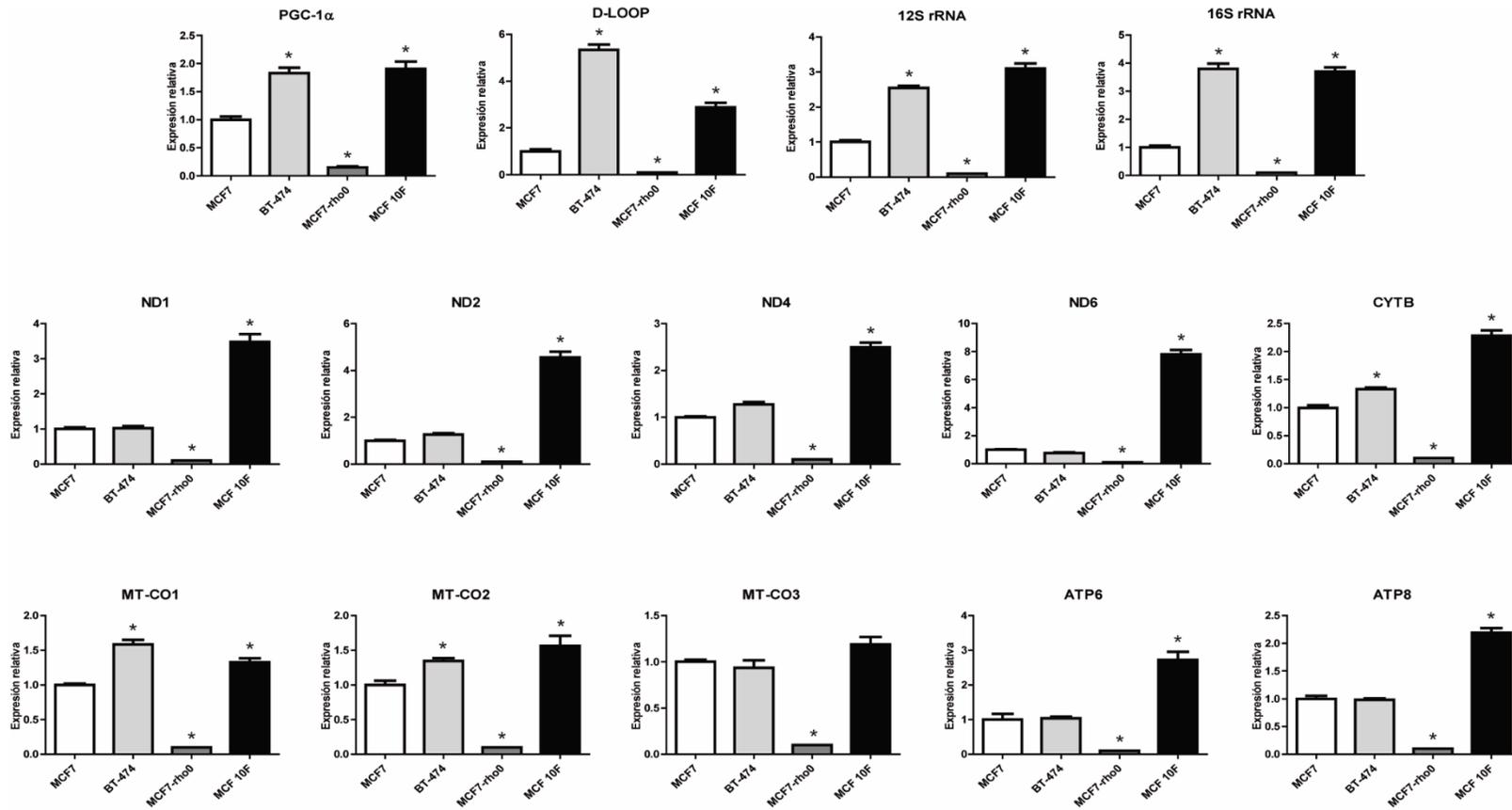
Además de la activación de sensores metabólicos, otro mecanismo a largo plazo para sobrellevar la acción citotóxica de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> podría implicar un aumento en la biogénesis mitocondrial, como un medio de aumentar la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa [59]. Uno de los principales activadores de la síntesis de nuevas unidades mitocondriales es la proteína PGC-1 $\alpha$  ("*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$* "), la cual regula tanto la biogénesis como la función mitocondrial a través de su actividad co-reguladora de la transcripción [126]. Resultados obtenidos tras la incubación de células MCF7 y BT-474 con PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> (5  $\mu$ M) durante 24 horas muestran que ambos compuestos son capaces de incrementar la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Figura 18), así como la cantidad de DNA mitocondrial (evidenciado a través de la amplificación de la región D-LOOP) y los niveles de todos los transcritos mitocondriales (las subunidades ribosomales 12S rRNA y 16S rRNA, del complejo I ND1, ND2, ND4y ND6, la del complejo III CYTB, del complejo IV MT-CO1, MT-CO2 y MT-CO3, y del complejo V ATP6 y ATP8).

Es interesante notar que si bien en células MCF 10F se observó un incremento similar en la actividad de PGC-1 $\alpha$  y de la cantidad de mitocondrias (D-LOOP y subunidades ribosomales) tras su incubación con los compuestos en estudio, los niveles de las subunidades de los complejos de la CTE no se vieron alterados.

Esto reafirma que, si bien los compuestos podrían tener un efecto a nivel mitocondrial en células normales, dicho efecto sería mucho más leve que el observado en células tumorales, y no implicaría un desequilibrio metabólico importante. Cabe destacar, además, que las células MCF 10F mostraron un nivel de expresión basal de los transcritos mitocondriales pertenecientes a la CTE mucho mayor que el de las células MCF7 y BT-474, a pesar de presentar niveles similares de expresión de PGC-1 $\alpha$  y de los marcadores de número de mitocondrias que éstas últimas (Figura 19). Lo anterior concuerda con lo sugerido en el efecto Warburg, y con una disminuida función mitocondrial en células tumorales [20, 21]. Sin embargo, el aumento de la expresión de los transcritos mitocondriales ante la incubación de células de cáncer mamario humano con PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> también implica que la funcionalidad mitocondrial está intacta y aun fuertemente regulada por los diversos mecanismos de control metabólico celular. Es importante notar además que si bien las células BT-474 parecen tener un mayor número de mitocondrias que las células MCF7, la expresión de las subunidades de la CTE es similar en ambas líneas celulares, lo que implica una regulación metabólica similar y podría sugerir que las células BT-474 presentan un grado de transformación ligeramente menor que las células MCF7 [68]. A modo de control, además, podemos observar que la expresión de transcritos mitocondriales en células MCF7-rho0 es nula, corroborando que su depleción de DNA mitocondrial es completa y por lo tanto su fenotipo metabólico es muy distinto al de las células parentales no modificadas.



**Figura 18.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sobre la expresión de PGC-1 $\alpha$  y los transcritos mitocondriales en células MCF7, BT-474 y MCF 10F. \*: p < 0,05 respecto al control.

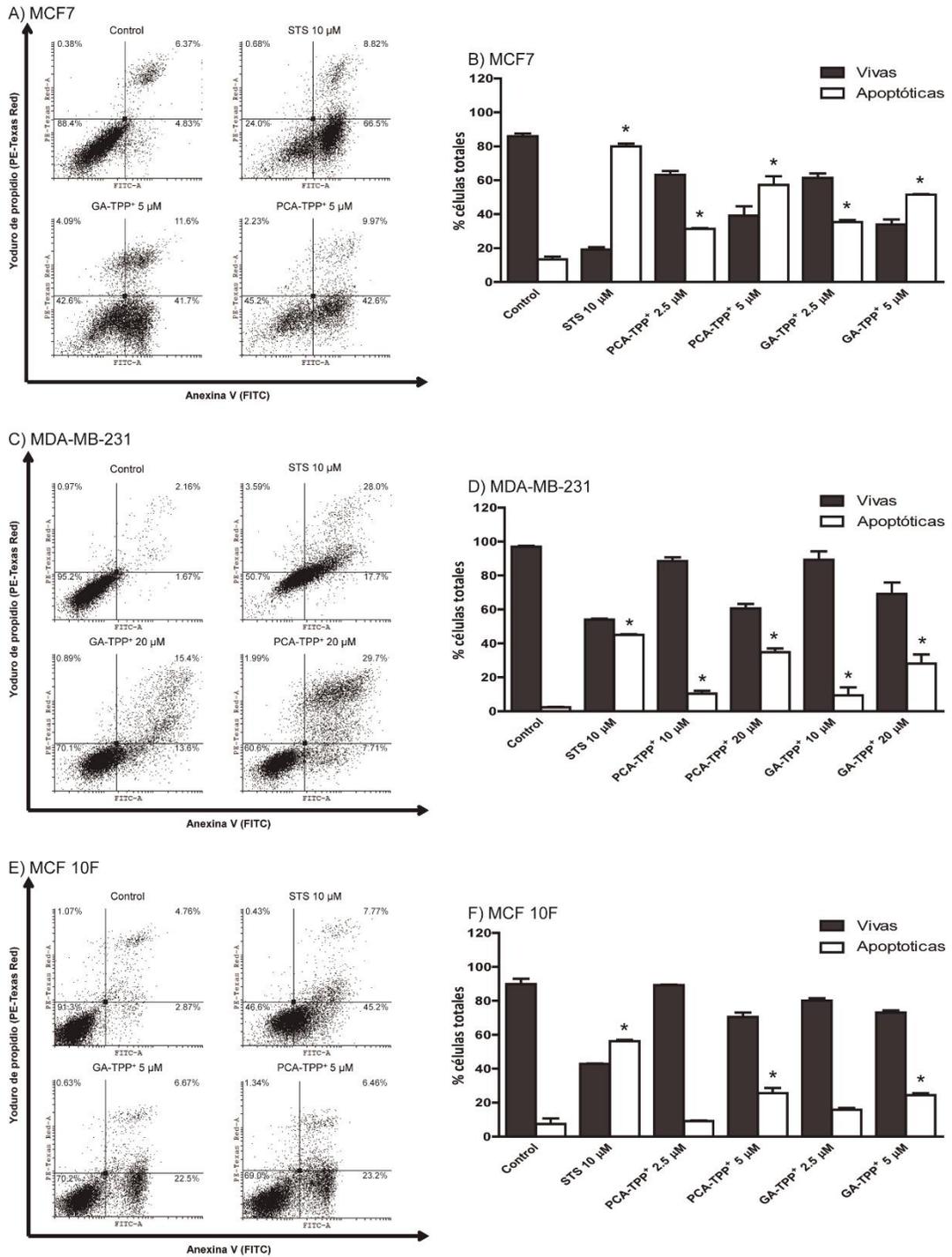


**Figura 19.** Expresión basal de PGC-1α y los transcritos mitocondriales en células MCF7, BT-474, MCF7-rho0 y MCF 10F.

\*:  $p < 0,05$  respecto a MCF7.

### **5.7.- Mecanismo de inducción de muerte celular por parte de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>.**

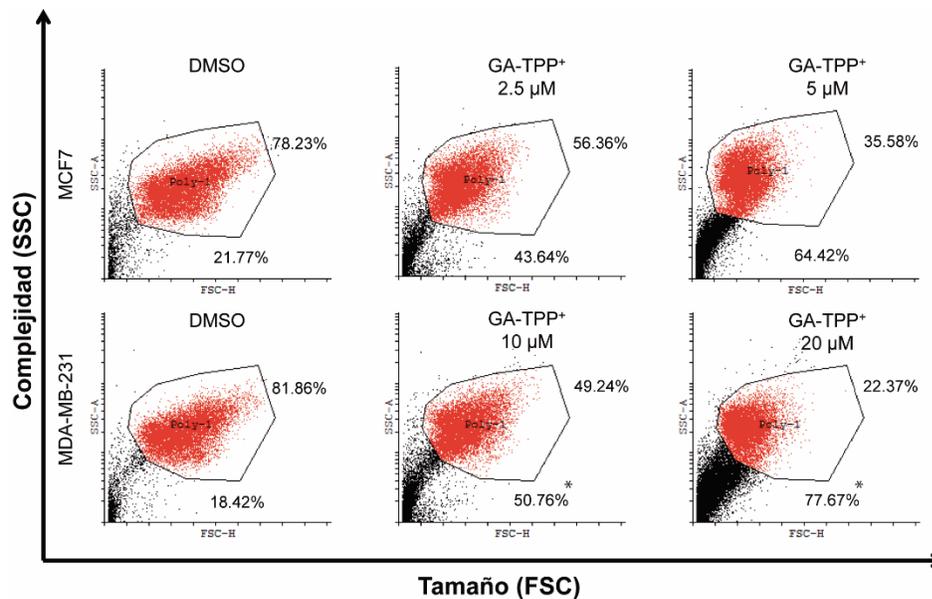
Como se mencionó anteriormente, tanto la pérdida de  $\Psi_m$  como una caída moderada en los niveles de ATP celular, de mantenerse en el largo plazo, pueden desencadenar una muerte celular de tipo apoptótica gatillada por la salida de factores pro-apoptóticos mitocondriales (como el citocromo c y la proteína Smac/DIABLO) hacia el citosol [127, 128]. Por el contrario, una pérdida considerable y rápida de ATP, junto con un incremento descontrolado de la producción de ROS, puede llevar a las células a una muerte de tipo necrótica incluso en tiempos cortos [127, 129]. Con el fin de comprobar el mecanismo de muerte inducido por los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup>, se utilizó la doble tinción con anexina V/yoduro de propidio (AV/PI), la cual permite discriminar entre los dos tipos de muerte celular antes mencionados. Los resultados de dicho experimento se grafican en la figura 20, en la cual se observa que ambos ácidos inducen un aumento en el marcaje por anexina V (AV; marcador de muerte de tipo apoptótica) en las células MCF7 (Figuras 20A y 20B) y MDA-MB-231 (Figuras 20C y 20D) tras 48 horas de incubación, si bien la primera línea celular se muestra considerablemente más sensible al efecto de los compuestos en estudio, frente a concentraciones en órdenes de 1 y 2 veces el IC<sub>50</sub> mostrado en la Tabla I.



**Figura 20.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sobre marcadores de muerte celular en células MCF7, MDA-MB-231 y MCF 10F. A), C) y E) Dot-plots obtenidos para cada línea celular. B), D) y F) cuantificación de células vivas y apoptóticas. \*:  $p < 0,05$  respecto al control.

Por otra parte, en las células MCF 10F prácticamente no se observa muerte celular, siendo ésta sólo significativamente mayor al control a la concentración más alta utilizada (5  $\mu$ M), lo que una vez más indica que el efecto citotóxico de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sería selectivo hacia células tumorales (Figuras 20E y 20F). Es preciso mencionar que la incorporación de yoduro de propidio (PI; marcador de muerte de tipo necrótica) en ningún caso superó el 5% del total.

Si bien el menor efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre la tinción celular con AV en células MDA-MB-231 concuerda con la menor sensibilidad de dichas células a la acción citotóxica de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> observada en los experimentos de viabilidad celular (Figuras 2 y 3), llama la atención el hecho de que a concentraciones 2 veces superiores al IC<sub>50</sub> obtenido en dichos experimentos sólo se evidencie alrededor de un 40% de muerte celular mediante el doble marcaje con AV/PI (Figura 20B). No obstante, un análisis más detallado de los datos obtenidos mediante citometría de flujo muestra que las células MDA-MB-231 tratadas con GA-TPP<sup>+</sup> muestran un tamaño mucho menor que las células MCF7 en las mismas condiciones (Figura 21). Dadas las condiciones experimentales, las células muy pequeñas no son cuantificadas, dado que se supone que pueden representar *debris* celular. Por lo tanto, es posible que la diferencia en el porcentaje de muerte celular inducido por los compuestos en las células MCF7 y MDA-MB-231 pueda ser explicada, al menos en parte, por el hecho de que un mayor porcentaje de células MDA-MB-231 apoptóticas no es analizado por la metodología utilizada.

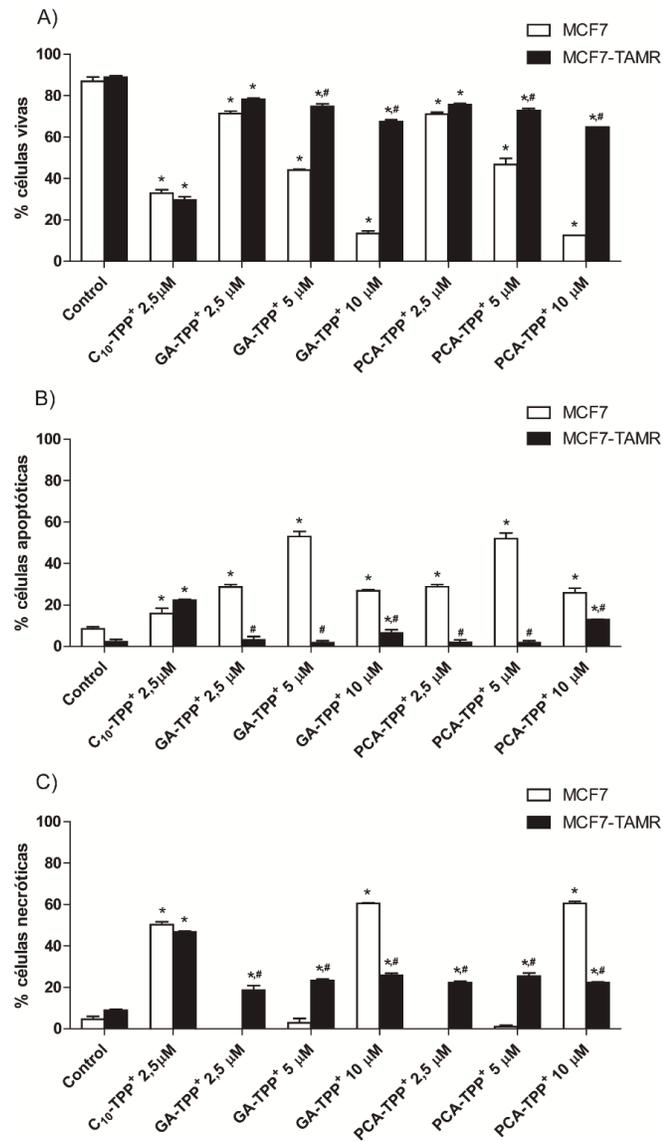


**Figura 21.** Efecto de GA-TPP<sup>+</sup> sobre el tamaño y complejidad de células MCF7 y MDA-MB-231.

\*:  $p < 0,05$  respecto a MCF7.

Adicionalmente, se comparó el efecto apoptótico de PCA-TPP<sup>+</sup>, GA-TPP<sup>+</sup> y C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> en células MCF7 y MCF7-TAMR mediante el doble marcaje AV/PI. Los resultados muestran que estas últimas, de manera similar a lo observado en los ensayos de viabilidad celular, son más resistentes al efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> tras 48 horas de incubación, mostrando solamente un 30% de muerte celular a una concentración de 10 μM de cada ácido, frente a un 80% en las células MCF7 parentales (Figura 22A). Es interesante notar, sin embargo, que la gran mayoría de la muerte celular observada en células MCF7-TAMR correspondió a muerte de tipo necrótica, lo que podría indicar que, si bien poseen mecanismos que les permiten resistir de mejor manera frente a efectos citotóxicos mitocondriales, su mecanismo de muerte probablemente incluiría

incrementos no controlados de ROS y disminuciones drásticas de ATP (Figura 22C). Cabe destacar además que si bien la muerte celular inducida por los compuestos en células MCF7 a concentraciones de 2,5 y 5  $\mu\text{M}$  fue principalmente apoptótica (Figura 22B), un incremento de concentración a 10  $\mu\text{M}$  de PCA-TPP<sup>+</sup> o GA-TPP<sup>+</sup> indujo una muerte de tipo primordialmente necrótica (Figura 22C).



**Figura 22.** Efecto de PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> sobre marcadores de muerte celular en células MCF7 y MCF7-TAMR. \*: p < 0,05 respecto al control. #: p < 0,05 respecto a MCF7.

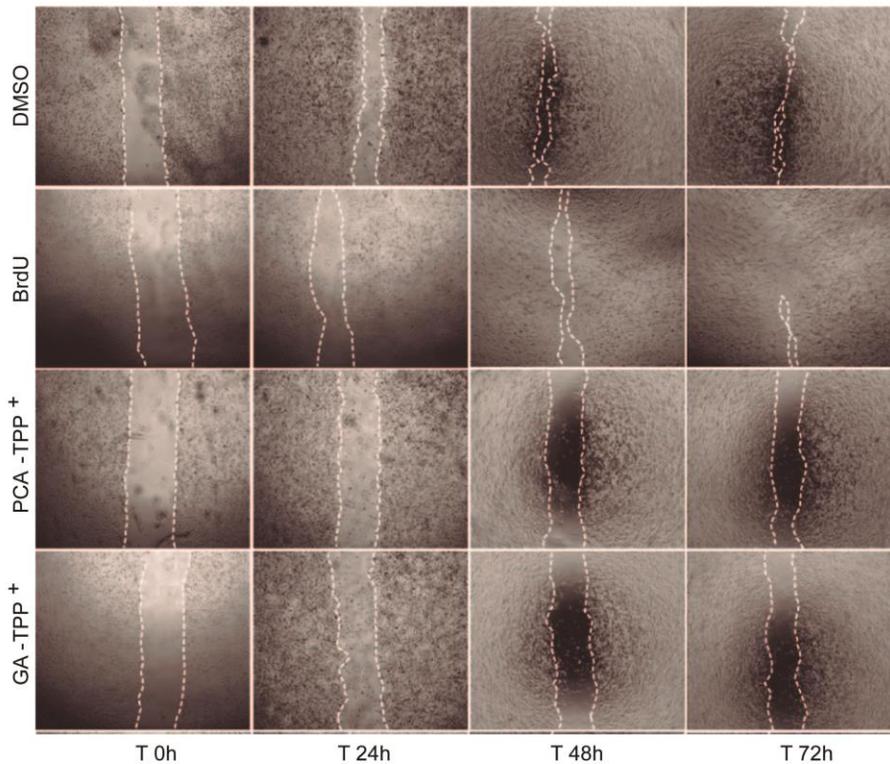
Dado que un efecto similar se observa al incubar células MCF7 o MDA-MB-231 con el compuesto C<sub>10</sub>-TPP<sup>+</sup> (Figura 22C), podríamos inferir que a concentraciones muy altas (aproximadamente 4 veces el IC<sub>50</sub>), los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> presentan un mecanismo citotóxico que no depende en mayor medida del grupo polihidroxibenzoico sino más bien de su motivo catiónico TPP<sup>+</sup>.

#### **5.8.- Efecto de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> sobre la migración celular.**

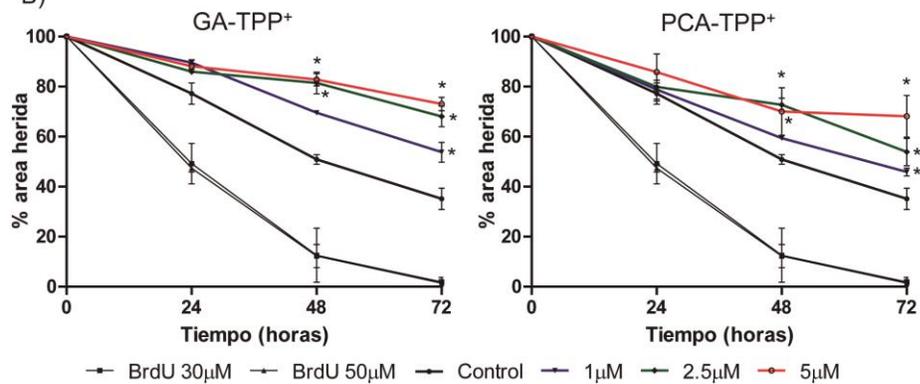
La progresión de los tumores malignos requiere la habilidad de las células cancerígenas para realizar metástasis, proceso que depende principalmente de la capacidad migratoria e invasiva de dichas células [130]. Si bien la capacidad invasiva también está relacionada con los niveles de ATP, es la migración el proceso metastásico primordialmente ligado al uso de dicha molécula como fuente de energía. Por lo tanto, y con el fin de profundizar más en la capacidad de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> para alterar el funcionamiento celular, se estudió el efecto de dichas moléculas para sobre la migración de las células metastásicas MDA-MB-231. Para ello se usó el ensayo de cierre de herida, el cual permite observar la capacidad de movimiento de células adherentes (cuya proliferación ha sido inhibida) ante un estímulo externo. Los resultados, presentados en la figura 23, muestran que la incubación de células MDA-MB-231 con los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> disminuyó de manera significativa y concentración-dependiente la capacidad migratoria de dichas células, llegando a niveles significativos a una concentración de 2,5 µM, muy inferior al IC<sub>50</sub> de cada compuesto para la línea celular estudiada. Por lo tanto, es posible afirmar que PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> no

sólo poseen una actividad citotóxica frente a células de cáncer mamario humano, sino que además son capaces de inhibir otros procesos asociados al potencial carcinogénico de dichas células, lo que aumenta de manera importante su potencial como posibles agentes farmacológicos.

A)



B)



**Figura 23.** Efecto de GA-TPP<sup>+</sup> y PCA-TPP<sup>+</sup> sobre la capacidad migratoria de células MDA-MB-231. \*: p < 0,05 respecto al control.

## 6.- CONCLUSIÓN

Basados en todos los resultados descritos, podemos concluir que los ácidos protocatecuico y gentísico unidos a TPP<sup>+</sup> poseen un efecto citotóxico selectivo sobre células de cáncer mamario humano, que estaría gatillado por la habilidad de dichos compuestos para desacoplar la fosforilación oxidativa induciendo una pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial y una disminución aparente en los niveles de ATP celular. Estos últimos efectos parecen conducir a la muerte de tipo apoptótica de las células cancerígenas, efecto que se observa sólo en menor medida en células de epitelio mamario normal. Además, se observó que los ácidos estudiados inhiben la capacidad migratoria de células metastásicas MDA-MB-231. Adicionalmente, se determinó que dos de los mecanismos compensatorios activados por células tumorales ante la acción tóxica de los ácidos unidos a TPP<sup>+</sup> implican la acción por una parte de AMPK y adenilato quinasa como sensores metabólicos y por otra parte de PGC-1 $\alpha$  como un co-activador de la biosíntesis mitocondrial. Finalmente, es válido afirmar que pese a diferencias leves en la sensibilidad de distintas líneas celulares (dadas potencialmente por diferencias en el metabolismo, contenido mitocondrial, o expresión de moléculas de resistencia a drogas (transportadores ABC) de cada tipo celular), los compuestos GA-TPP<sup>+</sup> y PCA-TPP<sup>+</sup> poseen un importante efecto citotóxico en células de cáncer mamario humano, y por lo tanto justifican una mayor investigación en torno a su potencial como futuros agentes farmacológicos para el tratamiento del cáncer de mama (y posiblemente otros tipos de cáncer).

## 7.- REFERENCIAS

1. Bray, F., et al., *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. Int J Cancer, 2013. **132**(5): p. 1133-45.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
3. Anderson, B.O., et al., *Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit 2007*. Cancer, 2008. **113**(8 Suppl): p. 2221-43.
4. Criscitiello, C., et al., *Surgery of the primary tumor in de novo metastatic breast cancer: To do or not to do?* Eur J Surg Oncol, 2015. **41**(10): p. 1288-92.
5. Shapiro, C.L., J. Manola, and M. Leboff, *Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(14): p. 3306-11.
6. Hevir, N., et al., *Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines*. Chem Biol Interact, 2011. **191**(1-3): p. 206-16.
7. Zhou, Z., J. Zhou, and Y. Du, *Estrogen receptor alpha interacts with mitochondrial protein HADHB and affects beta-oxidation activity*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(7): p. M111 011056.
8. Zhou, Z., J. Zhou, and Y. Du, *Estrogen receptor beta interacts and colocalizes with HADHB in mitochondria*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **427**(2): p. 305-8.
9. Olson, E. and D. Mullins, *When Standard Therapy Fails in Breast Cancer: Current and Future Options for HER2-Positive Disease*. J Clin Trials, 2013. **3**: p. 1000129.
10. Weigelt, B., et al., *HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(1): p. 35-43.
11. Ahmed, S., A. Sami, and J. Xiang, *HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer*. Breast Cancer, 2015. **22**(2): p. 101-16.
12. Maximiano, S., et al., *Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer*. BioDrugs, 2016. **30**(2): p. 75-86.
13. Boyle, P., *Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 6**: p. vi7-12.
14. Griffiths, C.L. and J.L. Olin, *Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options*. J Pharm Pract, 2012. **25**(3): p. 319-23.
15. Ayub, A., W.K. Yip, and H.F. Seow, *Dual treatments targeting IGF-1R, PI3K, mTORC or MEK synergize to inhibit cell growth, induce apoptosis, and arrest cell cycle at G1 phase in MDA-MB-231 cell line*. Biomed Pharmacother, 2015. **75**: p. 40-50.
16. Pedersen, P.L., *The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: an overview*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(1): p. 1-12.
17. Ralph, S.J., et al., *The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy*. Mol Aspects Med, 2010. **31**(2): p. 145-70.
18. Neuzil, J., et al., *Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria*. Mitochondrion, 2013. **13**(3): p. 199-208.

19. Fulda, S., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Targeting mitochondria for cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(6): p. 447-64.
20. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
21. Mathupala, S.P., Y.H. Ko, and P.L. Pedersen, *The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 1225-30.
22. Mathupala, S.P., Y.H. Ko, and P.L. Pedersen, *Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(1): p. 17-24.
23. Pedersen, P.L., *Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer*. J Bioenerg Biomembr, 2008. **40**(3): p. 123-6.
24. Maiuri, M.C. and G. Kroemer, *Essential role for oxidative phosphorylation in cancer progression*. Cell Metab, 2015. **21**(1): p. 11-2.
25. Tan, A.S., et al., *Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA*. Cell Metab, 2015. **21**(1): p. 81-94.
26. Villanueva, M.T., *Metabolism: the mitochondria thief*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(2): p. 70.
27. Jiang, S., et al., *A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells*. EMBO J, 2012. **31**(8): p. 1985-98.
28. Cheng, G., et al., *Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2634-44.
29. Palorini, R., et al., *Mitochondrial complex I inhibitors and forced oxidative phosphorylation synergize in inducing cancer cell death*. Int J Cell Biol, 2013. **2013**: p. 243876.
30. Lou, P.H., et al., *Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range*. Biochem J, 2007. **407**(1): p. 129-40.
31. Aon, M.A., S. Cortassa, and B. O'Rourke, *Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 865-77.
32. Lozinsky, O.V., et al., *The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates sodium nitroprusside-induced toxicity in Drosophila melanogaster: potential involvement of free radicals*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2013. **158**(4): p. 244-52.
33. Sareen, D., et al., *Mitochondria, calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(6): p. 1466-75.
34. Lee, J.H., et al., *The role of Ca<sup>2+</sup> in baicalein-induced apoptosis in human breast MDA-MB-231 cancer cells through mitochondria- and caspase-3-dependent pathway*. Anticancer Res, 2008. **28**(3A): p. 1701-11.
35. Cao, X.H., et al., *ROS-Ca(2+) is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis*. Chem Biol Interact, 2011. **190**(1): p. 16-27.

36. Plaza, C., et al., *Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid and its tetra-acetylated derivative on respiration and growth of adenocarcinoma TA3 and its multiresistant variant TA3MTX-R*. In Vivo, 2008. **22**(3): p. 353-61.
37. Frey, C., et al., *Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007. **146**(4): p. 520-7.
38. Cortés Jopia, K., *Mecanismos de muerte celular inducida por cationes lipofílicos derivados del ácido gálico*. 2012, Disponible en <http://www.tesis.uchile.cl/handle/2250/112184>.
39. Jara, J.A., et al., *Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice*. J Med Chem, 2014. **57**(6): p. 2440-54.
40. Jana, F., et al., *Tumor cell death induced by the inhibition of mitochondrial electron transport: the effect of 3-hydroxybakuchiol*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **272**(2): p. 356-64.
41. 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(2)/M-phase arrest in mammary adenocarcinoma TA3*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **267**(3): p. 218-27.
42. Kampa, M., et al., *Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(2): p. R63-74.
43. Lin, H.H., et al., *Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation*. Int J Cancer, 2007. **120**(11): p. 2306-16.
44. Yin, M.C., et al., *Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(14): p. 6468-73.
45. Masella, R., et al., *Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms*. Curr Med Chem, 2012. **19**(18): p. 2901-17.
46. Sharma, S., N. Khan, and S. Sultana, *Study on prevention of two-stage skin carcinogenesis by Hibiscus rosa sinensis extract and the role of its chemical constituent, gentisic acid, in the inhibition of tumour promotion response and oxidative stress in mice*. Eur J Cancer Prev, 2004. **13**(1): p. 53-63.
47. Sharma, S., N. Khan, and S. Sultana, *Modulatory effect of gentisic acid on the augmentation of biochemical events of tumor promotion stage by benzoyl peroxide and ultraviolet radiation in Swiss albino mice*. Toxicol Lett, 2004. **153**(3): p. 293-302.
48. Fernandez, I.S., et al., *Gentisic acid, a compound associated with plant defense and a metabolite of aspirin, heads a new class of in vivo fibroblast growth factor inhibitors*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11714-29.
49. Hatzipanayioti, D. and P. Petropoulos, *Theoretical and experimental investigation of the semiquinone forms of protocatechuic acid. The effect of manganese*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2010. **75**(3): p. 997-1007.
50. Liu, Z.C., R.A. McClelland, and J.P. Uetrecht, *Oxidation of 5-aminosalicylic acid by hypochlorous acid to a reactive iminoquinone. Possible role in the treatment of inflammatory bowel diseases*. Drug Metab Dispos, 1995. **23**(2): p. 246-50.

51. Lambert, A.J. and M.D. Brand, *Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)*. J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39414-20.
52. Quinlan, C.L., et al., *The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle*. J Biol Chem, 2011. **286**(36): p. 31361-72.
53. Addabbo, F., M. Montagnani, and M.S. Goligorsky, *Mitochondria and reactive oxygen species*. Hypertension, 2009. **53**(6): p. 885-92.
54. Hoye, A.T., et al., *Targeting mitochondria*. Acc Chem Res, 2008. **41**(1): p. 87-97.
55. Murphy, M.P. and R.A. Smith, *Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 629-56.
56. Teicher, B.A., S.A. Holden, and K.N. Cathcart, *Efficacy of Pt(Rh-123)<sub>2</sub> as a radiosensitizer with fractionated X rays*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1987. **13**(8): p. 1217-24.
57. Modica-Napolitano, J.S. and J.R. Aprile, *Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **49**(1-2): p. 63-70.
58. Cheng, G., et al., *Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 285.
59. Truksa, J., et al., *Mitochondrially targeted vitamin E succinate modulates expression of mitochondrial DNA transcripts and mitochondrial biogenesis*. Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(11): p. 883-900.
60. Kelso, G.F., et al., *Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4588-96.
61. Modica-Napolitano, J.S. and K.K. Singh, *Mitochondrial dysfunction in cancer*. Mitochondrion, 2004. **4**(5-6): p. 755-62.
62. Gourley, P.L., et al., *Mitochondrial correlation microscopy and nanolaser spectroscopy - new tools for biophotonic detection of cancer in single cells*. Technol Cancer Res Treat, 2005. **4**(6): p. 585-92.
63. Lamb, R., et al., *Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease*. Oncotarget, 2015. **6**(7): p. 4569-84.
64. Chen, J.Q., et al., *Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(10): p. 1540-70.
65. Chaudhri, R.A., et al., *Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor-alpha36 (ERalpha36)*. J Biol Chem, 2012. **287**(10): p. 7169-81.
66. Pons, D.G., et al., *The presence of Estrogen Receptor beta modulates the response of breast cancer cells to therapeutic agents*. Int J Biochem Cell Biol, 2015. **66**: p. 85-94.
67. Ding, Y., et al., *Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1271.
68. Pelicano, H., et al., *Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(5): p. 434.

69. Arora, R., et al., *Inhibition of the Warburg effect with a natural compound reveals a novel measurement for determining the metastatic potential of breast cancers*. *Oncotarget*, 2015. **6**(2): p. 662-78.
70. Dong, P., et al., *Elevated expression of p53 gain-of-function mutation R175H in endometrial cancer cells can increase the invasive phenotypes by activation of the EGFR/PI3K/AKT pathway*. *Mol Cancer*, 2009. **8**: p. 103.
71. Lim, L.Y., et al., *Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells*. *Br J Cancer*, 2009. **101**(9): p. 1606-12.
72. Jordan, J.J., et al., *Altered-function p53 missense mutations identified in breast cancers can have subtle effects on transactivation*. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(5): p. 701-16.
73. Arabsolghar, R., T. Azimi, and M. Rasti, *Mutant p53 binds to estrogen receptor negative promoter via DNMT1 and HDAC1 in MDA-MB-468 breast cancer cells*. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(3): p. 2617-25.
74. Vaseva, A.V., et al., *p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis*. *Cell*, 2012. **149**(7): p. 1536-48.
75. Zhao, Y., et al., *p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3745-50.
76. Vurusaner, B., G. Poli, and H. Basaga, *Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **52**(1): p. 7-18.
77. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. *Mol Cell*, 2003. **11**(3): p. 577-90.
78. Oren, M. and V. Rotter, *Mutant p53 gain-of-function in cancer*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(2): p. a001107.
79. Gazdar, A.F., et al., *Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer*. *Int J Cancer*, 1998. **78**(6): p. 766-74.
80. Huang, J., et al., *Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F*. *J Cell Sci*, 1999. **112 ( Pt 23)**: p. 4193-205.
81. Bernas, T. and J. Dobrucki, *Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes*. *Cytometry*, 2002. **47**(4): p. 236-42.
82. Itagaki, H., et al., *An in vitro alternative to the Draize eye-irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method*. *Toxicol In Vitro*, 1991. **5**(2): p. 139-43.
83. Horibata, S., et al., *Utilization of the Soft Agar Colony Formation Assay to Identify Inhibitors of Tumorigenicity in Breast Cancer Cells*. *J Vis Exp*, 2015(99): p. e52727.
84. Maity, P., et al., *Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathology and associated apoptosis in gastric mucosa: a novel role of mitochondrial aconitase oxidation*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(5): p. 3058-68.
85. Royall, J.A. and H. Ischiropoulos, *Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **302**(2): p. 348-55.
86. Hissin, P.J. and R. Hilf, *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. *Anal Biochem*, 1976. **74**(1): p. 214-26.

87. Akerman, K.E. and N.E. Saris, *Stacking of safranin in liposomes during valinomycin-induced efflux of potassium ions*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **426**(4): p. 624-9.
88. Akerman, K.E. and M.K. Wikstrom, *Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential*. *FEBS Lett*, 1976. **68**(2): p. 191-7.
89. Amora, D.N., et al., *Mitochondrial dysfunction induced by pancreatic and crotalic (*Crotalus durissus terrificus*) phospholipases A2 on rabbit proximal tubules suspensions*. *Toxicon*, 2008. **52**(8): p. 852-7.
90. Dikov, D. and J. Bereiter-Hahn, *Inner membrane dynamics in mitochondria*. *J Struct Biol*, 2013. **183**(3): p. 455-66.
91. Ma, T., et al., *Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid beta*. *J Neurosci*, 2014. **34**(36): p. 12230-8.
92. Kurebayashi, N., T. Kodama, and Y. Ogawa, *P1,P5-Di(adenosine-5')pentaphosphate(Ap5A) as an inhibitor of adenylate kinase in studies of fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle*. *J Biochem*, 1980. **88**(3): p. 871-6.
93. Chen, D., et al., *Synergetic effects of aqueous extracts of Fuzi (*Radix Aconiti Lateralis Preparata*) and Tubeimu (*Rhizoma Bolbostemmatis*) on MDA-MB-231 and SKBR3 cells*. *J Tradit Chin Med*, 2016. **36**(1): p. 113-24.
94. Willmann, L., et al., *Metabolic profiling of breast cancer: Differences in central metabolism between subtypes of breast cancer cell lines*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015. **1000**: p. 95-104.
95. Sankala, H., et al., *Upregulation of the mitochondrial transport protein, Tim50, by mutant p53 contributes to cell growth and chemoresistance*. *Arch Biochem Biophys*, 2011. **512**(1): p. 52-60.
96. O'Connor, P.M., et al., *Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents*. *Cancer Res*, 1997. **57**(19): p. 4285-300.
97. Runnebaum, I.B., et al., *Mutations in p53 as potential molecular markers for human breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(23): p. 10657-61.
98. Weisz, L., M. Oren, and V. Rotter, *Transcription regulation by mutant p53*. *Oncogene*, 2007. **26**(15): p. 2202-11.
99. Yunokawa, M., et al., *Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells*. *Cancer Sci*, 2012. **103**(9): p. 1665-71.
100. Kim, M.J., et al., *Expression of metabolism-related proteins in triple-negative breast cancer*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(1): p. 301-12.
101. Simpson, N.E., et al., *An in vitro investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **133**(3): p. 959-68.
102. Stapelberg, M., et al., *Indoleamine-2,3-dioxygenase elevated in tumor-initiating cells is suppressed by mitocans*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **67**: p. 41-50.
103. Simoes, B.M., et al., *Anti-estrogen Resistance in Human Breast Tumors Is Driven by JAG1-NOTCH4-Dependent Cancer Stem Cell Activity*. *Cell Rep*, 2015. **12**(12): p. 1968-77.

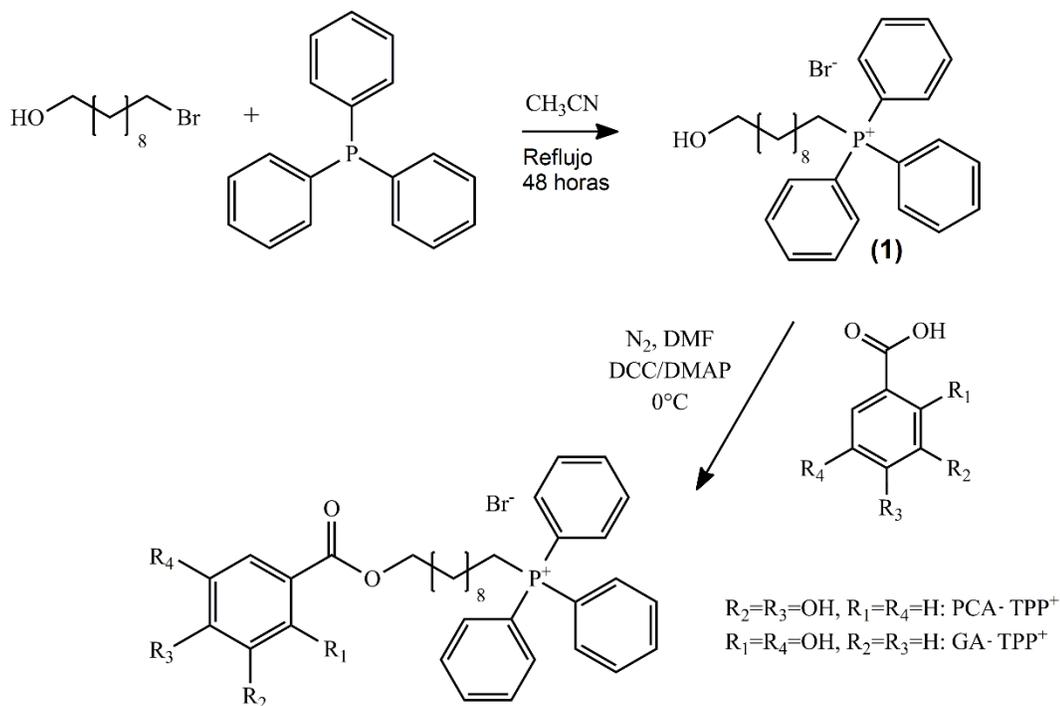
104. Karthik, G.M., et al., *mTOR inhibitors counteract tamoxifen-induced activation of breast cancer stem cells*. *Cancer Lett*, 2015. **367**(1): p. 76-87.
105. Porteous, C.M., et al., *P-glycoprotein (Mdr1a/1b) and breast cancer resistance protein (Bcrp) decrease the uptake of hydrophobic alkyl triphenylphosphonium cations by the brain*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(6): p. 3458-65.
106. Schaedler, T.A., et al., *Structures and functions of mitochondrial ABC transporters*. *Biochem Soc Trans*, 2015. **43**(5): p. 943-51.
107. Russo, J. and I.H. Russo, *Molecular Basis of Breast Cancer: Prevention and Treatment*. 2004.
108. Marrache, S. and S. Dhar, *The energy blocker inside the power house: Mitochondria targeted delivery of 3-bromopyruvate*. *Chem Sci*, 2015. **6**(3): p. 1832-1845.
109. Reddy, C.A., et al., *Mitochondrial-targeted curcuminoids: a strategy to enhance bioavailability and anticancer efficacy of curcumin*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e89351.
110. Vayalil, P.K., et al., *A novel class of mitochondria-targeted soft electrophiles modifies mitochondrial proteins and inhibits mitochondrial metabolism in breast cancer cells through redox mechanisms*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0120460.
111. Rohlenova, K., et al., *Selective disruption of respiratory supercomplexes as a new strategy to suppress Her2-high breast cancer*. *Antioxid Redox Signal*, 2016.
112. Xu, Q., et al., *Prevention of colorectal cancer liver metastasis by exploiting liver immunity via chitosan-TPP/nanoparticles formulated with IL-12*. *Biomaterials*, 2012. **33**(15): p. 3909-18.
113. Pathak, R.K., et al., *Mito-DCA: a mitochondria targeted molecular scaffold for efficacious delivery of metabolic modulator dichloroacetate*. *ACS Chem Biol*, 2014. **9**(5): p. 1178-87.
114. Duchen, M.R., *Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology*. *Mol Aspects Med*, 2004. **25**(4): p. 365-451.
115. Kowaltowski, A.J., et al., *Mitochondria and reactive oxygen species*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(4): p. 333-43.
116. Kadenbach, B., *Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1604**(2): p. 77-94.
117. Smith, R.A., et al., *Mitochondrial pharmacology*. *Trends Pharmacol Sci*, 2012. **33**(6): p. 341-52.
118. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(4): p. 251-62.
119. Dzeja, P. and A. Terzic, *Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing*. *Int J Mol Sci*, 2009. **10**(4): p. 1729-72.
120. Sanchez-Arago, M., et al., *IF1 reprograms energy metabolism and signals the oncogenic phenotype in cancer*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(16): p. 2963-4.
121. Sanchez-Arago, M., et al., *Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers*. *Oncogenesis*, 2013. **2**: p. e46.
122. Sanchez-Cenizo, L., et al., *Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(33): p. 25308-13.

123. Sastre-Serra, J., et al., *Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(4): p. 506-12.
124. Mailloux, R.J. and M.E. Harper, *Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins*. *Trends Endocrinol Metab*, 2012. **23**(9): p. 451-8.
125. Sluse, F.E., *Uncoupling proteins: molecular, functional, regulatory, physiological and pathological aspects*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **942**: p. 137-56.
126. Fernandez-Marcos, P.J. and J. Auwerx, *Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(4): p. 884S-90.
127. Lee, H.C. and Y.H. Wei, *Mitochondrial role in life and death of the cell*. *J Biomed Sci*, 2000. **7**(1): p. 2-15.
128. Chou, C.C., et al., *Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells*. *Arch Pharm Res*, 2010. **33**(8): p. 1181-91.
129. Bonora, M., et al., *Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition*. *Oncogene*, 2015. **34**(12): p. 1475-86.
130. Zhou, H., et al., *The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration*. *Biomaterials*, 2014. **35**(5): p. 1597-607.

## 8.- ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo de síntesis de los compuestos PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup>

La síntesis de los compuestos PCA-TPP<sup>+</sup> y GA-TPP<sup>+</sup> se realizó en dos etapas, según el esquema presentado a continuación.



La primera etapa consistió en la síntesis de bromuro de (10-hidroxidecil) trifenilfosfonio (**1**). En breve, Una solución de 10-bromodecan-1-ol (277 mg, 1.16 mmol) en acetonitrilo seco (100 mL) fue tratada con trifenilfosfina (310 mg, 1.18 mmol) a reflujo con agitación durante 48 horas. A continuación, el solvente fue evaporado en una bomba de vacío y el producto crudo fue sujeto a cromatografía en silica gel (EtOAc, MeOH) para obtener bromuro de (10-hidroxidecil) trifenilfosfonio como un aceite coloreado (370 mg, 63%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.01–1.51 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 3.57 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.73–7.91 (m, 15H, ArH). HRMS: m/z 485.4312 (calculado para C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>BrOP: 485.4357).

La segunda etapa involucró una esterificación de Steglich, usando N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador y N,N-dimetilformamida (DMF) como solvente. Brevemente, una solución de PCA o GA (1.3 mmol) en DMF seco (50 mL) fue tratada con una

solución de DCC (272 mg, 1.3 mmol) en DMF seco (30 mL), bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla se enfrió a 0 °C, y se le añadió una solución de bromuro de (10-hidroxidecil) trifenilfosfonio (551 mg, 1.1 mmol) en DMF seco (10 mL) y DMAP (en cantidad catalítica) en DMF (5 mL). Al día siguiente, se detuvo la reacción y cualquier precipitado resultante fue eliminado por filtración. Finalmente, el solvente se removió mediante una bomba de vacío, produciendo un residuo que fue sujeto a cromatografía en silica gel (DCM, MeOH).

**(10-((2,5-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio (GA-TPP<sup>+</sup>C<sub>10</sub>):** Aceite café oscuro (70%). RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,10-1,50 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 3,34 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,50 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, ArH), 6,68 (dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,7 Hz, 1H, ArH), 7,20 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H, ArH) 7,70-7,95 (m, 15H, ArH).

**(10-((3,4-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio (PCA-TPP<sup>+</sup>C<sub>10</sub>):** Aceite amarillo claro (76%). RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,14-1,47 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 3,35 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,74 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, ArH), 7,27 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, ArH), 7,35 (s, 1H, ArH) 7,76-7,94 (m, 15H, ArH).

## Anexo2. Tabla de partidores utilizados para qPCR

Gen	Directo	Inverso
ABCG2	TCG TTA TTA GAT GTC TTA GCT GCA A	TTG TAC CAC GTA ACC TGA ATT ACA
ABCB7	ATC CGG CCT TTA GTC TCT GTT AGC GG	CTC TGG AAT CTG CTG GTA GGC TCG AG
SOD2	GAC AAA CCT CAG CCC TAA CG	TTG GAC ACC AAC AGA TGC AG
CAT	TTG CCG GCC ACC TGA AGG AT	TTT GCC TTC TCC CTT GCC GC
AMPK	GTA CCA GGT CAT CAG TAC ACC A	CCT TCG TGG AGC CTG TTT TT
UCP3	GAA GGT CCG ATT TCA GGC CA	GTA GGT CAC CAC CTC AGC AC
UCP4	CGC TAC TGC TGA ATG TCC GT	GTC TCC CAA CCG AGC AAG AG
PGC1 $\alpha$	GGG TGG ACT CAA GTG GTG CAG TG	GGT GGA GGG GTG CCG TCA GG
D-LOOP	TCG CCT GTA ATA TTG AAC GT	ATT TGG TAT TTT CGT CTG GG
12S ARN	ACC ACC TCT TGC TCA GCC TA	CAT GGG CTA CAC CTT GAC CT
16S ARN	TCC CGA TGG TGC AGC CGC TA	ACG GGG GAA GGC GCT TTG TG
ND1	ATA CCC ATG GCC AAC CTC CT	GGG CCT TTG CGT AGT TGT AT
ND2	GGC CCA ACC CGT CAT CTA CT	GAT GCG GTT GCT TGC GTG AG
ND4	ACT ACT CAC TCT CAC TGC CC	AGT GGA GTC CGT AAA GAG GT
ND6	CCT ACC TCC ATC GCT AAC CC	AGG GGG AAT GAT GGT TGT CT
CYTB	GAA ACT TCG GCT CAC TCC TT	GGC GAT TGA TGA AAA GGC GG
MT-CO1	GCC TCC GTA GAC CTA ACC AT	GTT ATG GCA GGG GGT TTT AT
MT-CO2	AGT CCT GTA TGC CCT TTT CC	GCG ATG AGG ACT AGG ATG AT
MT-CO3	CCC ACC AAT CAC ATG CCT AT	TAG GCC GGA GGT CAT TAG GA
ATP6	CTG TTC GCT TCA TTC ATT GC	GAT TAG TCA TTG TTG GGT GG
ATP8	TGC CCC AAC TAA ATA CTA CC	CTT TGG TGA GGG AGG TAG GT
POLR2a	TGC TCC GTA TTC GCA TCA TGA ACA	ATC TGT CAG CAT GTT GGA CTC GAT G
RPLP0	ATC ACA GAG GAA ACT CTG CAT TCT CG	GAT AGA ATG GGG TAC TGA TGC AAC AGT T