

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“EFECTOS CITOTÓXICOS PROVOCADOS POR CATIONES LIPOFÍLICOS
DESLOCALIZADOS DERIVADOS DE ÁCIDOS POLIHIDROXI-BENZOICOS
SOBRE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CARCINOMA ORAL HUMANO.”***

MEMORIA PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR AL TÍTULO
DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

POR:

JOCELYN ELIZABETH AGUILERA GONZÁLEZ

Director de Memoria:

Prof. Dr. José Jara Sandoval
Unidad de Farmacología
ICOD
Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Codirector de Memoria:

Prof. Dr. Alfredo Molina Berríos
Unidad de Farmacología
ICOD
Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Patrocinante de Memoria:

Prof. Mgs. María Eugenia Letelier
Departamento Química Farmacológica y
Toxicológica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2016

*“Aunque tu mente este confundida tu corazón siempre sabe la respuesta
y con el tiempo, lo que hoy es difícil mañana será una conquista.
Esfuézate por lo que realmente te llene el alma
y ten la virtud de saber esperar porque
todo lo que tiene que ser
Será.”*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me han acompañado en este arduo camino. Difícil, sinuoso, oscuro, pero a la vez, también lleno de risas y alegrías, momentos inolvidables que marcan no sólo mi trayecto académico, si no también mi vida.

Agradezco sinceramente a mi tutor de tesis, Dr. José Jara, por su esfuerzo y dedicación, por permitirme aventurarme en este amplio y extenso mundo que es la investigación. A la profesora, Dra. Mabel Catalán, gracias por sus conocimientos, sus orientaciones, persistencia, paciencia y sus motivaciones que han sido realmente fundamentales para mi formación. A la profesora María Eugenia por su paciencia y ayuda para llevar a cabo todo este trabajo, de principio a fin, siempre ha sido un sostén para mí.

A todo el laboratorio de Medicina por acogerme y orientarme en cada experimento que realizaba, al profesor Ferreira por permitirme trabajar allá, a los chicos que me guiaron cuando recién me adentraba a este amplio mundo.

A mi familia, fuente de apoyo constante e incondicional, que sin su ayuda hubiera sido imposible culminar mi profesión. A mi padre por darme aliento constantemente para llegar aquí, donde estoy. A mi querida madre por soportarme y apoyarme en todo, aunque llegara de mal humor a casa. A mis pequeños hermanos por ser fuente constante de risas y diabluras, que más de alguna vez nos trajeron problemas.

También deseo agradecer a las grandes personas que me han acompañado en el trayecto de este trabajo, en las travesuras, en los momentos grises y oscuros. Gracias Dome por soportarme ya tantos años, por acompañarme y aconsejarme en todo momento, por las locuras y salidas, por todo lo vivido. A Panxo, Roberto, a los niños del laboratorio, por los momentos felices, por los congresos, por las embarradas que nos mandamos, nunca olvidaré el “Está Jocelyn”, en verdad muchas gracias.

Y por sobre todo quiero agradecer a Sara, gracias por estar conmigo en todo momento, por tu paciencia y comprensión, por quedarte noches en vela a mi lado redactando este escrito, por tu apoyo incondicional. Gracias por ser mi compañera, en este pequeño y a la vez gran proyecto que me embarqué, y en la vida. Con esto, hemos alcanzado un triunfo más.

A mi abuelo, por estar presente en toda mi niñez, por cuidarme y protegerme incondicionalmente sin esperar nada más a cambio que la sonrisa de su nieta, por celebrar cada uno de mis pequeños avances. Gracias por dejarme compartir contigo todos aquellos momentos.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Generalidades del Cáncer	1
B- Reprogramación metabólica en células cancerígenas	3
C- Rol de la mitocondria en cáncer	8
D- Fármacos antineoplásicos dirigidos a la mitocondria.....	11
E- Ácido Gálico y Cationes Lipofílicos Deslocalizados como antineoplásicos mitocondriotrópicos.....	13
F- Cáncer Oral.....	19
II. HIPÓTESIS	22
III. OBJETIVOS	22
A- Objetivo General	22
B- Objetivos Específicos	22

IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
A-	Materiales	23
	Reactivos	23
	Compuesto en Estudio	23
	Líneas Celulares	23
B-	Métodos	24
	Cultivo Celular	24
	Almacenamiento y Congelamiento	24
	MTT: Ensayo de viabilidad celular	24
	Determinación del consumo de oxígeno en células tumorales.....	25
	Ensayo de muerte celular por citometría de flujo: Incorporación de Ioduro de Propidio (PI)	26
	Determinación de los niveles intracelulares de ATP	26
	Estudio de formación de colonias.....	27
	Ensayos de migración celular.....	27
	Expresión de marcadores de muerte celular por Western Blot (Casp-9 y PARP)	28
	Análisis del tipo de muerte celular inducida	29
	Medición del cambio de potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante safranina.....	30
	Expresión de resultados y análisis estadístico	30
V.	RESULTADOS	31

A.	Efecto citotóxico y antiproliferativo de los compuestos en estudio sobre las líneas celulares CAL 27 y OKF6/TERT-2.	31
B.	Acción de los cationes lipofílicos sobre la cadena transportadora de electrones en las células tumorales.	36
C.	Disminución del potencial de transmembrana generada por los compuestos derivados de ácidos polihidroxi-benzoicos.	38
D.	Efecto de los derivados del ácido polihidroxi-benzoico sobre el contenido de ATP en células CAL 27.	40
E.	Influencia de los compuestos derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la formación de colonias.	43
F.	Efecto de los compuestos estudiados sobre la migración de las células tumorales metastásicas CAL 27.	45
G.	Tipo de muerte celular inducida por los compuestos alquilhidroxibenzoatos-TPP ⁺ en células tumorales de cáncer oral.	47
H.	Activación de los marcadores de muerte celular producida por los cationes lipofílicos deslocalizados.	50
VI.	DISCUSIÓN.	52
VII.	CONCLUSIÓN.	57
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proyección de número de muertes en el mundo por diversas causas 2004-2030.....	2
Figura 2. El impacto de la glucosa en células tumorales.....	4
Figura 3. Implicación de factor HIF-1 en las rutas metabólicas glicolíticas.....	5
Figura 4. Cambios en la composición lipídica de la membrana mitocondrial interna.....	9
Figura 5. Entrada de cationes alquiltrifenilfosfonio a las mitocondrias de células tumorales.....	15
Figura 6. Derivados del ácido benzoico.....	16
Figura 7. Cationes lipofílicos deslocalizados en estudio.....	18
Figura 8. Efecto citotóxico de los cationes lipofílicos sobre células de la cavidad oral.....	32
Figura 9. Selectividad de los compuestos en estudio sobre células CAL 27 en comparación a la línea de epitelio oral OKF6/TERT-2.....	35
Figura 10. Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la respiración de células CAL 27.....	37
Figura 11. Efecto de los cationes lipofílicos sobre el potencial de transmembrana mitocondrial.....	39
Figura 12. Efecto de los compuestos sobre el contenido de ATP celular.....	41
Figura 13. Viabilidad celular por medio de la incorporación de Ioduro de Propidio.....	42

Figura 14. Inhibición de la clonogenicidad causada por los cationes lipofílicos deslocalizados.	43
Figura 15. Efecto de los derivados de ácido polihidroxibenzoicos sobre la capacidad clonogénica en células CAL 27	44
Figura 16. Inhibición del cierre de la herida ejercida por los derivados de ácido polihidroxi-benzoicos	45
Figura 17. Efecto de los cationes lipofílicos sobre la migración de células CAL 2746	
Figura 18. Diagrama de ensayo Anexina V / PI	48
Figura 19. Efecto de los compuestos en estudio sobre marcadores de muerte celular	49
Figura 20. Activación de Caspasa-9	50
Figura 21. Fraccionamiento de PARP	51

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. IC ₅₀ obtenidos por MTT en células escamosas de carcinoma oral y queratinocitos del epitelio bucal	33
Tabla 2: Índice de selectividad de los compuestos.....	34
Tabla 3: Cambio de Unidades de Fluorescencia Relativa (UFR) por segundo.	39

ABREVIATURAS

ADP	:	Adenosín difosfato
AIF	:	Factor inductor de la apoptosis
AKT	:	Proteína quinasa B
AMP	:	Adenosín monofosfato
ATP	:	Adenosín trifosfato
AV	:	Anexina V
Bcl-2	:	linfoma de células B-2
BH	:	Dominios de homología Bcl-2
BPE	:	Extracto de pituitaria bovina
BrdU	:	5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	:	Seroalbúmina bovina
CCCP	:	Carbonil-cianuro- <i>m</i> -clorofenilhidrazona
Cdk	:	Quinasa dependiente de ciclina
COCE	:	Carcinoma oral de células escamosas
CTE	:	Cadena transportadora de electrones
DLCs	:	Cationes lipofílicos deslocalizados
DMEM HG	:	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle alto en glucosa
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
FBS	:	Suero fetal bovino
G-6P	:	Glucosa 6-fosfato
GA	:	Ácido Gálico
GLU	:	Glutamato
GLUT	:	Transportador de glucosa
HEPES	:	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico
HIF-1	:	Factor inducible por hipoxia – 1
HK-2	:	Hexoquinasa-2

IAPs	:	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
KSFM	:	Medio de queratinocitos sin suero
MAL	:	Malato
MCT	:	Transportadores de monocarboxilato
MIF	:	Mediana de la intensidad de fluorescencia
MIM	:	Membrana interna mitocondrial
mTOR	:	Diana de rapamicina en células de mamífero
MTT	:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADH	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido
NAD⁺	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Oxidado
NADPH	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido
OCR	:	Tasa de consumo de oxígeno
OLIGO	:	Oligomicina
PBS	:	Amortiguador fosfato salino
PI	:	Yoduro de propidio
PI3K	:	Fosfoinositol 3-quinasa
PIK3CA	:	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa
PIP3	:	Fosfatidil inositol trifosfato
PMM	:	Permeabilización de la membrana mitocondrial
PTEN	:	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
ROS	:	Especies reactivas de oxígeno
SCO2	:	Citocromo C oxidasa 2
SDS-PAGE	:	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
STS	:	Estaurosporina
TBS	:	Solución salina tamponada con Tris
Tween 20	:	Polisorbato 20
UFR	:	Unidad de fluorescencia relativa
VDAC	:	Canal aniónico dependiente de voltaje
VEGF	:	Factor de crecimiento endotelial vascular

$\Delta\Psi_m$:	Potencial de membrana mitocondrial
2,5-di OH C₁₀	:	2,5-dihidroxibenzoato de decilo
Benz C₁₀	:	Benzoato de decilo
2-OH TPP⁺C₁₀	:	(10-((2-hidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
2,3-diOH TPP⁺C₁₀	:	(10-((2,3-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
Gent TPP⁺C₁₀	:	(10-((2,5-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio
TPP⁺C₁₀	:	(10-((3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio

RESUMEN

El cáncer oral es una enfermedad con gran impacto a nivel mundial, de hecho, ocupa el sexto lugar en el mundo en la categoría de cánceres más frecuentes en hombres. En sí, el cáncer es una enfermedad en la cual las células del organismo experimentan un desequilibrio entre la división y la muerte celular, en donde se produce un crecimiento descontrolado de estas células que procede de una serie de alteraciones genéticas que les permiten multiplicarse fuera de contexto del desarrollo normal del tejido.

Estas células cancerosas presentan características llamativas como potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, evasión de apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, invasividad y metástasis. Todas estas mutaciones otorgan ventajas selectivas que finalizan en la progresión de la enfermedad; aunque también algunas características son esencialmente relevantes en la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas: un mayor potencial de transmembrana mitocondrial debido a modificaciones en la composición interna de esta, actividad altamente glicolítico y reducción en la masa mitocondrial. Por esto, la mitocondria es una diana farmacológica atractiva para la búsqueda de nuevas moléculas que permitan aumentar la eficacia y selectividad de los tratamientos.

Nosotros hemos utilizado como agentes citotóxicos derivados de ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico vinculados a trifenilfosfonios, ya que existen datos que afirman que los compuestos trifenilfosfonio pueden conducir al farmacóforo a la mitocondria. Los resultados de estos experimentos han sido exitosos en cuanto a citotoxicidad y selectividad. También se pudo establecer que estos compuestos generan un efecto como desacoplantes mitocondriales.

Hemos probado estos derivados como sales de bromuro sobre líneas de células tumorales CAL-27 y células normales. Ensayo de viabilidad por MTT fue utilizado para medir la citotoxicidad a través de los respectivos IC_{50} , el contenido de ATP fue medido por luminiscencia y la muerte por apoptosis fue determinada por citometría de flujo.

Los resultados indican que los compuestos exhiben una mayor citotoxicidad en la línea celular que en las células normales. Además, los compuestos mostraron un efecto de desacoplante, gatillando un decrecimiento en el potencial de tranmembrana, caída en los niveles de ATP e inducen la apoptosis en un rango de concentración micromolar. Los resultados son prometedores en términos de citotoxicidad y selectividad, ofreciendo una oportunidad farmacológica para el tratamiento del cáncer oral.

ABSTRACT

Oral cancer is a disease with high impact worldwide, in fact, ranks sixth in the world in the category of most common cancers in men. As such, cancer is a disease in which cells undergo an imbalance between cell division and death. The uncontrolled growth of these cells come from a series of genetic alterations that allow them to multiply out of context Normal tissue development.

These cancer cells have striking features as unlimited replicative potential, sustained angiogenesis, evasion of apoptosis, self-sufficiency in growth signals, insensitivity to anti-growth signals, invasiveness and metastasis. All these features provide selective advantages ending in the progression disease. Some of these functions are essentially relevant in the search for new therapeutic, for example, increased mitochondrial transmembrane potential, highly glycolytic activity and reduced mitochondrial mass tools. This characteristic makes mitochondrial an attractive drug target for the search for new molecules that increase the efficiency and selectivity of the treatments.

It was used as cytotoxic agents derived from mono and/or poly-hydroxybenzoic acids attached to the triphenylphosphonium group, as there is evidence that this group can lead to pharmacophore to the mitochondria. The results of these experiments have been successful in terms of cytotoxicity and selectivity. It could also establish that these compounds generate an effect as uncoupling.

We have tested these derivatives as bromide salts on tumor cell lines CAL-27 and normal cells. MTT viability assay was used to measured cytotoxicity by calculating the respective IC_{50} , ATP content through luminescence, mitochondrial transmembrane potential by fluorescence and induction of apoptotic death was determined by flow cytometry.

The results indicate that the compounds exhibit enhanced cytotoxicity in the tumor cell line than normal cells. Furthermore, the compounds showed an uncoupling effect, and also triggered decreased transmembrane potential, falling ATP levels and induce apoptosis in a micromolar range of concentration. The results are promising in terms of cytotoxicity and selectivity and offer a pharmacological opportunity of treatment in oral cancer.

I. INTRODUCCIÓN

A. Generalidades del Cáncer

El cáncer es una de las más importantes causas de muerte a nivel mundial¹. Este consiste en grupo grande y complejo de patologías, cuyo factor común es la ruptura del equilibrio entre el crecimiento y la muerte celular, donde hay una división anormal e incontrolada de células que tienden a proliferar y a acumularse. Las células que se condicen con esta condición adquieren alteraciones genéticas que inicialmente les permiten proliferar fuera del contexto de desarrollo del tejido normal; generando distintas desregulaciones en el ciclo celular, la apoptosis, el envejecimiento celular y la reparación del ADN². Posteriormente, con las divisiones sucesivas, otros genes que están relacionados con los procesos de angiogénesis, invasión, mortalidad, adhesión y metástasis, se ven afectados³. La expresión y evolución de estas transformaciones confiere a dichas células características biológicas de malignidad y ventajas selectivas para el crecimiento del tumor⁴.

Dado lo anterior se desprende que esta enfermedad se produce por la acumulación de numerosas mutaciones, lo cual provoca que la célula tumoral se insensibilice al control ambiental y local. Respaldando esto, análisis de carcinomas humanos en función del tiempo muestran que se necesitan entre cuatro a siete mutaciones en genes claves, para producir la mayoría de los cánceres⁵. Estas transformaciones ocurren ya sea aumentando o estimulando la actividad de los factores proliferativos con la activación de protooncogenes, o bien, disminuyendo o bloqueando los factores inhibitorios con la inactivación de genes supresores. Como consecuencia, se observa una adaptación del metabolismo celular que favorece la proliferación celular rápida, así como el crecimiento autónomo y la supervivencia en un entorno ausente de contacto con la matriz extracelular. Ambos fenómenos pueden estar presentes en el cáncer^{4,5}. Todas estas mutaciones sucesivas desarrollan la carcinogénesis, que se produce cuando se convierte una célula normal en un clon de células neoplásicas⁴. Este fenómeno se debe al aumento y envejecimiento de la población mundial, tras haber adquirido mejores niveles de vida o bien, a la exposición continua de agentes carcinógenos, lo que provoca variaciones genéticas progresivas en las células susceptibles.⁶

Debido a que existen más de 100 tipos de cánceres con fenotipos diferentes, resulta crucial identificar ciertas alteraciones esenciales y comunes en la fisiología celular que nos permita englobar características inequívocas para la malignidad de las células tumorales. Entre éstas podemos encontrar: Potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, evasión de la apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, invasión de tejidos y metástasis⁷. Todas estas mutaciones otorgan ventajas selectivas que conllevan a la progresión de la enfermedad, el desarrollo y crecimiento tumoral y su posterior diseminación al resto de los órganos de la persona afectada.⁸

En términos epidemiológicos, en el 2012 se estimó que 36,2 millones de personas vivían con cáncer y 8,2 millones de ellos murieron a causa de este¹. Según las proyecciones realizadas por la OMS para el año 2030, se espera que esta tendencia continúe en aumento, en especial al contrastarse con la mortalidad que presentan las enfermedades transmisibles que se encuentran en evidente descenso ante las no transmisibles, como el cáncer⁹ (Figura 1).

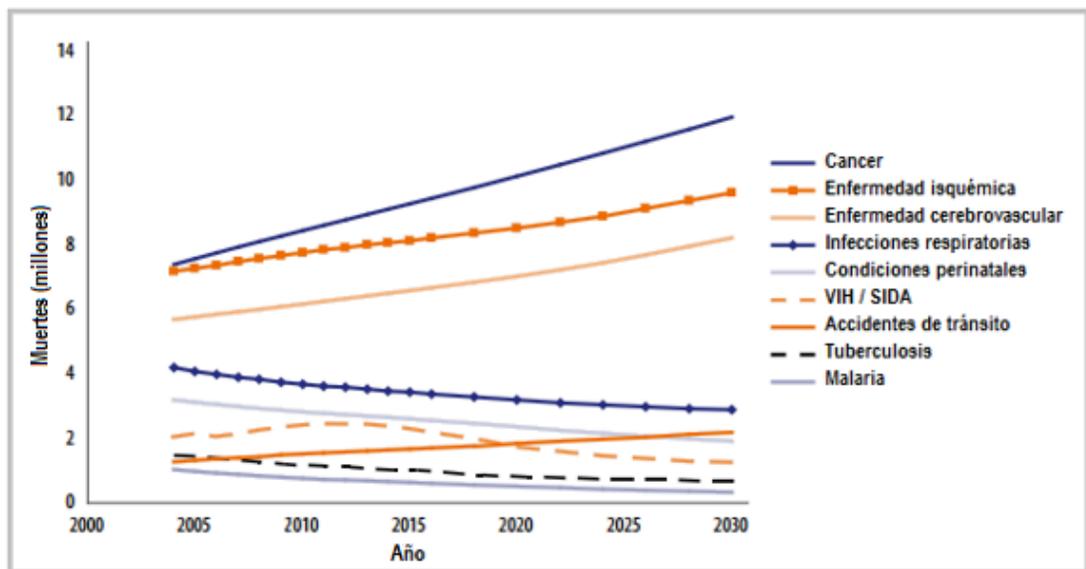


Figura 1. Proyección de número de muertes en el mundo por diversas causas 2004-2030. Obtenido de: Itriago Laura (2013). Epidemiology of cancer in Chile and worldwide: present and future [Figura].

A nivel nacional la mortalidad por cáncer ha experimentado importantes variaciones que se relacionan con el aumento en el nivel de las condiciones de vida, el envejecimiento poblacional, los cambios en los estilos de vida y los avances en la provisión de servicios de salud. Estos hechos se pueden observar claramente en el tiempo, ya que en el año 1960 las defunciones por enfermedades cardiovasculares y cáncer no superaban el 18% del total de defunciones, mientras que hoy en día llegan en conjunto al 52%⁹, siendo el cáncer la segunda causa más importante de mortalidad en Chile, representando el 24,5% del total de muertes¹⁰.

Como se ha visto, las defunciones por cáncer proyectan un gran aumento, por eso es trascendental aumentar el arsenal farmacoterapéutico, pues las células tumorales han mostrado grados de resistencia al sobre-expresar enzimas transportadoras del tipo ABC (ATP-binding cassette) que son capaces de expulsar distintos xenobióticos, limitando la biodisponibilidad y la distribución de muchos agentes antineoplásicos¹¹. En consecuencia, los tratamientos habituales son cada vez menos eficaces.

B- Reprogramación metabólica en células cancerígenas

Las células cancerosas tienen diferentes requerimientos metabólicos en comparación con sus homólogas normales. Así, lo describió el bioquímico Otto Warburg quien fue el primero en demostrar en 1928, que los tumores metabolizan la glucosa a mayor velocidad que otros tejidos¹². Específicamente se describió que las células tumorales presentan glicolisis aumentada pese a la existencia de niveles de oxígeno normales, lo que se denominó “glicolisis aeróbica”, mejor conocida como Efecto Warburg¹³. Este efecto se caracteriza por un aumento en la captación y el consumo de glucosa, una disminución en la fosforilación oxidativa, y un aumento en la producción de lactato¹⁴. Esto a simple vista pareciese bastante paradójico, ya que por esta vía sólo se forman 2 moles de ATP por mol de glucosa, en comparación con los 36 moles de ATP generados a través del ciclo del ácido cítrico^{15,16}. Por lo tanto, la utilización de glicólisis en presencia de oxígeno no parece ser una ventaja adaptativa significativa; sin embargo, con un suministro ilimitado de glucosa, esta vía es capaz de producir energía a un ritmo mucho más rápido que la fosforilación oxidativa. Esto se

debe a que, además de ser una fuente de ATP, sirve como precursor de una variedad de rutas biosintéticas necesarias para la proliferación exacerbada^{17,18}, puesto que todos los intermediarios obtenidos a través de esta vía, son destinados a la producción de nucleótidos, lípidos y aminoácidos requeridos para el crecimiento celular (Figura 2).

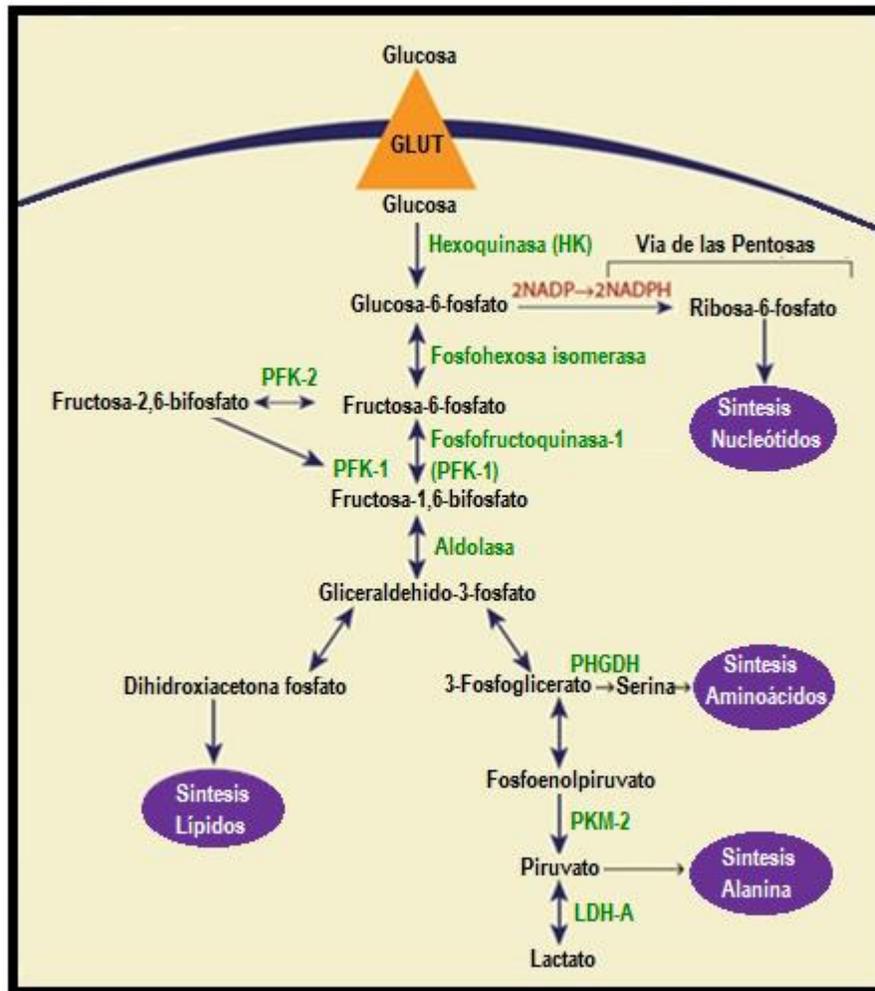
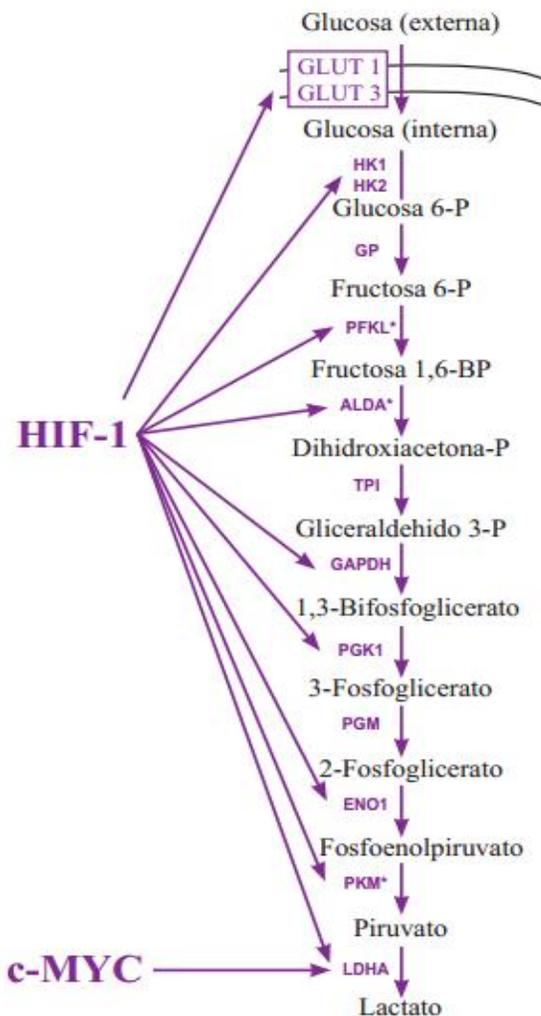


Figura 2. El impacto de la glucosa en células tumorales. Se observa un aumento del flujo hacia la síntesis de ribosa-6-fosfato (y nucleótidos). Además, el piruvato puede ser oxidado por las mitocondrias para generar alanina (Ala). Fuente: imagen modificada desde Batra, S. (2013). Cancer metabolism as a therapeutic target. [Figura]¹⁷.

En los tumores sólidos la captación de glucosa y glicólisis funcionan unas diez veces más rápido en comparación con el tejido normal^{12,13}. Este aumento en el



metabolismo se debe, en primera instancia, a que a medida que el tumor temprano se expande más allá de los límites de difusión de suministro de la red capilar (100 o 200 μm)¹², las células tumorales entran en estado de hipoxia (concentración de O_2 inferior a 20 μM)¹⁹ y anoxia. Esto genera la estabilización del factor de transcripción HIF-1^{13,20} que inicia y conlleva a una reprogramación transcripcional completa del metabolismo que ofrece múltiples soluciones al estrés hipóxico. Por una parte, se exagera la glicólisis por medio de un aumento en la expresión de enzimas glicolíticas (Figura 3) y por otra, se aumentan los transportadores de glucosa y los inhibidores del metabolismo mitocondrial¹⁵, pues ésta es la estrategia óptima para la generación de ATP cuando una célula está limitada en el uso la cadena de transporte de electrones¹⁸.

Figura 3. Implicación de factor HIF-1 en las rutas metabólicas glicolíticas. Fuente: Imagen modificada desde: Gonzales Rengifo (2007) Sobre expresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas [Figura].⁷⁰

HIF-1 estimula la angiogénesis por la regulación positiva de varios factores, incluyendo el factor de crecimiento endotelial VEGF. En las células tumorales las principales consecuencias de la activación de HIF-1 son la sobre-expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4 y de la enzima Hexoquinasa II (HK-2) que se caracteriza por tener una alta actividad constitutiva y mayor afinidad por el ATP,

más aun, HK-2 retiene la capacidad catalítica de sus dos dominios, en comparación con sus homologas, en las cuales uno de sus dominios ha perdido su función catalítica y ha adquirido un papel meramente regulador²¹. Otra particularidad de la HK-2 es que posee extremos *N*-hidrófobos que permiten que esta enzima se ancle a la membrana mitocondrial externa a través de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDACs)²². Esta asociación provee algunos beneficios a la HK-2, como tener acceso directo y preferencial al ATP recién sintetizado en la fosforilación oxidativa para fosforilar la glucosa¹⁹. Además, esta unión impide casi por completo la inhibición de la HK-2 por su producto, la glucosa-6-fosfato (G-6P)¹³. Las exacerbaciones en la actividad de estas proteínas, tanto la Hexoquinasa-2 como de los GLUTs, permiten mantener una alta tasa de flujo glicolítico en los tumores.

La exacerbación de la vía glicolítica desemboca en la necesidad de la célula tumoral de eliminar constantemente el lactato, producto final de la glicólisis aeróbica, hacia el exterior de la célula a través de los transportadores de monocarboxilato (MCT) generando un microambiente ácido^{23,24}. Esto provoca un pH hostil para el tejido normal circundante, lo que facilita la diseminación del tumor, la invasión a distintos tejidos y la formación de metástasis^{15,25}.

Cabe considerar además, que existen distintas mutaciones que pueden favorecer la formación o proliferación del cáncer, ya sea mediante mutaciones en oncogenes, en genes supresores de tumores y/o de proteínas relacionadas con la transducción de señales que pueden desembocar en cambios metabólicos. Por ejemplo, los oncogenes y factores de transcripción, tales como AKT, c-MYC, Ras, p53 y HIF-1, regulan positivamente diversos componentes de la vía glicolítica¹⁷. Entre estos factores encontramos el factor de transcripción MYC, el cual puede asociarse a MAX provocando la transcripción de genes glicolíticos y la sobre-expresión de lactato deshidrogenasa¹⁵. MAX es capaz además de interactuar con HIF-1 provocando la inhibición de p21²⁶ que es el encargado de inhibir la unión de CDKs con sus respectivas ciclinas, impidiendo de esta forma que la célula prosiga a la fase S del ciclo celular. Al perderse la función de p21 el ciclo celular se mantiene constantemente activo.

Otra vía metabólica que se encuentra frecuentemente alterada en las células tumorales es la de PI3K (Fosfoinositol 3-quinasa)¹⁵. Esta vía puede sufrir mutaciones en el gen PIK3CA (Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa) y por consecuencia en su respectivo complejo PI3K, en el gen de PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) que es un supresor de tumores o bien en el receptor tirosina quinasa²⁷. Todo esto desencadena niveles constitutivamente altos de PIP3 (fosfatidil inositol trifosfato). Como consecuencia de lo anterior, río abajo del PIP3, se provoca la activación de AKT (Proteína quinasa B), que controla indirectamente la supervivencia celular por medio de los efectores de las dianas que dependen de ella. Un ejemplo son las dianas implicadas en la glicólisis aeróbica, donde es estimulado el consumo de glucosa en las células transformadas sin afectar a la tasa de fosforilación oxidativa¹⁵; esto provoca el incremento en la supervivencia celular, la proliferación, el crecimiento, el metabolismo y los efectos anti-apoptóticos. La AKT además, estimula la señalización a través de mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero), factor que regula las rutas de señalización esenciales implicadas en el acoplamiento del estímulo del crecimiento y la progresión del ciclo celular²⁸. Por otro lado, y en forma indirecta, mTOR causa cambios metabólicos mediante la activación de HIF-1 en concentraciones normales de oxígeno, y son precisamente estos cambios los determinantes del fenotipo glicolítico en la vía PI3K/AKT/mTOR²⁹.

Otra mutación que gatilla el crecimiento celular descontrolado son las que ocurren en el gen p53. Este gen, en su estado basal, codifica un factor de transcripción nuclear supresor de tumores que corresponde a uno de los cambios genómicos más frecuentes, de hecho, este gen se encuentra mutado aproximadamente en un 80% de los cánceres¹⁵. En condiciones normales p53 actúa como un regulador negativo de la proliferación, interrumpiendo el ciclo celular e induciendo la apoptosis. Este gen también es capaz de regular la vía glicolítica, inhibiéndola por medio de la transcripción de TIGAR y, además, aumentando la expresión de la síntesis de citocromo C oxidasa 2 (SCO2). Esto induce directamente la respiración mitocondrial³⁰, por ello cualquier pérdida en la funcionalidad de p53 conllevaría a un aumento en la vía glicolítica y a una disminución de la respiración mitocondrial, favoreciendo de esta forma la proliferación del cáncer.

C- Rol de la mitocondria en cáncer

Las células cancerosas exhiben cambios que les ayudan a escapar de la muerte celular, mantener su exacerbada proliferación, y cambiar su metabolismo hacia la producción de energía a través de la glicolisis. Uno de los organelos que presenta una mayor diferenciación entre las células normales y las tumorales son las mitocondrias. Así, por ejemplo, las células tumorales presentan una marcada disminución en el número de sus mitocondrias, como también en la actividad de las enzimas que participan en el ciclo de Krebs y en el proceso de fosforilación oxidativa³¹. Entre estas enzimas se encuentran los complejos multiproteicos: el Complejo I que tiene una actividad NADH deshidrogenasa; el complejo II que corresponde a la succinato deshidrogenasa, que cataliza la oxidación de succinato a fumarato con la reducción concomitante de la ubiquitina; el complejo III o citocromo C oxidorreductasa que reduce la coenzima Q y el complejo IV o citocromo C oxidasa que dona los electrones obtenidos del citocromo C al O₂, produciendo 2 moléculas de H₂O³². Como estas enzimas están asociadas a la translocación de iones hidrógeno fuera de la matriz mitocondrial, se crea una gradiente electroquímica que posteriormente es utilizada por la ATP sintasa, para generar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Por lo que, cualquier modificación en la actividad de estas enzimas tendrá un efecto directo en la generación de ATP celular.

Por otra parte, se han descrito una serie de modificaciones en la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial (MIM) de las células tumorales, dado por el gran aumento de fosfolípidos como cardiolipina (que aumentan la densidad de cargas negativas en la membrana) y colesterol (que puede disminuir la difusión pasiva de H⁺ y otros iones), lo que provoca consecuentemente una menor permeabilidad de H⁺ ¹⁹ (Figura 4).

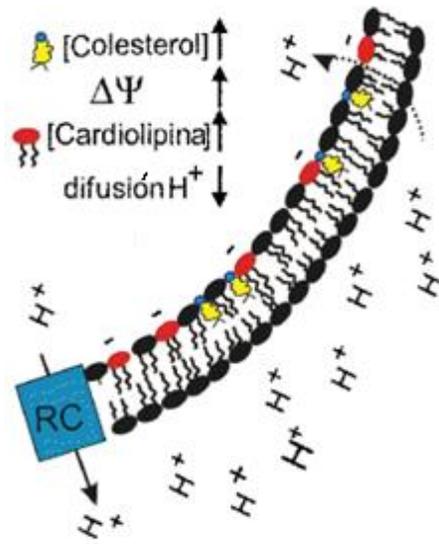


Figura 4: Cambios en la composición lipídica de la membrana mitocondrial interna. Obtenida de: Moreno-Sánchez, R. (2007). Energy metabolism in tumor cells [Figura]¹⁹.

Esto se traduce en una diferencia de potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) mayor. De hecho, alcanza valores de 150 – 180 mV, encontrándose cargada negativamente en la cara interna de MIM. La magnitud de esta carga es el doble que la de las membranas de células excitables y seis veces mayor que la de las células no excitables³³.

Además de las funciones metabólicas que posee la mitocondria, también juega un papel muy relevante en la muerte celular, ya que es capaz de mediar la vía intrínseca de la apoptosis. Este, es un proceso activo e indispensable para lograr una adecuada homeostasis; para ejecutarse necesita de la síntesis proteica y consumo de

energía. La apoptosis se desencadena normalmente como respuesta frente a ciertos eventos de estrés y daño celular; como ocurre con el daño irreparable del ADN, hipoxia, privación de factores de crecimiento, estrés oxidativo y activación de oncogenes. Este proceso es regulado por un gran número de moléculas; entre ellas se encuentran la familia Bcl-2, los genes supresores de tumores, los oncogenes, los factores mitocondriales, la familia de proteínas caspasas y las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), etc³⁴.

Durante el proceso de apoptosis intrínseca la mitocondria genera la permeabilización de su membrana mitocondrial (PMM) liberando factores apoptogénicos como el citocromo C, el factor inductor de la apoptosis (AIF), ATP y Smac/Diablo. Esto conlleva a la activación de la caspasa-9 lo que produce la consecuente activación de la caspasa-3 que es quien gatilla el proceso apoptótico y la muerte celular^{34,35}.

Las vías apoptóticas se regulan por determinados genes que codifican para proteínas pro u anti apoptóticas. Los genes que estimulan la apoptosis son considerados como supresores de tumores, mientras que aquellos que la inhiben se consideran protooncogenes³⁵. Si uno de estos genes se altera y muta puede desencadenar un desequilibrio en los mecanismos de muerte celular programada.

La familia de genes Bcl-2 es un grupo de genes que codifica para proteínas claves para regular la inducción de PMM, ya que incluyen moléculas con actividad pro- y anti-apoptóticas. Las proteínas Bcl-2 que inhiben la apoptosis son Bcl-xL, Bcl-W, MCL1 y A1; todas ellas comparten cuatro dominios de homología (BH). Otras similares en secuencia y estructura, pero con una función opuesta, son BAX y BAK; estas proteínas promueven la apoptosis, al igual que BIM, PUMA, Noxa, BID, BAD, entre otras. Estas últimas son un conjunto de proteínas que tienen sólo un dominio BH3 en común, conocidas como *BH3-only*. La inducción de la apoptosis requiere la activación de ambos miembros de esta familia tanto de los pro-apoptóticos como de los anti-apoptóticos. La exposición al estrés resulta en la inducción de las proteínas *BH3-only*, que neutralizan a las proteínas pro-supervivencia. La posterior activación de BAX y BAK, consiste en un cambio de conformación y oligomerización en la membrana mitocondrial externa, lo que conduce a su permeabilización y consiguiente liberación del citocromo C al citoplasma, iniciando así, el proceso apoptótico³⁶.

Las Bcl-2 son tan relevantes y diversas que pueden decidir el desenlace de una célula, por un lado, si dicha capacidad es mal regulada puede permitir que células alteradas sobrevivan. Por otro lado, si hay una sobre-expresión de proteínas Bcl-2 antiapoptóticas confiere a las células tumorales la “inmortalidad”. Sin embargo, puede ocurrir lo contrario con igual desenlace, es decir, un bloqueo de los inductores de la apoptosis que sucede con la supresión de genes como BAX, BAK y p53³⁵. Todo esto ocasiona que en el primer punto de control del ciclo celular se pasen por alto errores genéticos graves y que no existan mecanismos para anular la división de estas células alteradas³⁵

En resumen, mutaciones ocasionadas en genes involucrados con la muerte celular programada y la regulación del ciclo celular, provocan la inmortalización y permiten que células se dividan indefinidamente a pesar de estas alteraciones genéticas que se transmiten a las células hijas de generación en generación. Esto, es precisamente lo que desencadena la enfermedad neoplásica.

D- Fármacos antineoplásicos dirigidos a la mitocondria

Las mitocondrias son organelos subcelulares que se pueden encontrar en todas las células humanas, a excepción de los glóbulos rojos maduros. Una célula eucariota por lo general contiene alrededor de 1,000 a 2,000 mitocondrias³²; esta completa distribución en la mayoría de los tejidos, convierte a la mitocondria en un elemento común y por tanto, de interés como blanco farmacológico.

Las mitocondrias tienen muchas funciones. En las células normales: son las principales productoras de energía a través de la fosforilación oxidativa, producen intermediarios metabólicos, regulan el estado redox en la célula, median la apoptosis intrínseca, entre otras. Las mitocondrias tienen estos mismos papeles esenciales en las células tumorales, sin embargo, estos organelos sufren profundos cambios durante la oncogénesis, dando como resultado, por ejemplo, alteraciones metabólicas, aumento de la producción de ROS, resistencia a la apoptosis y a la muerte celular^{37,38}. Por eso, hoy en día se han propuesto moléculas como candidatos de fármacos que se dirijan a la mitocondria en forma selectiva, ya que son organelos semiautónomos que presentan alteraciones metabólicas específicas en las células cancerosas, principalmente debido a que tienen necesidades metabólicas y mitocondriales que difieren de sus contrapartes normales, lo que ofrece una ventana de oportunidades para la terapia eficaz y selectiva contra el cáncer. Considerando lo anteriormente descrito, se hace cada vez más atractivo buscar terapias antineoplásicas que tengan como objetivo las mitocondrias de las células tumorales³⁷.

En la última década se han investigado un grupo de compuestos con actividades antitumorales que inducen la apoptosis a través de la desestabilización mitocondrial.

Aquellos compuestos son denominados “mitocans” (derivada de mitocondria y cáncer)³⁹, siendo su finalidad, inducir la apoptosis en las células tumorales y ejercer un cierto grado de selectividad para producir una mínima toxicidad en los tejidos normales^{29,40}. Para evitar que los “mitocans” eliminen preferentemente a las células sanas, se adopta un esquema “cancerotrópico”⁴⁰, utilizando las diferencias existentes entre mitocondrias normales y tumorales, siendo las más características:

1- El gradiente de voltaje de transmembrana a través de la MIM utilizado para la síntesis de ATP, siendo esta, la característica más llamativa de las mitocondrias de células tumorales. Anteriormente se reconoció que cualquier catión capaz de permear las membranas biológicas se acumularía en la matriz mitocondrial obedeciendo la ley de Nernst que predice una relación de acumulación de 10 veces por cada 60 mV de diferencia de voltaje trans-membrana⁴⁰.

2- Las diferencias de pH que están dadas por el uso prominente de la vía glicolítica como fuente de energía de las células cancerígenas; lo que produce que el intersticio del tejido tumoral sea ácido, en comparación con el intersticio del tejido normal, que es neutro. Si se utiliza un ácido débil (con un pK de aprox. 5.6) como compuesto de acumulación selectiva en las células tumorales, el 98% del total del compuesto se encontrará desprotonado (cargado) a pH neutro, mientras que el compuesto estará protonado en el pH ácido del intersticio del tumor, lo que resulta en una absorción más rápida por las células cancerosas^{40,41}.

3- En células tumorales se sobre-expresa una isoenzima de hexoquinasa, la HK2. Esta enzima se ha convertido en un blanco para intervenir la ruta glicolítica, pues se ha observado que la depleción específica de ésta isoforma reduce el crecimiento del tumor en modelos preclínicos⁴².

4- En las células tumorales existe una mayor cantidad de fosfolípidos por lo que son un objetivo potencial para intervenciones mitocondriales⁴⁰.

5- Hoy en día, también se han dirigido inhibidores específicos de los canales VDAC / ANT, proteínas que se encuentran insertas en las membranas mitocondriales externas e interna, respectivamente. Estos canales interconexionan la matriz mitocondrial con el citosol, sirviendo como un medio de transporte para una variedad de solutos como ATP y ADP. La desregulación del complejo VDAC / ANT resulta en la inducción de la apoptosis en las células cancerosas^{43,44}.

El potencial excepcional de la mitocondria como diana para agentes contra el cáncer ha sido reforzada por el desalentador hallazgo que incluso los tumores del mismo paciente difieren en un número de mutaciones y, lo que es peor, hay diferencias en las mutaciones dentro del mismo tumor⁴³. Esto indica que es improbable manejar y suprimir el cáncer al dirigir la terapia a un único blanco. Por esto, las mitocondrias proporcionan una diana farmacológica beneficiosa, que permite eliminar selectivamente las células cancerosas, con la ventaja de manifestar efectos secundarios limitados sobre las células normales. Además, la muerte de las células tumorales por apoptosis restringe la propagación de restos celulares al exterior circundante evitando así, la respuesta inflamatoria.

El mecanismo predominante por el cual las moléculas contra el cáncer orientados a la mitocondria destruyen las células cancerosas se basa en la capacidad de estos fármacos para interrumpir los sistemas de producción de energía de las células tumorales³⁹, lo que aumenta la acumulación de ROS y la activación de las vías de señalización de muerte dependientes de la mitocondria, generando apoptosis³⁹.

E- Ácido Gálico y Cationes Lipofílicos Deslocalizados como antineoplásicos mitocondriotrópicos

Con el fin de lograr la eficiencia en el tratamiento contra el cáncer, los investigadores se han centrado en estudios farmacológicos con compuestos bioactivos extraídos de plantas o derivados semi-sintéticos a partir de los compuestos naturales. En particular, los flavonoides han recibido gran atención debido a su presencia común en una variedad de plantas; entre estos compuestos se encuentra el ácido gálico. Esta

clase de compuestos está ampliamente distribuida en la naturaleza; verduras, frutas y productos alimenticios como el chocolate, té y vino son productos naturales que contienen una gran variedad de flavonoides. El ácido gálico (GA: ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) que se puede obtener a través de hidrólisis ácida de los taninos hidrolizables, tiene una característica bastante particular y específica que no es común en los compuestos fenólicos, la que le brinda una actividad antitumoral contra una variedad de líneas celulares^{45,46}. Este compuesto no sólo destaca por sus propiedades antitumorales; también por presentar un cierto grado de selectividad en su citotoxicidad al comparar la actividad sobre células tumorales y no tumorales⁴⁵⁻⁴⁷. Sumado a esto, estudios anteriores han demostrado que estos compuestos tienen potentes propiedades terapéuticas, incluyendo antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, entre otras⁴⁵.

Ensayos realizados con ésteres de ácido gálico (galatos) asocian la actividad antitumoral a diversos efectos; estos son en primera instancia 1- Capacidad de generar ROS, que es provocado por la actividad oxidante, que da como resultado el estrés oxidativo, causando un desequilibrio redox en la célula por efecto de los radicales libres producidos⁴⁸ y 2- Aumento intracelular de Ca^{2+} , que desencadena la activación de caspasas y la liberación del citocromo C al citoplasma a través del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Otros efectos promovidos por los galatos son la capacidad de alterar la relación Bcl-2/BAX y/o inhibir la fosforilación de la tirosina quinasa, lo que resulta en una alteración en el potencial mitocondrial y la inducción de apoptosis⁴⁵. Se cree que esta actividad apoptótica también depende de la porción hidrofóbica de la molécula y que los tres grupos hidroxilos adyacentes son responsables de la citotoxicidad⁴⁷.

Se ha observado que para aumentar la actividad del ácido gálico y sus derivados es necesario asociarlo a una molécula de trifenilfosfonio mediante una cadena alquílica de diez carbonos. Esto se realiza porque al asociar el GA con un catión lipofílico como las sales de fosfonio es posible dirigir dichos compuestos a las mitocondrias, aumentando su especificidad y eficacia mejorando así su actividad⁴⁰. Estas sales, en

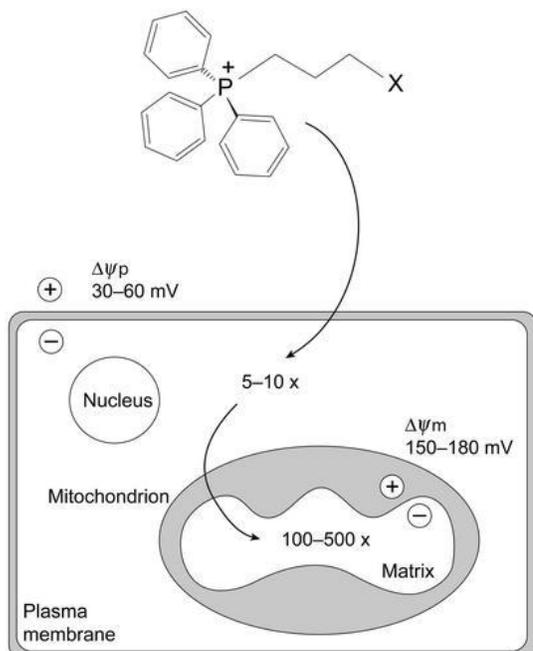


Figura 5. Entrada de cationes alquiltrifenilfosfonio a las mitocondrias de células tumorales. El catión trifenilfosfonio se une covalentemente a un farmacóforo y se acumula de 5 a 10 veces en el citoplasma desde el espacio extracelular por el potencial de membrana plasmático ($\Delta\psi_p$) y, a continuación, se acumula más de 100 a 500 veces en la matriz mitocondrial por el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Estos cationes tienen el potencial para atravesar directamente a través de las bicapas lipídicas y distribuirse en todos los órganos. Obtenida de Smith, R. A. (2003). Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences [Figura]⁶⁷.

particular, han dado lugar a una familia de compuestos mitocondriotrópicos proporcionando un “motor mito-focalizado”⁴⁰. La utilización de los cationes lipofílicos se basa en aprovechar el mayor potencial eléctrico de transmembrana mitocondrial de las células cancerosas, gracias a esto, pueden acumularse dentro de la mitocondria causando muerte celular³⁷. Estos cationes en primera instancia tienden a acumularse en el citosol debido a la atracción producida por la diferencia de potencial de la membrana plasmática, $\Delta\psi_p$, que corresponde aproximadamente entre -30 y -60 mV (con la carga negativa en el interior). Una vez en el interior celular esta diferencia aumenta varios cientos de veces dentro de las mitocondrias de las células cancerosas, donde se genera una magnitud de $\Delta\psi_m$ de unos -150 a -180 mV a través de la membrana mitocondrial interna (carga negativa hacia la matriz mitocondrial)^{19,49} (Figura 5).

Como los cationes alquiltrifenilfosfonio atraviesan fácilmente la bicapa lipídica por ser altamente liposolubles, no necesitan de transportadores, por ende, se encuentran en las mitocondrias de todos los tejidos, en contraste con los compuestos hidrófilos que necesitan de transportadores para su expresión específica. Así, estas moléculas entran al torrente sanguíneo y se dirigen a las mitocondrias de las células, en especial a aquellas células tumorales que presentan un $\Delta\psi_m$ mayor que las mitocondrias normales.

Retomando lo planteado anteriormente, se ha demostrado en estudios previos⁵⁰ que derivados del ácido gálico unidos a una molécula de trifenilfosfonio (TPP⁺) presentan mayor citotoxicidad y selectividad al contener diez átomos de carbono entre el AG y el grupo TPP⁺, ya que exhiben un menor IC₅₀ para las células tumorales y un índice de selectividad considerablemente mayor en comparación con las células normales. Las cadenas con menos de ocho átomos de carbono son menos potentes y las que tienen cerca de 15 átomos de carbono son altamente tóxicas. Por lo tanto, la diferencia en la eficacia del compuesto depende de la longitud de la cadena lateral de alquilo⁵⁰.

Considerando todo lo descrito anteriormente, en el presente estudio se evaluaron diferentes cationes lipofílicos deslocalizados (DLCs) utilizando como farmacóforo los ácidos mono- y di-hidroxilados, además del ácido gálico (Figura 6).

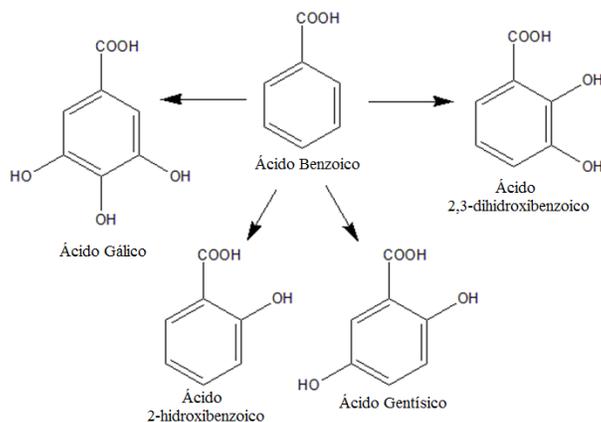


Figura 6. Derivados del ácido benzoico. El ácido gálico es un derivado del ácido benzoico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico). Nuevos compuestos derivados de este serán ensayados como el: ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), el ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y el ácido pirocatéuico (ácido 2,3-dihidroxibenzoico).

En este trabajo se postula que la esterificación de los ácidos carboxílicos por medio de una cadena alquílica de diez átomos de carbono unido a una molécula de trifenilfosfonio (Figura 7), constituirán compuestos que se acumularán preferentemente en la mitocondria de las células tumorales, potenciando su actividad citotóxica. La carga positiva deslocalizada conduciría a las moléculas a la mitocondria induciendo la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial. Se cree que esta disminución en la síntesis de ATP es debida a los grupos hidroxilos aromáticos de las moléculas, pues, al ser ácidos débiles se pueden comportar como agentes desacoplantes interfiriendo con el gradiente electroquímico producido por la diferencia de concentración de H^+ entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. De esta manera se produciría un mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa que debería traducirse en una disminución de la síntesis de ATP.

Un porcentaje variable entre el 40 al 75% de la generación de ATP en un tumor maligno, ocurre a través de la glicólisis pese a que la mitocondria todavía es funcional y puede generar el resto de los requerimientos de energía del tumor³⁸. Considerando que los componentes celulares claves responsables de la coordinación del alto flujo glicolítico y la homeostasis bioenergética, son altamente dependientes del ATP producido en la mitocondria por la fosforilación oxidativa³⁸, al disminuir la síntesis de éste, también disminuiría la capacidad de la vía glicolítica para entregar energía a la célula tumoral, desencadenando su muerte.

Dado que la mitocondria es un blanco antitumoral selectivo estas moléculas derivadas del ácido gálico, que presentan afinidad por ella, constituyen una excelente estrategia terapéutica para combatir el cáncer. Estos compuestos al ser mitocondriotrópicos para células cancerígenas permitirían disminuir o evitar los efectos adversos de los fármacos utilizados actualmente.

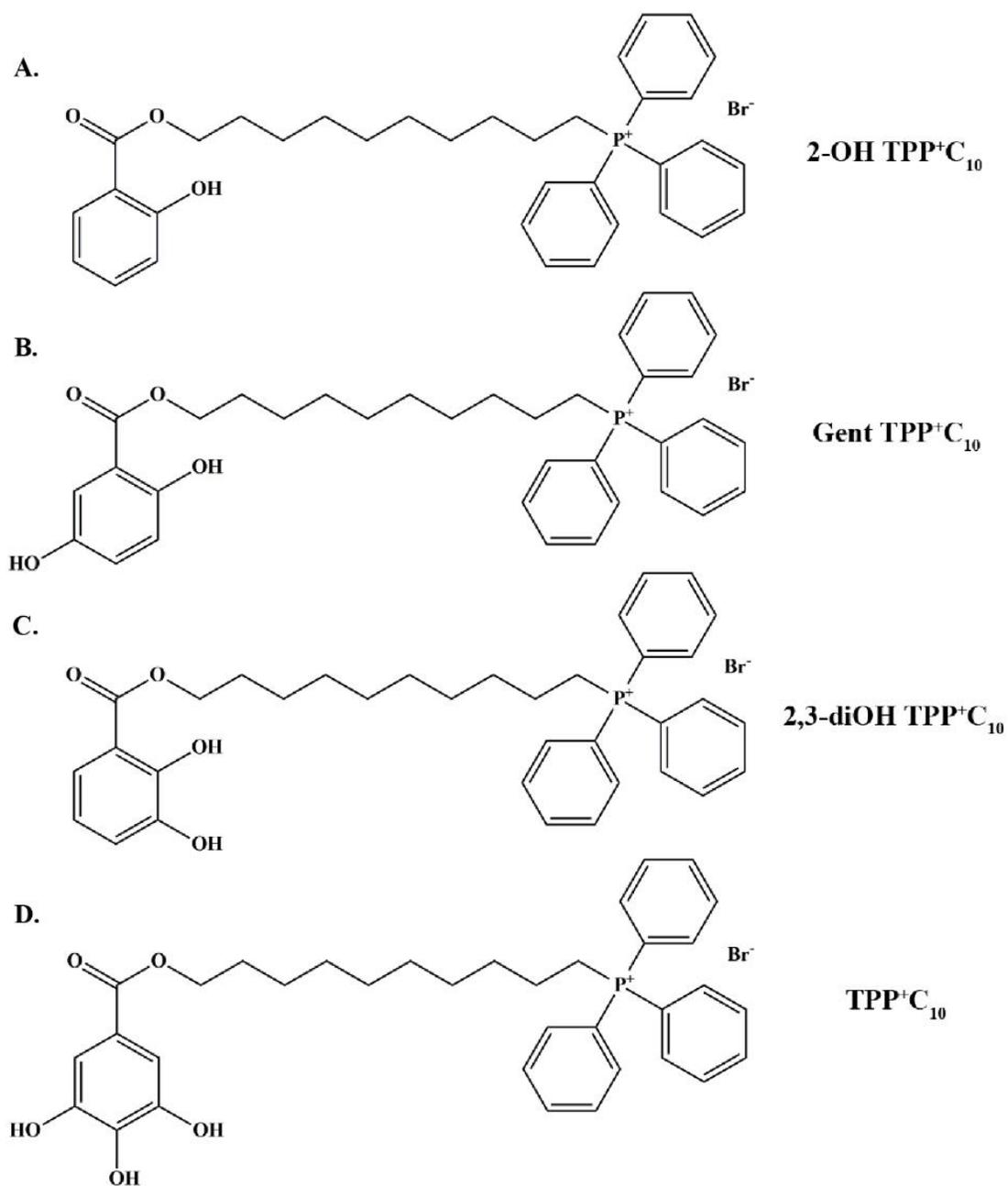


Figura 7. Cationes lipofílicos deslocalizados en estudio.

(A) 2-OH TPP⁺C₁₀: (10-((2-hidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio.

(B) Gent TPP⁺C₁₀: (10-((2,5-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio.

(C) 2,3-diOH TPP⁺C₁₀: (10-((2,3-dihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio.

(D) TPP⁺C₁₀: (10-((3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi)decil)trifenilfosfonio

F- Cáncer Oral

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más común y frecuente de la cavidad oral a nivel mundial. En especial en países asiáticos, donde su alta incidencia se asocia al tabaquismo y a los hábitos de masticar las hojas de tabaco⁵¹. Esta enfermedad constituye el 3% del total de neoplasias malignas a nivel mundial. Cuando nos referimos a cáncer oral estamos hablando de COCE, ya que constituye entre el 90 y 95% de todas las lesiones malignas de la cavidad bucal⁵²⁻⁵⁴. Según las estadísticas del año 2008, se reportaron 263.900 nuevos casos de cáncer oral y 128.000 muertes asociados a esta patología⁹, esto corresponde aproximadamente a un 2,0% de todas las muertes relacionadas con patologías neoplásicas, siendo sus tasas de incidencia y mortalidad, 4,0 y 1,9; respectivamente⁵⁵. En los últimos años, a pesar de los grandes avances en la tecnología y las distintas terapias como la cirugía, radiación y quimioterapia, no se ha observado un incremento en las tasas de supervivencia. De hecho, esta enfermedad ha sufrido un aumento en su tasa de mortalidad⁵¹. Esto sumado a que los tratamientos por lo general dan lugar a un deterioro del habla, la masticación, salivación y la deglución, así como también deformidad estética y trastornos psicológicos, disminuyen la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad⁵⁶.

En la mayoría de los grupos étnicos, el cáncer oral por lo general es dos a cuatro veces más frecuentes en hombres que en mujeres con excepción de Filipinas donde los porcentajes son similares. Las razones de estas diferencias aún no han logrado ser esclarecidas del todo, pero se cree que la causa se debe a la desigualdad en exposición a factores de riesgos, entre los que se encuentran: el tabaco y sus subproductos, el consumo de alcohol e infecciones por VPH (Virus del Papiloma Humano)⁵⁷. El tabaco, por su parte, tiene un efecto carcinogénico directo sobre el epitelio oral y las partículas de nicotina, alquitrán, monóxido de carbono, entre otros, pueden producir cambios en el ADN celular, iniciando la transformación de una célula normal a una célula neoplásica⁵⁸. Además, se ha visto un efecto sinérgico entre el tabaco y el alcohol, su asociación aumentaría entre 6 a 15 veces el riesgo de poseer cáncer oral⁵⁹. A nivel mundial el tabaco da cuenta del 40% de las muertes por cáncer de la cavidad

oral y el consumo de alcohol contribuye en un 16%. Para los países desarrollados los porcentajes son 70% y 30% respectivamente⁹.

La edad también es considerada un factor de riesgo, ya que más del 90% de los pacientes diagnosticados con cáncer oral son mayores de 45 años, siendo el promedio de edad de 60 años⁵²; sin embargo, ha ido en aumento el número de adultos entre 20 y 30 años que han desarrollado este cáncer, especialmente en lengua⁵⁷. Existe un grupo de pacientes menores de 20 años que manifiestan COCE de encía sin causas etiológicas aparentes⁶⁰, indicando la expansión de esta patología a distintos rangos etarios lo que ha aumentado su peligrosidad.

El COCE con el tiempo, es capaz de invadir y destruir estructuras vecinas como músculos, hueso, glándulas salivales y es muy común que se origine metástasis en los ganglios linfáticos cervicales, expandiéndose progresivamente a estructuras anatómicas del cuello⁵². La muerte sobreviene por este motivo, es decir, por la falta de control local de la enfermedad⁵⁸.

Actualmente, el tratamiento de esta neoplasia corresponde a cirugía y radioterapia. El uso de la quimioterapia se considera más un tratamiento paliativo que un tratamiento curativo, siendo los principales agentes terapéuticos utilizados: metotrexato, cisplatino y 5-fluoracilo. El conflicto que presenta la quimioterapia en el COCE es que puede dar como resultado una disminución temporal del tamaño de la masa tumoral, pero no ha demostrado un significativo aumento en las tasas de supervivencia a los 5 años ni en la reducción del potencial metastásico⁶¹.

En estudios anteriores⁶² se ha observado que este tipo de neoplasia presenta una sobre-expresión de ciclina D⁵⁸, además es muy frecuente que se presenten alteraciones en el gen p53. De hecho, esta mutación ocurre en más del 70% de los COCE., asociándose la pérdida de función de p53 a la progresión del cáncer y a la resistencia de la quimioterapia⁵¹.

La visión descrita anteriormente, no es muy diferente a nuestra realidad nacional, ya que las tasas de incidencia y mortalidad estimada corresponden a 3,2 y 1,9 para

hombres y 1,2 y 0,6 para mujeres, respectivamente⁵⁵. En términos de supervivencia, la sobrevivida en Chile de los pacientes a los cinco años desde que se realiza el diagnóstico, es de un 56% y esta estadística se reduce significativamente a menos del 40% si no se detecta el cáncer en sus primeras etapas⁶³.

Uno de los grandes problemas que se tienen en Chile es la detección tardía del cáncer oral, de hecho, el 78,9% de los pacientes diagnosticados se encuentran en etapas avanzadas (estadio III y IV) cuando ya el tumor es mayor a 4 cm de diámetro⁶³. Esto se puede deber a que, en parte, no todos tienen un acceso pleno a la asistencia sanitaria y, sobre todo, a la gran carencia de conocimiento que se posee con respecto a este tipo de cáncer en comparación con otros. Es por esto que es mucho menos común que el diagnóstico de este tumor se realice en etapas tempranas de la enfermedad, cuando aún es tratable y manejable con cirugía. Cabe mencionar que, aun siendo diagnosticado en estas etapas la cirugía es altamente mutilante y el paciente tiende a perder parte de su estructura facial en ella. Pues, Esta cirugía implica una resección completa de la lesión con un margen de tejido normal adyacente y, cuando está indicado, alguno o todos los ganglios linfáticos cervicales homolaterales e incluso en algunas ocasiones también los contralaterales⁵⁸.

Debido a las razones antes mencionadas y dado que los pacientes con cáncer oral a menudo son refractarios a la quimioterapia convencional, el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes resulta de suma importancia⁵¹. Tomando esto en consideración, no es aberrante pensar que los cationes lipofílicos deslocalizados derivados del ácido gálico puedan llegar a ser una opción viable en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas como agentes antitumorales para tratar esta patología.

II. HIPÓTESIS

Los cationes lipofílicos deslocalizados derivados de ácidos polihidroxi-benzoicos ejercen una acción desacoplante de la cadena transportadora de electrones, generando:

- Disminución en la síntesis de ATP mitocondrial.
- Muerte celular por apoptosis.
- Toxicidad selectiva hacia las células de carcinoma oral de células escamosas humanas.

III. OBJETIVOS

A- Objetivo General

Evaluar la actividad citotóxica de compuestos derivados de ácido gálico a los cuales se les ha incorporado un grupo alquil trifenilfosfonio, generando un catión lipofílico deslocalizado, en la línea celular de cáncer oral CAL 27.

B- Objetivos Específicos

1. Identificar cuál de los diferentes compuestos utilizados presenta una mayor potencia y selectividad frente a una línea celular de carcinoma de lengua (CAL 27), comparándolo con células normales del epitelio bucal.
2. Determinar el efecto desacoplante de los diferentes cationes lipofílicos derivados de compuestos polihidroxi-benzoicos sobre las células tumorales de carcinoma oral.
3. Determinar el efecto de los compuestos sobre los niveles de ATP en las células de CAL 27.
4. Determinar el efecto de los compuestos sobre la clonogenicidad y la migración de las células tumorales orales.
5. Determinar el o los tipos de muerte celular inducida por los compuestos seleccionados en las células tumorales.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A- Materiales

Reactivos

Medio de cultivo DMEM, tritón X-100, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), oligomicina, glutamina, glutamato (GLU), malato (MAL), Ioduro de Propidio (PI), azul de tripán 0,4%, seroalbúmina bovina (BSA), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), suero fetal bovino (FBS), buffer fosfato salino (PBS), fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). La penicilina y estreptomicina fueron adquiridos en Biological industries, Kibutz. Israel. Todos los demás compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes como Dimetil Sulfóxido (DMSO) se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

Compuesto en Estudio

Los compuestos estudiados en esta tesis, derivados de alquil-poli-hidroxi-benzoatos, fueron sintetizados en el laboratorio de Química Experimental del departamento de Química de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación. Todas las soluciones stock y disoluciones pertinentes fueron preparadas en DMSO.

Líneas Celulares

La línea tumoral de cáncer oral humana, carcinoma oral de células escamosas, CAL 27 (Código ATCC® CRL-2095™) fue adquirida en ATCC (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), mientras que la línea normal inmortalizada de queratinocitos orales humanos OKF6/TERT-2 fue gentilmente proporcionada por la Dra. Denisse Bravo (Facultad de Odontología de Universidad de Chile).

B- Métodos

Cultivo Celular

El manejo del cultivo celular de la línea de cáncer oral CAL 27, fue realizado en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar. Estas células se cultivaron en medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS), 100 UI/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina en una atmósfera de 37°C, 5% de CO₂ y con 95% de humedad.

La línea de queratinocitos orales, OKF6/TERT-2 también fue cultivada en condiciones de esterilidad bajo campana. Dicha línea se cultivó en medio Keratinocyte Serum Free Medium (KSFM; Invitrogen, cat. N° 17005-042), suplementado con extracto de pituitaria bovina (BPE) a 0,2 mg/mL, 0,2 η g/mL de factor de crecimiento epitelial humano (hEGF), CaCl₂ a una concentración final de 0,3 mM y, por último, se suplementó también con penicilina-estreptomicina a concentraciones de 100 UI/mL - 100 μ g/mL respectivamente.

Almacenamiento y Congelamiento

Las líneas celulares fueron congeladas, según las necesidades de la investigación, en sus respectivos medios suplementados y DMSO 10% V/V a -80 °C en viales criopreservación.

MTT: Ensayo de viabilidad celular

Esta técnica se fundamenta en la reducción metabólica del MTT que es realizada por enzimas oxidoreductasas mitocondriales y citosólicas capaces de metabolizar el MTT a su forma insoluble de color azul o cristales de formazán, permitiendo de esta forma determinar la viabilidad de las células tratadas ya que la cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas⁶⁴.

Para la realización de este ensayo se utilizaron ambas líneas celulares (CAL 27 y OKF6/TERT-2), se sembraron 1×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Las células luego se trataron con concentraciones crecientes (0,1 - 50 μM) de los compuestos en estudio a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). Una vez transcurrido este tiempo, el medio que contenía los compuestos se descartó y se lavó con PBS estéril dos veces para eliminar cualquier traza de los compuestos. Una vez eliminado el sobrenadante, los pellets fueron resuspendidos en MTT 0,5 mg/mL y se incubaron por dos horas para las CAL 27 y por cuatro horas para las OKF6/TERT-2 en un ambiente a 37°C y 5% CO_2 para permitir la metabolización y formación de los respectivos cristales. Al término de este tiempo se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se agregaron 30 μL de Tritón X-100 al 10% V/V en HCl 0,01 N (concentración final) para disolver los cristales. Finalmente, la placa fue leída espectrofotométricamente en un lector de microplacas a una longitud de onda de $\lambda = 570$ nm. Para evaluar la viabilidad celular, los resultados se expresaron como IC_{50} , obtenidos de la curva sigmoideal dosis-respuesta con pendiente variable mediante el software GraphPad Prism 5.0.

Determinación del consumo de oxígeno en células tumorales

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

Para cada medición se utilizaron $5 \cdot 10^6$ células intactas CAL 27 las que fueron traspasadas a una cámara de 0,6 mL termorregulada a 25°C . Para realizar cada medición las células fueron resuspendidas en 30 μL de PBS y adicionadas a la cámara, la cual contenía 570 μL de PBS; luego de esto se adicionó L-glutamina 8,3 mM como sustrato, oligomicina 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y los compuestos en estudio en concentraciones de 10, 20, 30 y 50 μM , respectivamente. Con el objeto de alcanzar el desacoplamiento

máximo de la fosforilación oxidativa se determinó el porcentaje de inhibición y/o aumento de la respiración celular comparando las mediciones con su respectivo control, el que corresponde a carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP) 0,5 μ M. Los resultados fueron expresados como la razón entre el OCR obtenido una vez adicionado el compuesto desacoplante y el OCR cuando la CTE se encuentra inhibida por oligomicina.

Ensayo de muerte celular por citometría de flujo: Incorporación de Ioduro de Propidio (PI)

Esta técnica se basa en la capacidad de ioduro de propidio (PI) de intercalarse en el ADN celular; en células normales este compuesto no es capaz de atravesar la membrana plasmática, pero sí esta membrana se daña, si es capaz de intercalarse⁶⁵. Por lo cual, este método nos permite verificar la integridad de la membrana celular para utilizarlo como indicador en la determinación de ATP celular.

El estudio se ejecutó en placas de 24 pocillos, en donde fueron sembradas $1 \cdot 10^5$ células de CAL 27 por pocillo en medio DMEM suplementado, las cuales fueron incubadas por 24 horas en una atmósfera humidificada (37°C y CO₂ al 5%). Luego se procedió a estimular las células por 4 horas, cambiando el medio de estos pocillos por uno nuevo que contenía las diluciones de los compuestos a ensayar (2,5, 5, 10 y 20 μ M). Posteriormente las células fueron lavadas, centrifugadas, los precipitados resuspendidos en PBS y tratados con ioduro de propidio (1 μ g/mL). La fluorescencia emitida se determinó a través de un citómetro de flujo FACS (FACSAria®III, BD Biosciences) midiendo a 488Ex /617Em nm. Se grabaron al menos 5000 eventos por cada muestra analizada.

Determinación de los niveles intracelulares de ATP

Los niveles de ATP se midieron según las especificaciones indicadas por el fabricante del kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, EE.UU.) con las siguientes modificaciones: Se sembraron

$1 \cdot 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos las cuales fueron incubadas por 24 horas a 37°C y CO_2 de 5%. Posterior a ello, las células fueron tratadas por 4 horas con los compuestos en estudio en concentraciones finales de 2,5, 5, 10 y 20 μM . A continuación, se retiró el medio de cada pocillo y las células precipitadas se lavaron con PBS. La medición de ATP se realizó agregando a las células 20 μL de PBS más 20 μL del kit. Luego 30 μL de cada pocillo fueron transferidos a una placa opaca y la concentración de ATP fue medida en un espectrofluorímetro lector de placas Varioskan® Flash (Thermo Scientific).

Estudio de formación de colonias

Para este ensayo, las células utilizadas fueron sembradas en placas de 6 pocillos en una concentración de 1×10^3 células por pocillo. Posteriormente, las placas se incubaron por 24 horas en una atmosfera a 37°C y 5% de CO_2 . Pasado este periodo, los pocillos fueron tratados con un rango de concentraciones finales de los compuestos en estudio que fluctuó entre 0,1 a 5 μM , durante 24 horas. Al acabar este tiempo, se procedió a lavar cada pocillo con PBS y renovar el medio de incubación por uno libre de compuestos, las células se incubaron nuevamente en las mismas condiciones anteriores durante 5 días. Al concluir esta última incubación, las colonias fueron tratadas con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol por 30 min. Luego se lavan con PBS y el número de colonias adheridas fue determinada mediante fotos que luego fueron analizadas mediante el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

Ensayos de migración celular

A- Ensayo de herida

Placas de 24 pocillos se sembraron con $1 \cdot 10^5$ células/pocillo e incubaron durante 36 horas en medio DMEM suplementado con FBS 10%. Posteriormente, se procedió a lavar cada pocillo con PBS y se realiza un corte el pellet de células decantadas usando una punta de micropipeta de 200 μL (herida). Luego, se lavaron nuevamente las células con PBS estéril y se agregaron los compuestos en estudio en concentraciones de 1, 2,5

y 5 μM disueltos en medio DMEM sin FBS. Como control positivo se utilizó DMEM suplementado con 10% de FBS y como control negativo se utilizó medio con 5-bromodeoxiuridina (BrdU) en una concentración final de 50 μM . Cada muestra fue fotografiada a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas y comparada con su propia herida registrada al comienzo del experimento.

B- Transwell

Durante este ensayo, $1 \cdot 10^5$ células de CAL 27 fueron puestas en los pocillos con filtros Transwell y se les agregó una solución que contenía los compuestos en estudio en volumen suficiente para alcanzar concentraciones finales de 1, 2,5 y 5 μM en medio DMEM sin FBS. Debajo del filtro se colocó medio DMEM suplementado con 10% de FBS y las placas se incubaron durante 16 horas en un ambiente a 37°C y CO₂ de 5%. Después de transcurrido este tiempo se removió el medio de los pocillos y se trataron las células que migraron con formaldehído al 3,7% por 5 min. Luego, se procedió a lavar cada pocillo Transwell con PBS y se agregó a las células una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol por 20 min. Por último, se removió el exceso de cristal violeta con PBS y se limpió la superficie interna del pocillo Transwell con varillas algodónadas estériles. Se tomaron las fotografías, el análisis y recuento de células fue calculado usando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

Expresión de marcadores de muerte celular por Western Blot (Casp-9 y PARP)

Para este estudio se incubaron $1 \cdot 10^6$ de células en placas por 24 h. Pasado este tiempo se procedió a incubar cada placa con una concentración 5 μM de los compuestos en estudio volviéndose a incubar por 24 para medir Caspasa-9 y 48 horas para PARP. A continuación, las células fueron lisadas con tampón RIPA que contenía un conjunto de inhibidores de proteasas-fosfatasa. Se tomaron 50 μg de las proteínas obtenidas y se separaron mediante SDS-PAGE. Las proteínas resueltas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa la cual se bloqueó por 1 h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada al 5% P/V en TBS 1X y 0,1% de Tween-20. Posteriormente se procedió a incubar la membrana con el respectivo anticuerpo

primario a 4°C durante 18 horas. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente. Después las membranas fueron lavadas y expuestas a reactivos quimioluminiscentes (ECL). Las señales fueron cuantificadas a través de densitometría de barrido láser.

Análisis del tipo de muerte celular inducida

El tipo de muerte celular inducida por los compuestos estudiados se estableció mediante las tinciones con Anexina V (AV) y Yoduro de propidio (PI) según instrucciones del fabricante de Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Abcam, Cambridge, R.U.), el cual permite diferenciar e identificar entre el tipo de muerte celular apoptótica y/o necrótica.

Para este ensayo se sembraron células de la línea CAL 27 en placas de 24 pocillos en una concentración de $1 \cdot 10^5$ células/pocillo y se incubaron por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo las células se estimularon con los compuestos en estudio en concentraciones finales de 2,5 y 5 μ M. Luego se incubaron, durante 48 horas. Transcurrido este periodo, las células fueron tratadas con tripzina, resuspendidas en 100 μ L de una solución de buffer 1X de “annexin V binding buffer” y AV al 0,1% y traspasadas a una placa de 96 pocillos. A continuación, las células fueron incubadas por 5 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz y se centrifugadas a 2000 rpm por 3 min. El sobrenadante se descartó y se añadió a cada pocillo 100 μ L de una solución de buffer 1X de “annexin V binding buffer” y PI al 0,1%. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo (FACS Aria®III, BD Biosciences). Las longitudes de onda empleadas en el análisis fueron, 488Ex/530Em nm para Anexina V FITC y 488Ex/617Em nm para PI, analizando 5.000 eventos por muestra. Los resultados se expresaron como apoptosis total (porcentaje de células Anexina-V+/PI- y Anexina-V+/PI+) y necrosis (porcentaje de células anexina-V-/PI+). El procesamiento de los datos se realizó a través del software Cyflogic (non-commercial version, CyFlo Ltd.)

Medición del cambio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante safranina

Safranina es un colorante catiónico lipófilo que se acumula en las mitocondrias de acuerdo a la diferencia de potencial de membrana negativo en el interior de las mitocondrias. En el curso de este proceso, la safranina sufre un cambio en la absorción y auto-extinción de su fluorescencia. Estos cambios espectrales se relacionan linealmente con el potencial de membrana mitocondrial, por esta razón es utilizada para medir $\Delta\Psi_m$ ocasionada por los compuestos desacoplantes⁶⁶.

La evaluación del potencial se efectuó mediante la medición de fluorescencia a tiempo real. Para ello, se utilizaron 7×10^6 células CAL 27. Esta medición se ejecutó en un espectrofluorímetro JASCO FP-6200. Previamente a esto, se incubaron durante 5 min con glutamato y malato, ambos a una concentración 4 mM, safranina 5 μM y digitonina 8 $\mu\text{g/mL}$ (concentraciones finales). Luego se inició la medición de la fluorescencia de las mezclas durante 200 segundos a 37°C en el espectrofluorómetro, utilizando como blanco PBS. Al cabo de este periodo, las mezclas fueron tratadas con concentraciones finales de 5, 10 y 20 μM de los compuestos a estudiar. Luego la emisión fue registrada a 485Ex/586Em nm durante 800 segundos. Paralelamente, una de las mezclas fue tratada con CCCP 0,5 μM , esta medición tiene por objetivo medir la pérdida del potencial de membrana, el cual es utilizado como control. Las longitudes de onda utilizadas fueron excitación/emisión 485/586 nm. Los resultados fueron expresados en UFR (Unidades de Fluorescencia Relativa) vs tiempo (seg) y graficados con el programa Origin Graph

Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm desviación estándar (SD). Los análisis y las comparaciones entre los distintos grupos experimentales *versus* el control se realizaron utilizando análisis de ANOVA de una o dos vías empleando post-test Ad-hoc mediante software GraphPad Prism 5.0. Se estableció como nivel de significancia un $p < 0,05$. Los valores obtenidos en los ensayos de viabilidad celular por MTT fueron calculados mediante la curva dosis-respuesta ajustada a una curva no lineal.

V. RESULTADOS

A. Efecto citotóxico y antiproliferativo de los compuestos en estudio sobre las líneas celulares CAL 27 y OKF6/TERT-2.

Para determinar la potencia y selectividad de los compuestos en estudio se realizó un análisis de citotoxicidad mediante el ensayo MTT tanto en células tumorales CAL 27 como en células normales OKF6/TERT-2 a tiempos de 24, 48 y 72 h.

En la Figura 8 se observan los gráficos semilogarítmicos a partir de los cuales se calcularon los valores de IC_{50} . Estos valores se muestran en la Tabla 1. En ella se observa que el IC_{50} de todos los compuestos que poseen el grupo trifenilfosfonio (TPP^+) unido a una cadena saturada de diez carbonos, presentan actividad antiproliferativa en células CAL 27 superior a la apreciada en células OKF6/TERT-2, por tanto, su IC_{50} es menor. Aunque, al contrastar los datos obtenidos entre células tumorales vs. células normales se aprecia que los IC_{50} se encuentran en el mismo orden de magnitud.

Con objetivos comparativos se probaron en células CAL 27 dos compuestos que no presentan el grupo trifenilfosfonio (Benz C_{10} : Benzoato de decilo; 2,5-diOH C_{10} : 2,5-dihidroxibenzoato de decilo). La observación de estos datos muestra que los compuestos que no contienen el grupo TTP^+ presentan un IC_{50} de alrededor los 250 μM , en cambio los compuestos que si presentan dicho grupo, poseen un IC_{50} que bordea los 2,5 μM . Por ende, la actividad antiproliferativa de los compuestos sin TTP^+ fue 100 veces menor a la de aquellos que poseen dicho grupo, en consecuencia, su IC_{50} fue mayor.

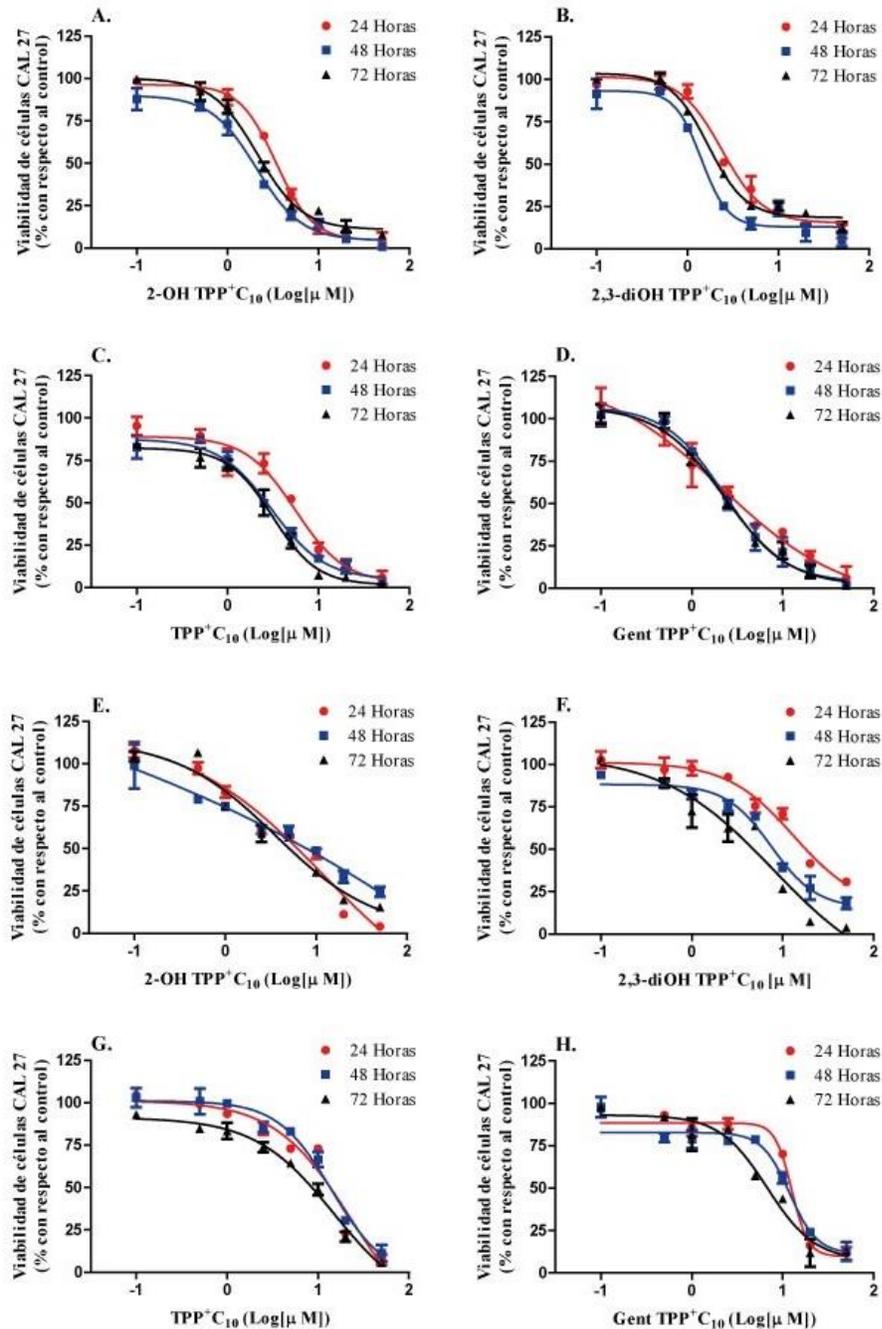


Figura 8. Efecto citotóxico de los cationes lipofílicos sobre células de la cavidad oral. Representación gráfica del efecto sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de concentración de los distintos compuestos (0,1-50 μM), durante periodos de 24,48 y 72 horas ensayados en células CAL 27: (A) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (C) TPP⁺ C₁₀, (D) Gent TPP⁺ C₁₀ y en células OKF6/TERT-2 (E) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (F) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (G) TPP⁺ C₁₀, (H) Gent TPP⁺ C₁₀. Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SD.

Es posible apreciar una baja dependencia temporal en la actividad de todos los compuestos. El 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ fue aquel que presentó un IC₅₀ menor en ambas líneas celulares, siendo a las 48 h 1,59 μM para CAL 27 y 7,48 para OKF6/TERT-2. En contraposición a este tenemos el TPP⁺ C₁₀ que presenta un IC₅₀ mayor, 3,58 μM para CAL 27 y 13,55 para OKF6/TERT-2. Cabe destacar que el IC₅₀ del compuesto Gent TPP⁺ C₁₀ no presenta variaciones con respecto al tiempo en la línea tumoral, bordeando los 2,25 μM. Pero si presenta una disminución en el IC₅₀ a las 72 horas en la línea de células epiteliales normales de la cavidad bucal, cayendo de 13,26 a 6,64 μM.

A.

Compuestos	IC ₅₀ ± SD [μM]		
	24 horas	48 horas	72 horas
2-OH TPP ⁺ C ₁₀	3.43 ± 0,024	2.41 ± 0,040	2.12 ± 0,026
2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀	2.61 ± 0,027	1.59 ± 0,039	1.65 ± 0,044
TPP ⁺ C ₁₀	5.52 ± 0,013	3.58 ± 0,015	3.28 ± 0,024
Gent TPP ⁺ C ₁₀	2.66 ± 0,011	2.24 ± 0,042	2.25 ± 0,037
Benz C ₁₀	350.2 ± 0,6	243.7 ± 1,1	254.4 ± 1,5
2,5-diOH C ₁₀	315,1 ± 0,6	253,9 ± 3,3	267,1 ± 3,4

B.

Compuestos	IC ₅₀ ± SD [μM]		
	24 horas	48 horas	72 horas
2-OH TPP ⁺ C ₁₀	16,74 ± 0,15	12,71 ± 0,23	3,15 ± 0,033
2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀	7,03 ± 0,13	7,48 ± 0,036	11,71 ± 0,30
TPP ⁺ C ₁₀	15,51 ± 0,33	13,55 ± 0,18	12,24 ± 0,29
Gent TPP ⁺ C ₁₀	13,56 ± 0,39	13,26 ± 0,41	6,64 ± 0,26

Tabla 1. IC₅₀ obtenidos por MTT en células escamosas de carcinoma oral y queratinocitos del epitelio bucal. Efecto citotóxico en los diferentes tiempos (24, 48 y 72 hora). Los IC₅₀ de los compuestos en estudio, fueron obtenidos a través de MTT en, células CAL 27 (A) y en OKF6/TERT-2 (B). Los resultados representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SD.

Luego, para comparar los efectos sobre la viabilidad en todo el rango de concentraciones evaluadas, se generó una gráfica comparativa (Figura 9), al tiempo de 48 horas, entre la actividad de los compuestos sobre las células CAL 27 y los queratinocitos orales. Dado que la viabilidad de las células puede ser utilizada como un índice de selectividad de los compuestos en estudio, se realizó una Tabla comparativa a partir de los datos obtenidos de los IC₅₀ (Tabla 2).

Los resultados de la Figura 9 muestran, que a diferencia de lo que ocurre al observar solamente los valores de IC₅₀, todos los compuestos, a excepción del Gent TPP⁺ C₁₀, presentan un grado de selectividad, la que es dependiente de la concentración. Se puede apreciar que tanto 2-OH TPP⁺ C₁₀, como 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ inician su actividad selectiva tras superar la concentración de 2.5 μM, sin embargo, 2-OH TPP⁺ C₁₀ mantiene su actividad dependiente de la concentración en todas las concentraciones probadas. Mientras que 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ sólo muestra una selectividad estadísticamente significativa hasta los 50 μM. En cambio, TPP⁺ C₁₀, presenta un amplio rango de selectividad, desde la menor concentración hasta el 50 μM donde se pierde esta selectividad.

Los resultados de la Tabla 2 exponen que el compuesto más característico corresponde a 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, pues este a las 72 horas de tratamiento presenta un índice de selectividad de 7.10, lo que quiere decir, que es aproximadamente 7 veces menos activo en células normales al compararlas con las células tumorales.

Compuestos	Índice de Selectividad ± SD		
	24 horas	48 horas	72 horas
2-OH TPP ⁺ C ₁₀	4,88 ± 0,087	5,27 ± 0,14	1,49 ± 0,030
2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀	2,69 ± 0,020	4,7 ± 0,038	7,10 ± 0,17
TPP ⁺ C ₁₀	2,81 ± 0,17	3,79 ± 0,098	3.73 ± 0,16
Gent TPP ⁺ C ₁₀	5,10 ± 0,20	5,92 ± 0,23	2,95 ± 0,15

Tabla 2: Índice de selectividad de los compuestos. Los datos de la tabla representan el cociente entre IC₅₀ de células normales/ IC₅₀ células tumorales. Los IC₅₀ utilizados corresponden a los obtenidos en la Tabla 1 Los resultados representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SD.

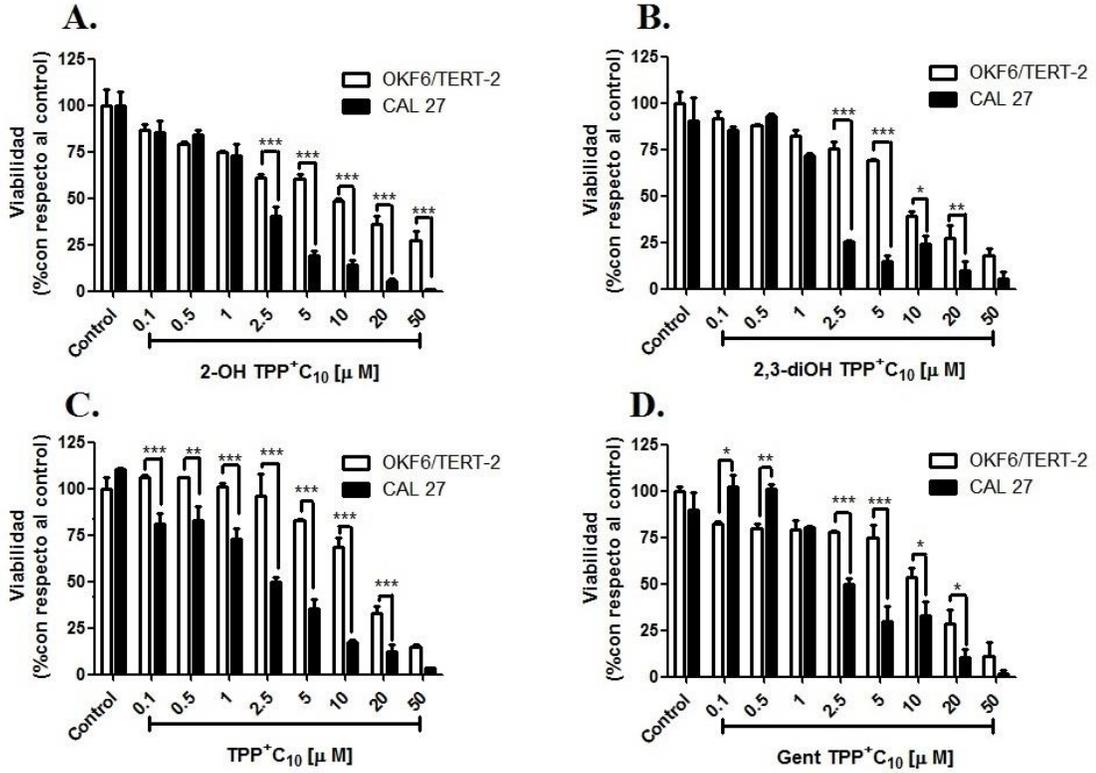


Figura 9. Selectividad de los compuestos en estudio sobre células CAL 27 en comparación a la línea de epitelio oral OKF6/TERT-2. Gráficos de viabilidad celular mediante MTT a un tiempo de 48 horas con respecto al control versus concentración de los compuestos (A) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (C) TPP⁺ C₁₀, (D) Gent TPP⁺ C₁₀. En las líneas celulares CAL 27 y comparativamente OKF6/TERT-2, incluyendo en cada caso un control referencial correspondiente a las respectivas líneas células cultivadas en medio al 1% de DMSO. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SD. * = p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001 con respecto al control.

B. Acción de los cationes lipofílicos sobre la cadena transportadora de electrones en las células tumorales.

Con el propósito de identificar la acción de los cationes lipofílicos sobre la cadena transportadora de electrones (CTE) en las células tumorales orales, se realizó un estudio determinando la respiración celular mediante un proceso polarográfico.

Los resultados se muestran en la Figura 10. El consumo de oxígeno por parte de las células CAL27 disminuye al adicionar oligomicina y aumenta en presencia de un reactivo desacoplante en función de la concentración. Así mismo, fue posible apreciar que todos los compuestos se comportaron como desacoplantes, cuyo efecto sobre el consumo de oxígeno fue también concentración dependiente. Cada compuesto muestra una relación concentración/consumo de oxígeno distinto a los otros.

Además de esto, es posible apreciar que los compuestos 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ y Gent TPP⁺ C₁₀ a las concentraciones 30 y 50 μM provocaron el mayor efecto desacoplante reflejado en un mayor consumo de oxígeno. Cabe destacar que no hubo una diferencia en el efecto desacoplante entre los dos rangos de concentración mencionados. Además, el efecto desacoplante de estos compuestos fue similar al obtenido en presencia de CCCP, utilizado como control.

Otra observación es que el 2-OH TPP⁺ C₁₀ no presentó variaciones en el consumo de oxígeno hasta los 50 μM, lo que quiere decir que, a las concentraciones de 10, 20 y 30 μM el efecto desacoplante es el mismo. Por otra parte, el TPP⁺ C₁₀ fue el compuesto que presentó un menor consumo de oxígeno, por lo tanto, un menor efecto desacoplante.

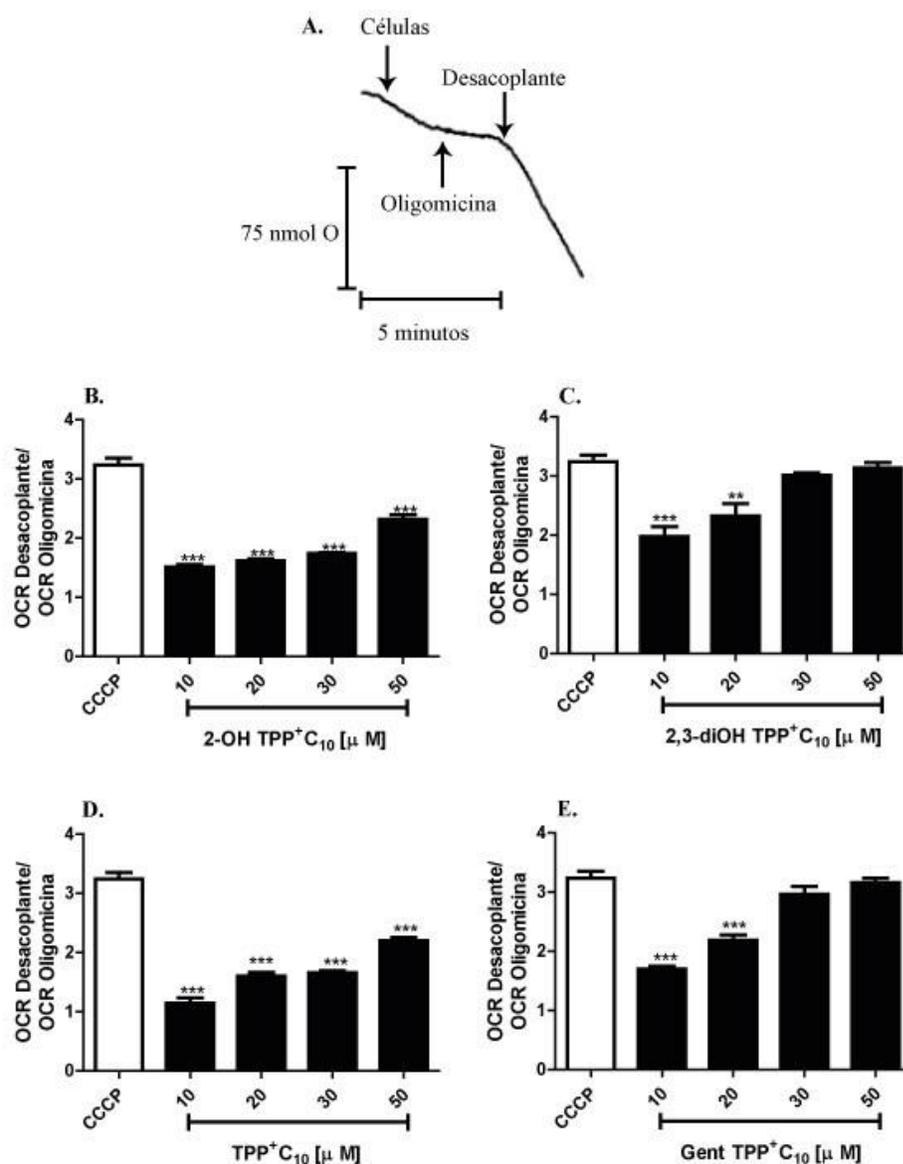


Figura 10. Efecto de los derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la respiración de células CAL 27. (A) Representación del consumo de oxígeno dependiente del tiempo generada por Windaq Acquisition Waveform Recorder en células CAL 27 donde se adicionó Oligomicina y posteriormente un agente desacoplante. Adicionalmente se presentan las gráficas individuales en parámetros de tasa de consumo de oxígeno del desacoplante/tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células con oligomicina versus las concentraciones utilizadas de los distintos compuestos en estudio (B) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (C) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (D) TPP⁺ C₁₀, (E) Gent TPP⁺ C₁₀. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SD. ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

C. Disminución del potencial de transmembrana generada por los compuestos derivados de ácidos polihidroxi-benzoicos.

En complemento al análisis de consumo de oxígeno se realizó un estudio de medición del cambio de potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante la fluorescencia de safranina como indicador del potencial de membrana y digitonina como elemento de permeabilización de la misma.

El efecto sobre el potencial de transmembrana se muestra en la Figura 11. En ella se observa que todos los compuestos ensayados disminuyeron el potencial de transmembrana de una forma concentración dependiente, lo cual está en directa relación con la actividad desacoplante de la fosforilación oxidativa. Es posible apreciar en la Tabla 3 que el compuesto 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ fue el que presentó la mayor dependencia con respecto a su concentración, pues las pendientes en las 3 concentraciones estudiadas son las que presentan las mayores diferencias (de 0,18; 0,81 y 2,25 para las concentraciones de 5, 10 y 20 μ M, respectivamente). Por otro lado, Gent TPP⁺ C₁₀, manifiesta una menor dependencia en este parámetro, ya que sus pendientes no presenta mucha diferencia entre ellas.

Todos los compuestos presentaron una menor eficacia a la concentración de 5 μ M. Este menor efecto fue evidenciado claramente por el derivado TTP⁺C₁₀, ya que esta menor eficacia fue similar a las tres concentraciones estudiadas, 5, 10 y 20 μ M

Adicional a lo anterior es posible evidenciar que por un lado existe una menor eficacia por parte del compuesto TPP⁺ C₁₀ quien es además el compuesto que presentan una menor dependencia de su concentración, mientras que por otro lado se observa una nula diferencia en la actividad del efecto desacoplante y su consecuente pérdida de potencial de transmembrana entre las concentraciones 5 y 10 μ M por parte del compuesto Gent TPP⁺ C₁₀.

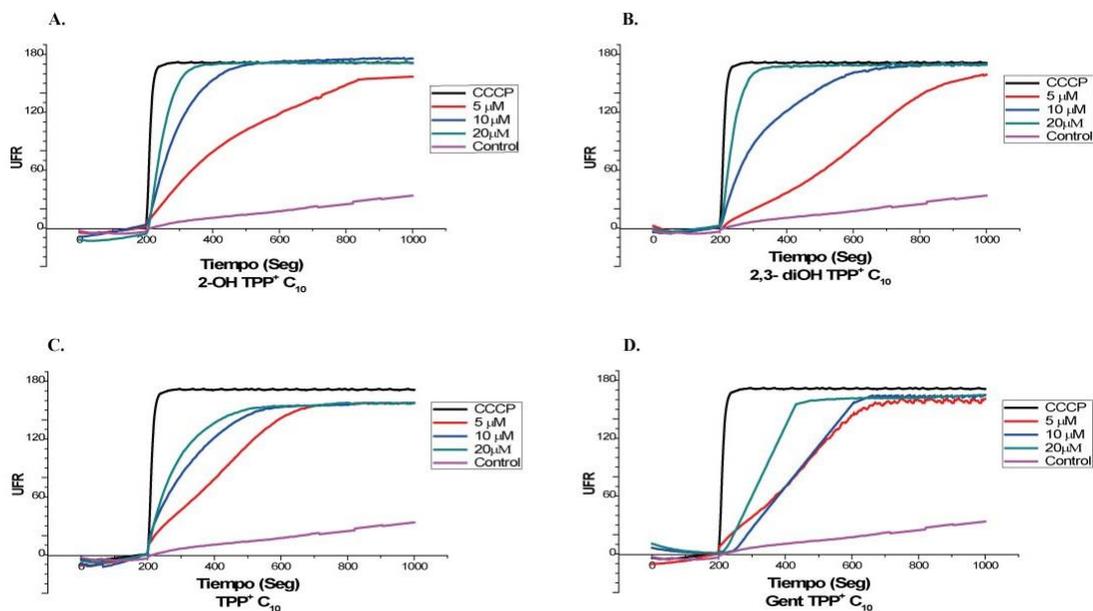


Figura 11. Efecto de los cationes lipofílicos sobre el potencial de transmembrana mitocondrial. Gráficos de Unidad de fluorescencia relativa (UFR) versus tiempo de las distintas concentraciones de cada compuesto (5,10,15 μM) (A) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (C) TPP⁺ C₁₀, (D) Gent TPP⁺ C₁₀. Se utilizó CCCP como control positivo, que representa el máximo de desacoplamiento, y una suspensión celular tratada con DMSO (Control) como control negativo, representando el no desacoplamiento. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes.

Compuestos	Pendiente ($\Delta\text{UFR} / \Delta\text{s}$)		
	5 μM	10 μM	20 μM
2-OH TPP ⁺ C ₁₀	0.40	0.97	1.86
2,3-diOH TPP ⁺ C ₁₀	0.18	0.81	2.25
TPP ⁺ C ₁₀	0.33	0.39	0.61
Gent TPP ⁺ C ₁₀	0.45	0.46	0.72

Tabla 3: Cambio de Unidades de Fluorescencia Relativa (UFR) por segundo. Tabla que representa las pendientes de las gráficas de UFR vs Tiempo en segundos de los distintos compuestos en las diferentes concentraciones estudiadas.

D. Efecto de los derivados del ácido polihidroxi-benzoico sobre el contenido de ATP en células CAL 27.

El efecto de estos derivados sobre el contenido de ATP en células CAL 27 se muestran en la Figura 12. En presencia de estos derivados, los niveles de ATP disminuyen de una forma concentración dependiente. El compuesto 2-OH TPP⁺ C₁₀ presentó la caída más significativa de ATP en todas las concentraciones ensayadas, pero particularmente a la concentración de 30 μM, donde provocó una disminución superior a la producida por el control. La disminución total de la concentración de ATP alcanzada en presencia de este compuesto fue 72,7%, la cual presentó un porcentaje 28,2% mayor a la del control (oligomicina 1 mg/mL) y que es ampliamente superior a la disminución producida por los otros compuestos (alrededor del 50%).

Por su parte los compuestos 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, y Gent TPP⁺ C₁₀ presentaron como característica una disminución significativa de los niveles de ATP sólo una vez superada la concentración 10 μM, mientras que, el compuesto TPP⁺ C₁₀ lo hizo una vez superada la concentración 20 μM, siendo además, el compuesto que presenta una menor relación de dependencia entre la disminución de ATP y su concentración

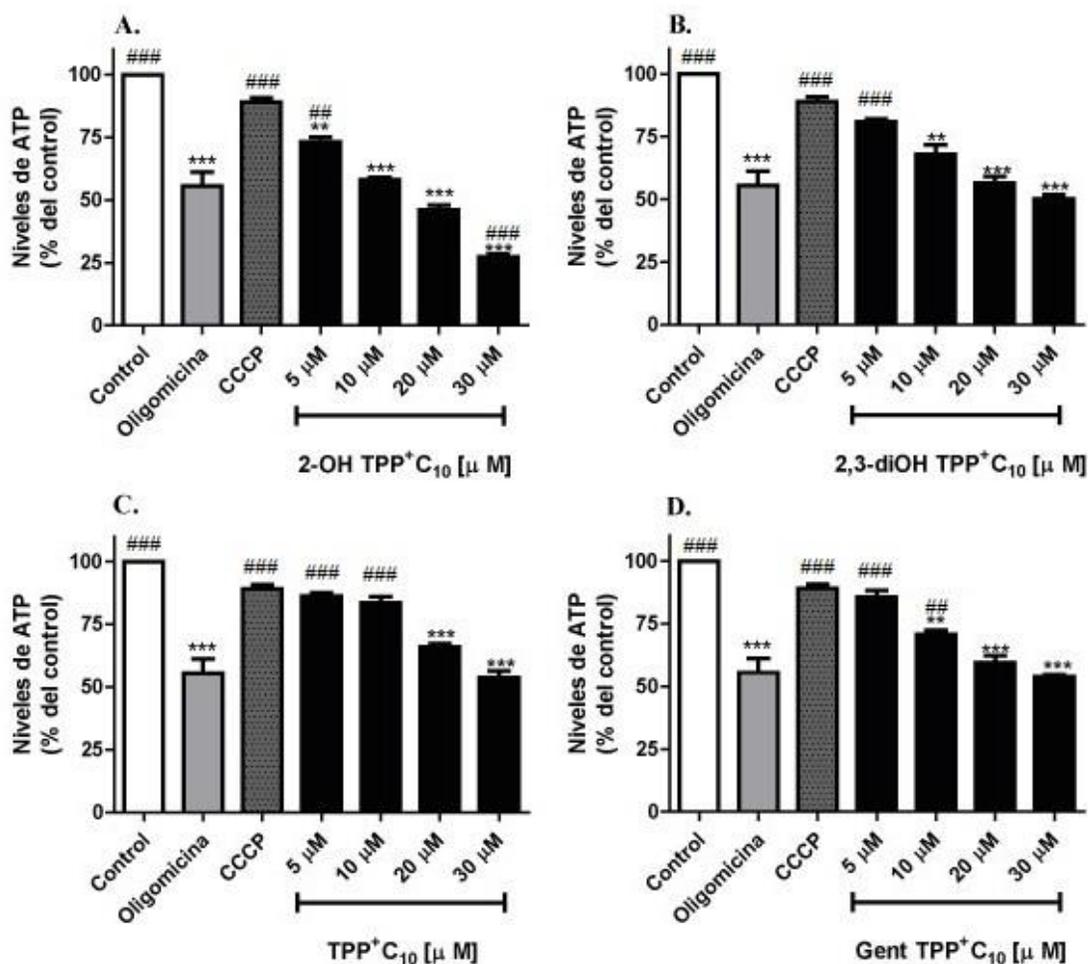


Figura 12. Efecto de los compuestos sobre el contenido de ATP celular. Representación de las variaciones de los niveles de ATP (porcentaje con respecto al control) en función de las distintas concentraciones de los compuestos en estudio (A) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (C) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (D) Gent 2-OH TPP⁺ C₁₀. El grupo Control corresponde a células cultivadas en medio DMEM al 1% de DMSO durante 4 horas, oligomicina (1 mg/mL) como indicador de los niveles de ATP no dependientes de la ATP Sintasa y CCCP (1 μM) como desacoplante. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SD. ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001 con respecto al control. ## = p ≤ 0,01; ### = p ≤ 0,001 con respecto a oligomicina.

Paralelamente, como control se realizaron ensayos de muerte celular por citometría de flujo, utilizando para ello la incorporación de Ioduro de Propidio (PI) como indicador de la integridad de la membrana plasmática, pues este tiene la capacidad de unirse al ADN sólo si la membrana plasmática pierde su integridad. Esto nos sirvió para establecer la tasa de mortalidad celular y así poder determinar óptimamente el nivel de ATP.

Estos resultados se muestran en la Figura 13. Acá se observa que las células tratadas no presentaron diferencias en su viabilidad con respecto a las células no tratadas, es decir, que no se presentan diferencias significativas con respecto al grupo control. Por lo tanto, la caída de ATP observada, no corresponde a una disminución representativa de la muerte de las células tumorales.

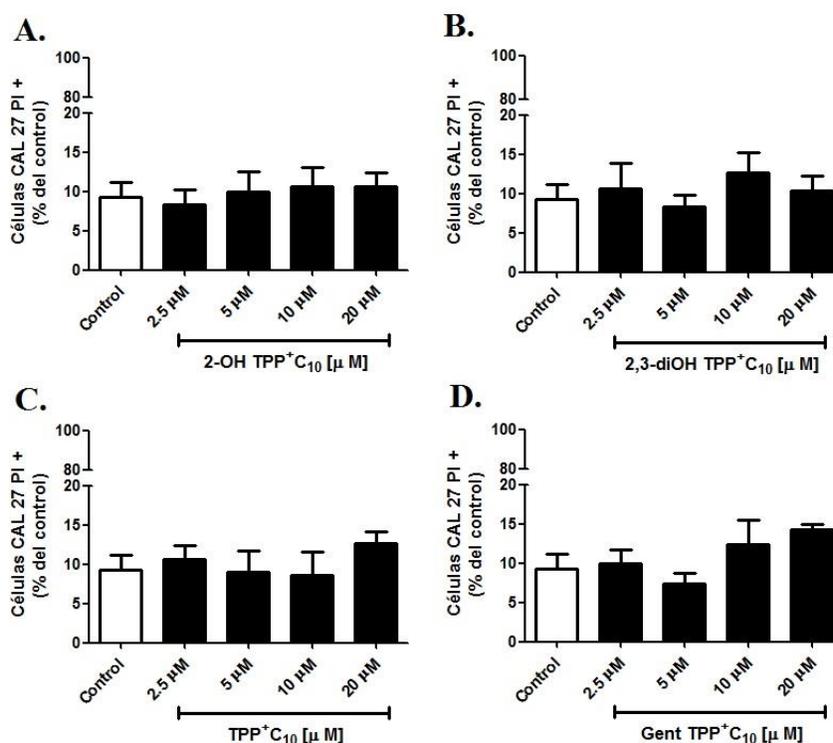


Figura 13. Viabilidad celular medida por medio de la incorporación de Ioduro de Propidio. Gráficos representativos de los resultados obtenidos en parámetros de Células CAL 27 con PI⁺ respecto al control versus concentraciones crecientes (2,5 - 20 μM) de los distintos compuestos (A) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (C) TPP⁺ C₁₀, (D) Gent TPP⁺ C₁₀. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm SD.

E. Influencia de los compuestos derivados de alquilhidroxibenzoatos sobre la formación de colonias.

Con el propósito de identificar el efecto de los compuestos derivados de alquilhidroxi-benzoatos utilizados en este estudio sobre la proliferación celular se realizó un ensayo de formación de colonias en una población de 1×10^3 células de la línea celular CAL 27 (Ver métodos)

Como se observa en la Figura 14, todos los compuestos ensayados mostraron un efecto sobre la clonogenicidad celular.

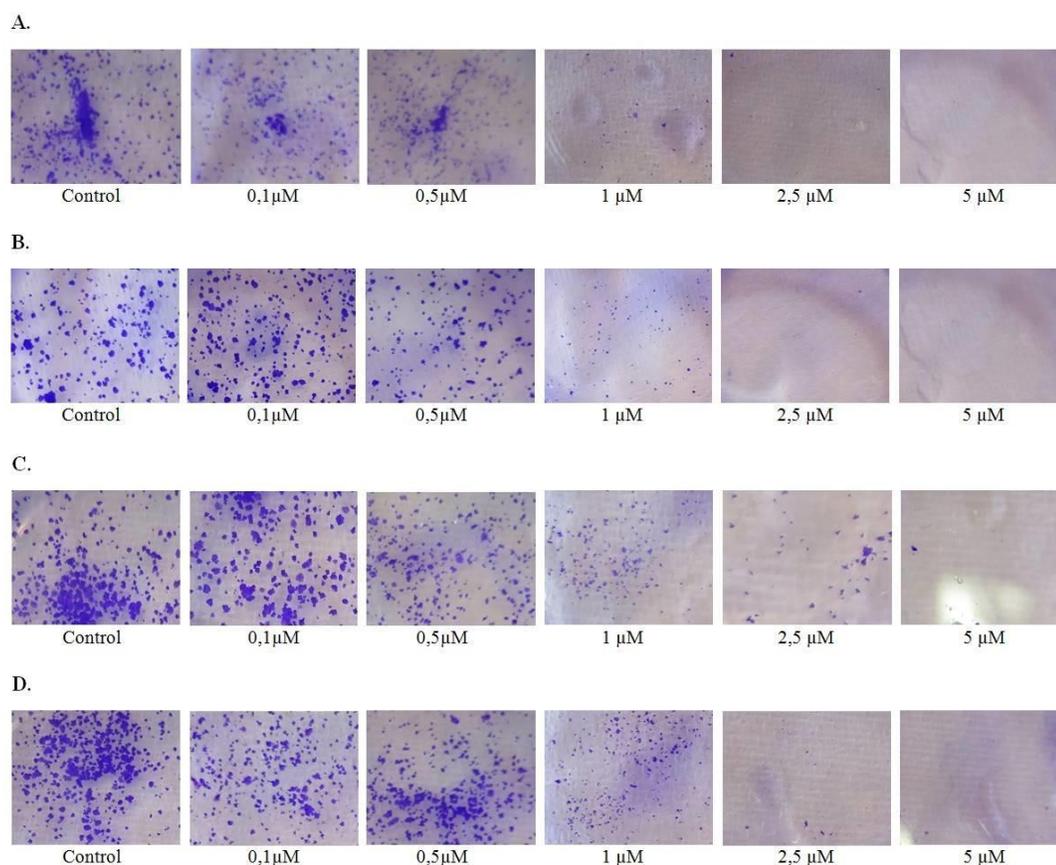


Figura 14. Inhibición de la clonogenicidad causada por los cationes lipofílicos deslocalizados. Tabulación de fotografías obtenidas mediante ensayo de colonia de los distintos compuestos en estudio (A) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (C) TPP⁺ C₁₀, (D) Gent TPP⁺ C₁₀. Ordenadas de izquierda a derecha según concentraciones crecientes (0,1 – 5 μ M) . Incluyendo en cada caso el grupo Control correspondiente a células cultivadas en medio con DMSO.

Para cuantificar mejor los resultados obtenidos en la figura anterior, se construyeron representaciones graficas que se muestran en la Figura 15. El compuesto 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ provocó una disminución significativa de la proliferación celular a todas las concentraciones ensayadas; sin embargo, no se observó variaciones en el efecto en el intervalo de concentraciones entre 0,1 y 0,5 μM. Los otros compuestos manifestaron este efecto a partir de la concentración de 0,5 μM.

Sumado a lo anterior se observó que a la concentración 2,5 μM, concentración equivalente al IC₅₀ en la mayoría de los compuestos según lo obtenido en los experimentos de viabilidad celular (Tabla 1); se observó una caída abrupta en la capacidad de las células de proliferar, es decir, en la capacidad de formar colonias.

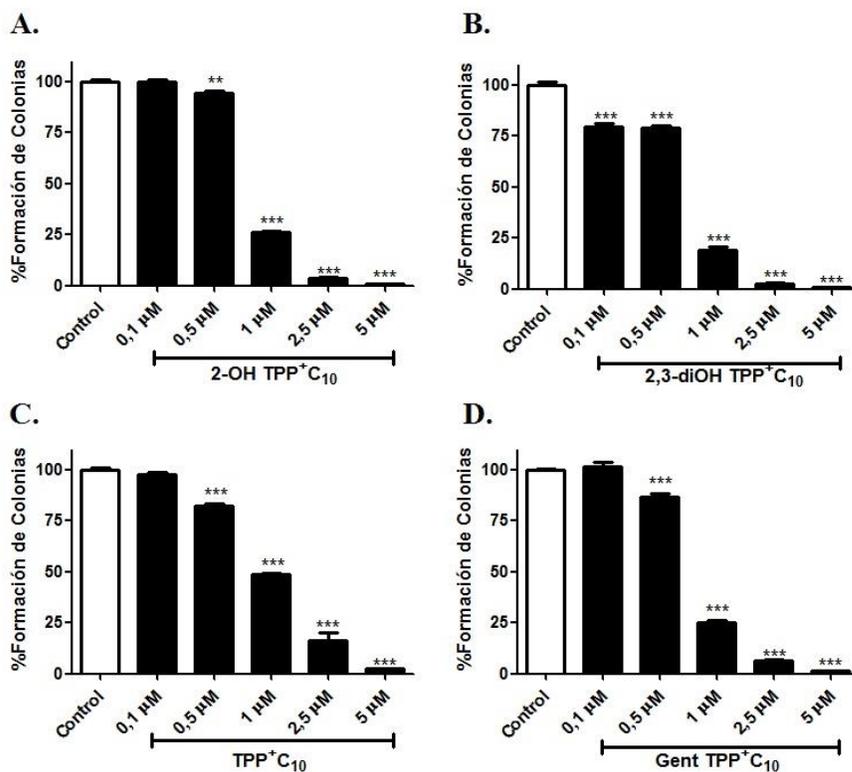


Figura 15. Efecto de los derivados de ácido polihidroxi-benzoicos sobre la capacidad clonogénica en células CAL 27. Representación gráfica de los resultados obtenidos graficados como porcentajes de formación de colonias versus las concentraciones (0.1 a 5 μM) de los distintos compuestos en estudio (A) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (C) TPP⁺ C₁₀, (D) Gent TPP⁺ C₁₀. Incluyendo en cada caso el grupo Control correspondiente a células cultivadas en DMSO. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SD. ** p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001 con respecto al control.

F. Efecto de los compuestos estudiados sobre la migración de las células tumorales metastásicas CAL 27.

Con el propósito de verificar la migración de las células tumorales en metástasis se realizó un ensayo de herida según las especificaciones indicadas en Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. Mediante este estudio se observó que todos los compuestos ensayados inhibieron la migración celular.

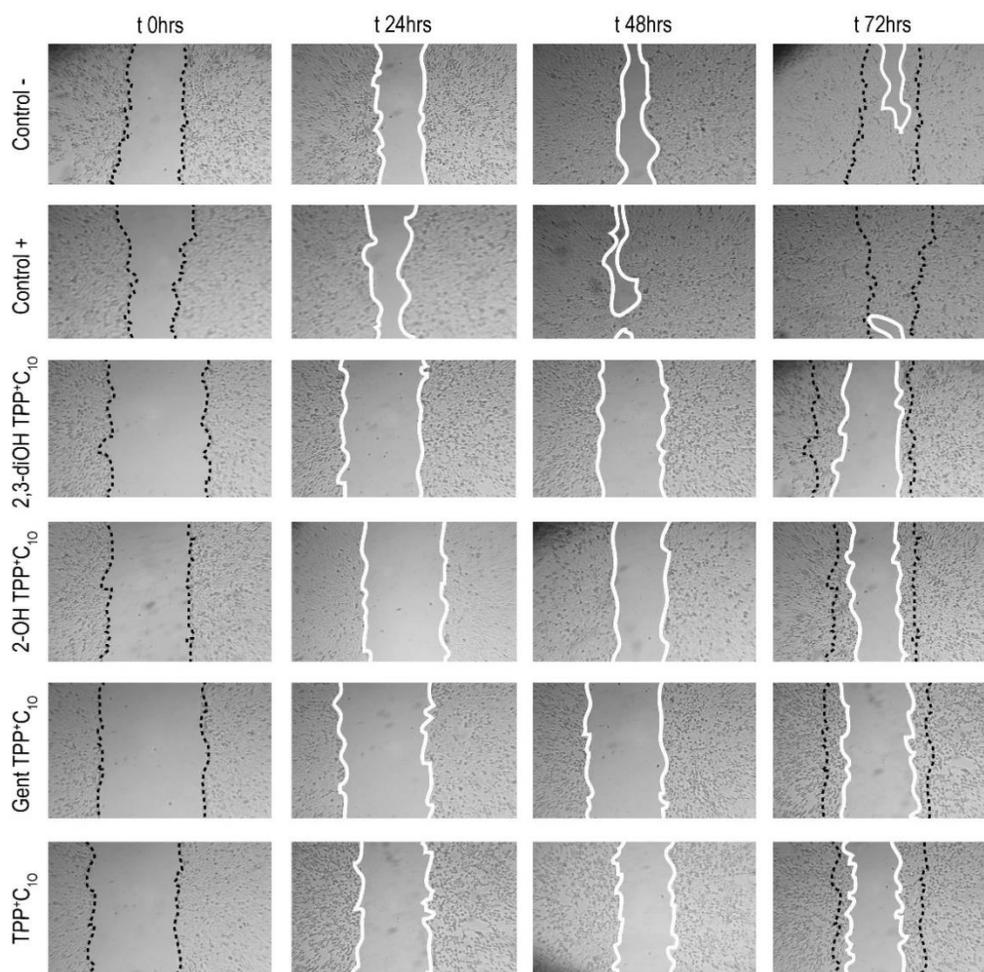


Figura 16. Inhibición del cierre de la herida por los derivados de ácido polihidroxibenzoicos. Fotografías representativas obtenidas en el ensayo de herida en células CAL 27 ordenadas de forma horizontal según transcurso de tiempo y vertical según los distintos compuestos en estudio. Como Control negativo se utilizó células cultivadas al 0.5% de DMSO y 5 μ M de BrdU en DMEM sin FBS y como Control positivo células sembradas en medio DMEM suplementado al 10% con FBS. Las líneas negras corresponden a la herida a tiempo cero, que es utilizada como control; las líneas blancas representan el cierre de la herida.

Además, se realizó un estudio de migración utilizando placas Transwell para evaluar la migración de células CAL 27 tratadas con los compuestos en estudio en concentraciones de 1, 2,5 y 5 μM .

Los resultados graficados en la Figura 17 muestran una relación inversa entre la migración y la concentración de los compuestos utilizados, por otro lado, todos los compuestos muestran la capacidad de disminuir la migración celular en todas las concentraciones estudiadas a excepción de Gent TPP⁺ C₁₀ que presenta una disminución apreciable tras superar la concentración de 2.5 μM . Al comparar los demás compuestos, se aprecia que 2-OH TPP⁺ C₁₀, 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ y TPP⁺ C₁₀ presentan el mismo porcentaje de migración a 1 y 2.5 μM (80% y 50%, respectivamente) Por último, a concentración de 5 μM se observan diferencias, pues la migración en 2-OH TPP⁺ C₁₀ y TPP⁺ C₁₀ corresponde a un 50% mientras que en 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ es un 38,6%.

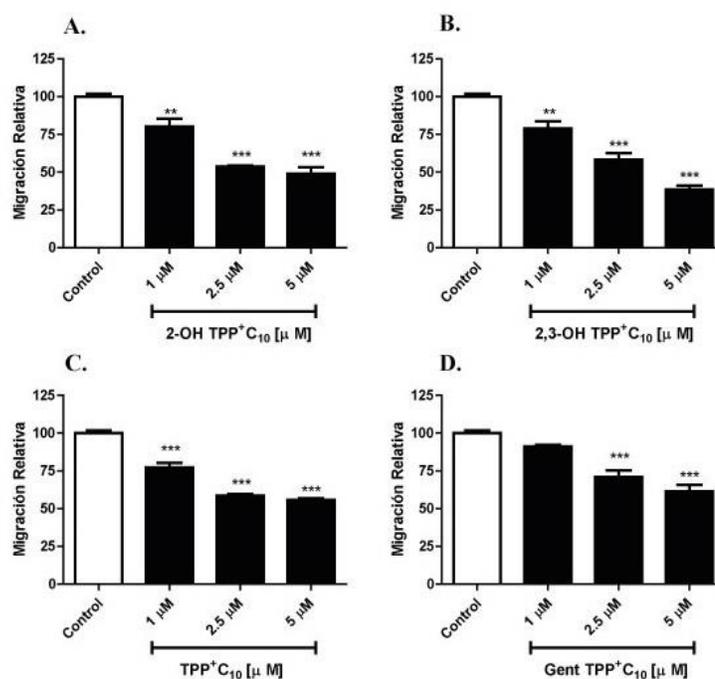


Figura 17. Efecto de los cationes lipofílicos sobre la migración de células CAL 27. Gráficos de los resultados obtenidos por medio de estudio Transwell en parámetros de migración relativa con respecto al control versus concentraciones ascendientes de los distintos compuestos en estudio (A) 2-OH TPP⁺ C₁₀, (B) 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, (C) TPP⁺ C₁₀, (D) Gent TPP⁺ C₁₀. El grupo control se realizó utilizando células tumorales encubadas con medio al 0.5% de DMSO. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm SD. ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

G. Tipo de muerte celular inducida por los compuestos alquilhidroxi-benzoatos-TPP⁺ en células tumorales de cáncer oral.

Los resultados de la influencia de los compuestos alquilhidroxibenzoatos-TPP⁺ sobre la muerte celular se muestran en las Figuras 18 y 19 C. En ellas se observan que todos los compuestos en estudio provocaron una disminución del número de células vivas, la cual, fue similar a todas las concentraciones de los compuestos ensayadas, provocando una caída en las células vivas de un 42%.

Es posible observar una predominancia apoptótica tanto temprana como tardía provocada por todos los compuestos en estudio en comparación con el control (Figura 18 y 19A). Esta diferencia fue similar a las dos concentraciones de los compuestos ensayadas: 2,5 y 5 μ M, llegando a un porcentaje de apoptosis total que rodea el 60%, es decir, que al tratar las células CAL 27 con los cationes lipofílicos en estudio por 48 horas a concentraciones cercanas al IC₅₀ se favorece los marcadores de tipo apoptótico.

Cabe destacar que no se observó un aumento o disminución significativo del punto de vista fisiológico de la necrosis con ninguno de los compuestos, pues no existen diferencias con el control. Siendo la necrosis total, no mayor al 7,5% en ninguna concentración ensayada. Aunque, los compuestos 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ y Gent TPP⁺ C₁₀ manifestaron una actividad levemente mayor ($p \leq 0,05$) a la concentración de 5 μ M.

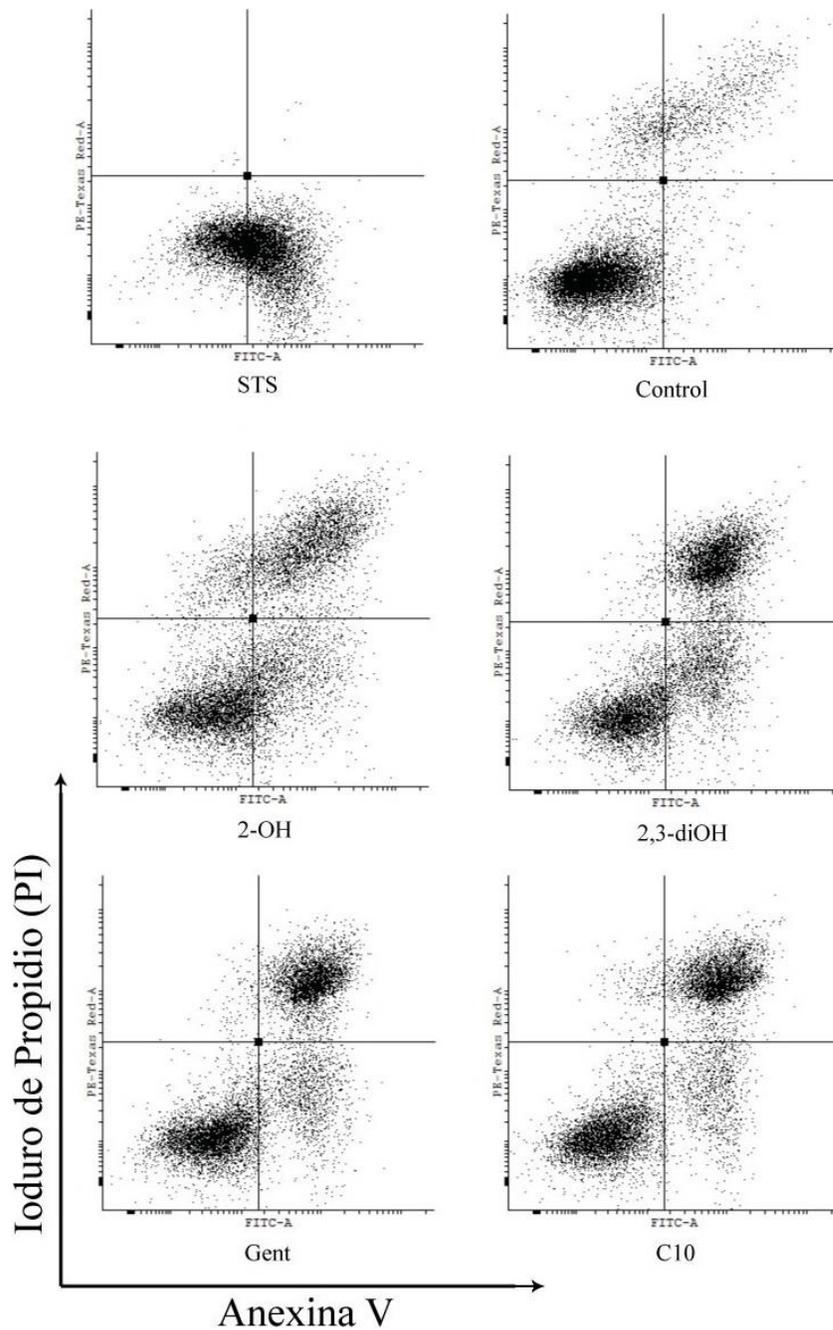


Figura 18. Diagrama de ensayo Anexina V / PI. Gráficos realizados con el programa Cyflogic, en parámetros de Ioduro de Propidio (PI) versus Anexina V, de cada uno de los compuestos en estudio a una concentración de 2,5 μ M. Incluyendo además las respectivas gráficas de STS (control positivo) y Control (control negativo) correspondiente a células cultivadas en medio DMEM al 1% de DMSO.

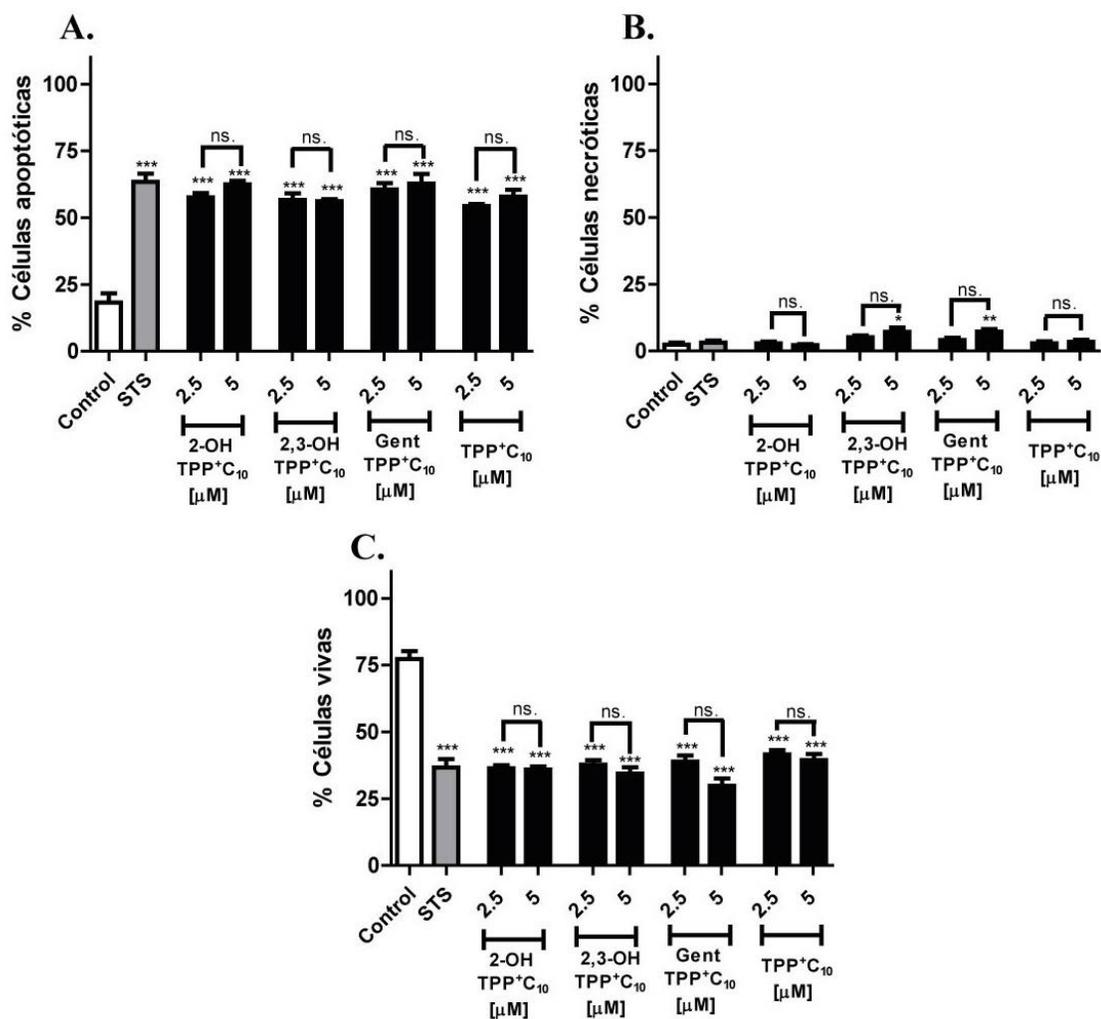


Figura 19. Efecto de los compuestos en estudio sobre marcadores de muerte celular. Porcentajes obtenidos de (A) células apoptóticas, (B) células necróticas y (C) Células vivas, todos versus las distintas concentraciones de los compuestos en estudio. Incluyendo además las respectivas representaciones de STS (control positivo), Control (control negativo) correspondiente a células cultivadas en medio con DMSO. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm SD. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

H. Activación de los marcadores de muerte celular producida por los cationes lipofílicos deslocalizados.

Para cuantificar las proteínas características de la muerte celular por apoptosis en la línea celular CAL 27 se ejecutaron estudios Western Blot midiendo específicamente la activación de Caspasa-9 y la escisión de PARP.

Los resultados obtenidos para Caspasa 9 se muestran en la figura 20. Los compuestos ensayados activaron la Caspasa 9 ($p \leq 0,05$). Siendo ligeramente superior los resultados alcanzados por 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ ($p \leq 0,01$)

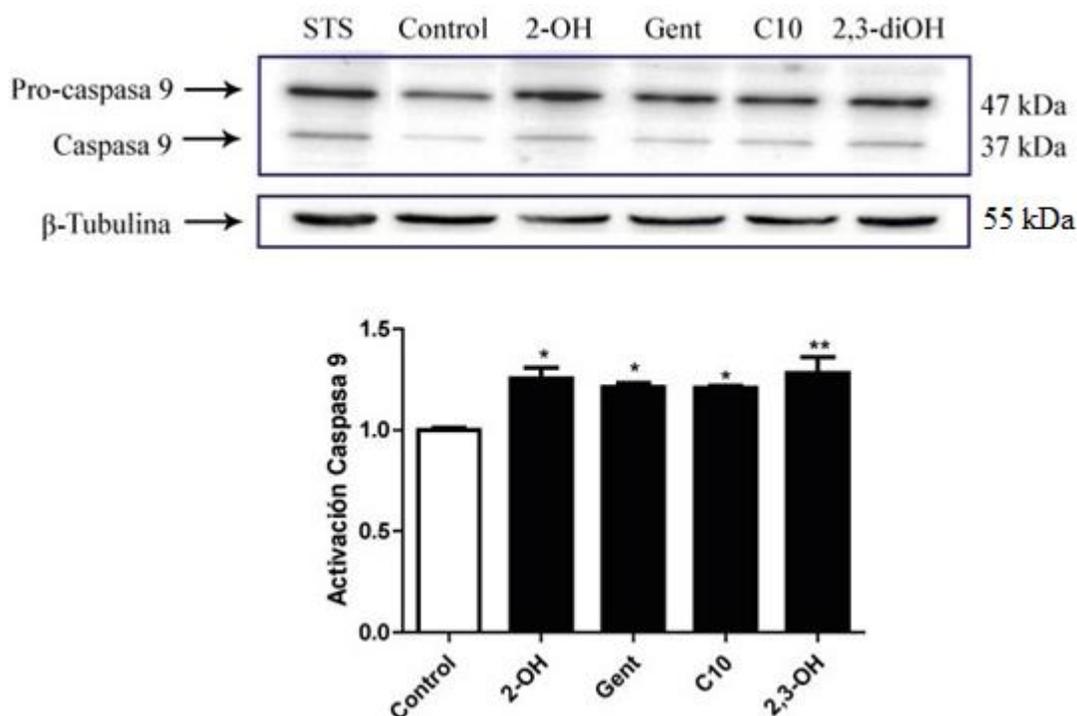


Figura 20. Activación de Caspasa-9. (A) Foto obtenida mediante Western Blot, de modo que se aprecia en las filas, de superior a inferior, la pro-caspasa 9; caspasa 9, ambas con sus respectivos pesos moleculares, y β -tubulina como control de carga. Mientras que en las columnas se muestra de izquierda a derecha STS (control positivo), Control (control negativo) correspondiente a células cultivadas en medio DMEM al 0,5% de DMSO y los distintos compuestos utilizados todos a una concentración de 5 μ M. (B) representación gráfica de los resultados obtenidos en parámetros de activación de caspasa 9 con respecto al control y los respectivos compuestos a una concentración de 5 μ M cada uno. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm SD. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ con respecto al control.

Asimismo, todos los compuestos mostraron una escisión de PARP a las 48 horas de tratamiento con los derivados estudiados (Figura 21). Siendo 2-OH TPP⁺ C₁₀ ($p \leq 0,01$) y 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ ($p \leq 0,001$) los compuestos que presentaron los efectos más significativos.

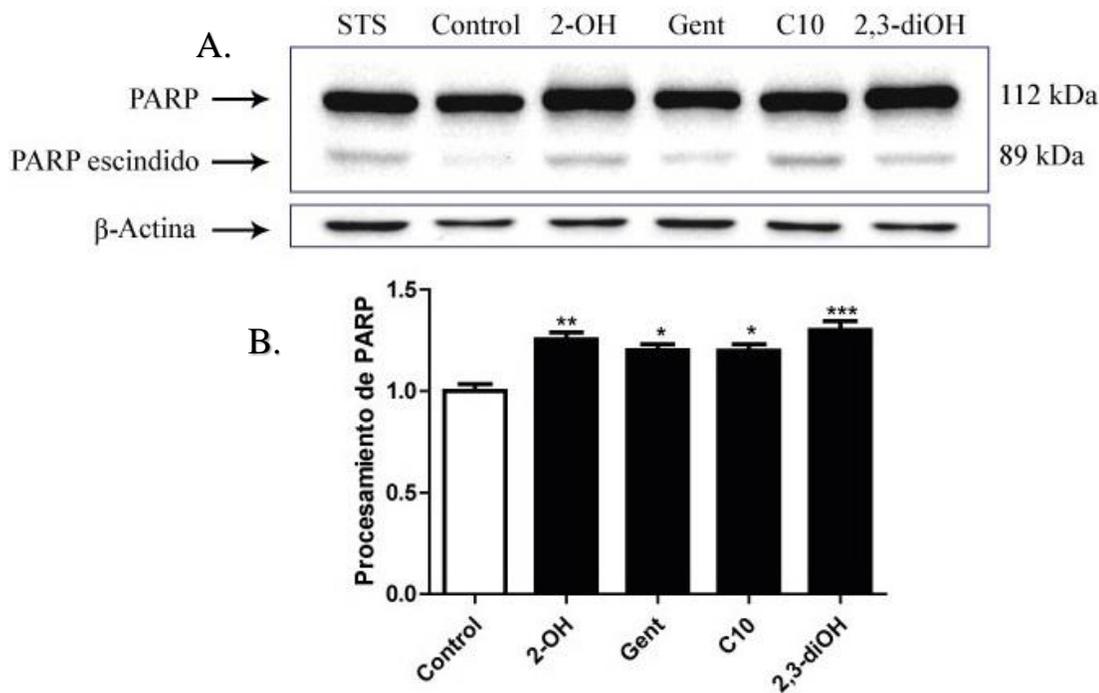


Figura 21. Fraccionamiento de PARP. (A) Foto obtenida mediante Western Blot, de modo que se aprecia en las filas, de superior a inferior, PARP, proteína procesada y escindida de PARP, ambas con sus respectivos pesos moleculares, y β-Actina a modo de control de carga. En las columnas se muestra de izquierda a derecha STS (control positivo), Control (control negativo) correspondiente a células cultivadas en medio DMEM con DMSO y los distintos compuestos utilizados todos a una concentración de 5 μM. (B) representación gráfica de los resultados obtenidos en parámetros de procesamiento de PARP versus el control y los respectivos compuestos a una concentración de 5 μM cada uno. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± SD. * = $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

VI. DISCUSIÓN

Estudios realizados con compuestos derivados de ácidos polihidroxi-benzoicos y ésteres de ácido gálico han mostrado una marcada actividad citotóxica necesaria para inhibir la proliferación de células tumorales^{45,47,50}. En el presente estudio, todos los cationes lipofílicos deslocalizados analizados, mostraron una clara actividad citotóxica en células de carcinoma espinocelular (Figura 8), de forma concordante con la bibliografía descrita. Por este motivo, es que postulamos que estas moléculas y sus derivados serían fuertes candidatos para originar nuevas terapias contra el cáncer oral.

En relación a los análisis de los valores de IC_{50} obtenidos de los experimentos de viabilidad celular para las líneas CAL 27 y OKF6/TERT-2 (Tabla 1) se observó una leve selectividad por parte de todos los compuestos, dado que los IC_{50} para las células tumorales y normales se encuentran en el mismo orden de magnitud. Aunque al comparar la selectividad a las 48 horas (Figura 9) se observó que a ciertas concentraciones existe mayor selectividad; evidencia de esto es que, a concentración de 2,5 μM , valores cercanos al IC_{50} (Tabla 1) para todos los compuestos, presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,001$) en la viabilidad de las células normales en comparación con las tumorales.

Cabe señalar además que los IC_{50} disminuyen a medida que se aumenta el tiempo de tratamiento. Esto demuestra que la actividad ejercida por los derivados alquilhidroxi-benzoatos estudiados presentan una acción citotóxica, y no citostática, indicando que la actividad de estos compuestos está dirigida hacia la mortalidad celular y no a la inhibición de su crecimiento.

Cabe agregar que los IC_{50} obtenidos al tratar las células CAL 27 con los compuestos con estructura similar a los compuestos ensayados, pero sin el grupo trifenilfosfonio, fueron significativamente mayores (aprox. IC_{50} 100 veces mayor) en comparación con los compuestos que sí poseían dicho grupo (Tabla 1A). De esto se deduce que estas dos moléculas que corresponden a benzoato de decilo y

2,5-dihidroxibenzoato de decilo tienen una actividad citotóxica significativamente menor. Con este resultado se denota la importancia que tiene el trifenilfosfonio en la citotoxicidad de los derivados en estudio, ya que este es el encargado de dirigir la molécula a la mitocondria que es lugar donde el compuesto ejerce su acción (tropismo mitocondrial)⁶⁷.

Cabe señalar que el compuesto 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ presentó la mayor potencia citotóxica, ya que mostró un aumento en la inhibición de la proliferación de las células tumorales (Tabla 1) y también, el que presentó el mayor índice de selectividad al tiempo de 72h, pues este compuesto es 7 veces menos activo en células normales en comparación con células tumorales (Tabla 2). Por otra parte, el compuesto TPP⁺ C₁₀ presentó un grado de citotoxicidad levemente menor al resto de los compuestos. Los rangos de concentración en que varían los niveles de potencia y selectividad son particularmente estrechos, por lo que esto si bien, es un aspecto que no se debe pasar por alto, tampoco representa un conflicto particularmente preocupante, pero se hace necesario realizar ensayos de toxicidad en otras líneas celulares no tumorales y en animales de experimentación.

Al observar la figura 9, con respecto a la selectividad, quizás el comportamiento más llamativo es el de Gent TPP⁺ C₁₀. Esto se debe, a que, a diferencia de los otros compuestos, en las concentraciones iniciales presenta una selectividad desfavorable, eliminando preferentemente a las células normales hasta la concentración de 1 μM, donde su actividad se iguala sin preferencias. Finalmente, superada esta concentración muestra selectividad favorable dependiente de la concentración hasta alcanzar la de 20 μM donde tras la cual se ve disminuida esta actividad

Cabe destacar que los compuestos ensayados se comportaron como desacoplantes de la cadena transportadora de electrones (Figura 10). El mecanismo por el cual actúan los desacoplantes clásicos es por la cesión de protones a la matriz mitocondrial, pues estos compuestos son protonóforos. Lo que quiere decir que, por sus características estructurales como ácidos débiles y lipofílicos ellos son capaces de sortear membranas

lipídicas, capturar protones del espacio intermembrana para transferirlos a la matriz mitocondrial, actuando como lanzaderas entre estos espacios celulares⁶⁸. Todos los compuestos en estudio desencadenaron un aumento en el consumo de oxígeno, comportándose de manera similar y ejerciendo, de este modo, un efecto desacoplante sobre las células de carcinoma oral CAL 27; esta actividad resultó ser concentración dependiente y causada por las características del núcleo farmacóforo. Los compuestos 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ y Gent TPP⁺ C₁₀ (a concentraciones mayores de 30 μM) fueron los que ejercieron la acción desacoplante mayor, semejante a la originada por CCCP.

Para determinar el mecanismo por el cual los compuestos inducen la muerte celular, se ensayaron estudios de pérdida de potencial de transmembrana mitocondrial, por medio de Safranina O, de acuerdo a lo descrito en métodos.

La consecuencia inmediata de este efecto desacoplante es la pérdida de potencial de transmembrana. Todos los compuestos disminuyeron el potencial de transmembrana de las células tumorales (Figura 11). Más aún, esta disminución fue directamente proporcional a la concentración de los derivados. Este efecto sería el principal gatillante de la disminución del contenido de ATP en las células tratadas y, además, sería el responsable de desencadenar el proceso de muerte celular, debido a que la síntesis de este nucleótido depende del potencial de transmembrana mitocondrial. En estas condiciones, la célula no tendría suficiente ATP para solventar el gasto metabólico y energético necesario para mantener una alta tasa de replicación, elemento propio de las células cancerosas.

Para asegurar que el efecto sobre el ATP se debía sólo a la acción de los compuestos y no por causa de una permeabilización de la membrana plasmática, previo al estudio de cuantificación de ATP se realizó un ensayo de muerte celular mediante la incorporación de Ioduro de Propidio (PI) (Figura 13). Estos experimentos mostraron que los compuestos en estudio no afectaban la integridad, ni la funcionalidad de la membrana plasmática, descartando de esta forma una caída de ATP por esta vía.

La disminución en los niveles de ATP sería la causa del aumento en la mortalidad celular, pues esta disminución se relaciona directamente con la potencia como agentes

citotóxicos de los compuestos estudiados. Considerando esta información podríamos clasificar el estudio de ATP como el de mayor relevancia en esta investigación pues es el efecto sobre esta variable lo que define a estos compuestos como elementos de uso oncológico.

En este mismo contexto se observó que el compuesto 2-OH TPP⁺ C₁₀ fue el único que presentó una disminución considerable de ATP en todas las concentraciones probadas, por lo tanto, es posible decir que este sería el compuesto con mayor actividad citotóxica y consecuentemente, el que presenta una mayor potencia sobre la citotoxicidad. Además, estos compuestos tienen la capacidad, no sólo de provocar un efecto desacoplante, sino que a través de la disminución de ATP, podría por ejemplo activar AMP quinasa o alterar el funcionamiento de Adenilato quinasa y contribuir al efecto de muerte celular. Respecto a esto debemos recordar que estas quinastas son responsables de la homeostasis celular y por ello de la regulación de los niveles de ATP en casos donde la célula se encuentra en condiciones de estrés energético, por lo cual es posible suponer que los otros compuestos utilizados no mostraron la reducción de la concentración de ATP que manifestó 2-OH TPP⁺ C₁₀, debido a un efecto compensatorio de estas enzimas.

Una vez establecida la citotoxicidad se realizó un ensayo de clonogenicidad (Figura 14 y 15) con el propósito de verificar el efecto de los compuestos en la proliferación de células tumorales. Los resultados respecto a esto fueron bastante positivos, ya que establecieron un importante efecto en la disminución de la formación de colonias en el valor de IC₅₀ en todos los compuestos.

Más aún, en los ensayos de migración llevados a cabo por medio de ensayos de herida y estudio Transwell (Figura 16 y 17), todos los compuestos inhibieron la migración sobre cultivos de células CAL 27 de una forma concentración dependiente, a todas las concentraciones probadas a excepción de Gent TPP⁺ C₁₀ que mostró una actividad apreciable sólo después de superar la concentración 2,5 µM. Esto implica que los compuestos en estudio podrían tener la capacidad de impedir que se inicie el proceso de migración que favorecería la metástasis y evitarían de esta forma que los

daños producto de la aparición de células tumorales se expandan a distintas zonas del cuerpo. Esta característica es particularmente importante, ya que la mortalidad de este tipo de cáncer se debe a complicaciones producto de las ramificaciones tumorales⁶⁹.

Es interesante destacar que nuestros resultados mostraron que la mortalidad celular provocado por nuestros compuestos en estudio era producto de la activación del proceso de apoptosis y no de necrosis. En este sentido, el análisis de muerte celular a través de citometría de flujo (Figura 18 y 19) permitió diferenciar la población de células que se encontraba en apoptosis temprana, tardía o necrosis. El resultado más importante al respecto de esto es que sólo un porcentaje menor de las células presentó muerte mediante necrosis, mientras que la mayoría de ellas mostró un aumento en la externalización de fosfatidilserina junto a la aparición de fluorescencia causada por la intercalación del PI en la doble hebra de ADN, ambas características propias de la muerte celular por apoptosis tardía.

Al observar que el mal funcionamiento mitocondrial inducido por los compuestos ensayados desencadena mayoritariamente una muerte celular por apoptosis. No obstante, para respaldar esta afirmación se ejecutó, de forma complementaria, un ensayo Western Blot para cuantificar proteínas apoptóticas (Caspasa 9 Y PARP) (Figuras 20 y 21). Siendo Caspasa 9 una proteína iniciadora del proceso de apoptosis y PARP una conocida familia de proteínas reparadoras de ADN que se ve modificada río abajo del proceso apoptótico, los resultados demostraron que se inicia el proceso apoptótico en consecuencia de una activación de Caspasa 9 resultado de la acción de los compuestos en estudio. Complementario a esto se observó a PARP escindido, lo que da a entender que el proceso apoptótico no sólo se inicia, sino que se lleva completamente a cabo.

VII. CONCLUSIÓN

Los cationes lipofílicos deslocalizados derivados de ácidos polihidroxi-benzoicos utilizados en este estudio (2-OH TPP⁺ C₁₀, 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀, TPP⁺ C₁₀, y Gent TPP⁺ C₁₀.) representaron un sin número de interrogantes que se han logrado responder, en su mayoría, a través de la presente investigación. Antes de todo, comprobamos que existe un grado de selectividad por parte de nuestros compuestos, que si bien no es particularmente alto implica cierta capacidad de diferenciar las células normales de aquellas tumorales y sobre estas ejercer su acción. Como se mencionó repetidamente, el compuesto 2,3-diOH TPP⁺ C₁₀ presenta un mayor grado de potencia, pero manifiesta un menor grado de selectividad en las diferentes concentraciones probadas con excepción de 2,5 μM a las 48 horas donde se aprecia selectividad. En cambio, TPP⁺ C₁₀ presenta un menor grado de potencia, pero la mayor selectividad en el rango de concentraciones probadas.

La citotoxicidad mostrada es producto del efecto desacoplante y de la pérdida de potencial de membrana, ambas consecuencia de la acción de nuestros compuestos y su capacidad de secuestrar protones del espacio intermembrana y dirigirlos a la matriz mitocondrial. Este efecto desemboca en una disminución de ATP, como se demostró en los estudios realizados. La disminución del ATP es una estrategia viable para el diseño de moléculas para uso oncológico, pues altera tanto la proliferación, como la metástasis y puede llegar a desencadenar la muerte celular. Respecto a esto, nuestros compuestos mostraron resultados muy satisfactorios, pues como se ha mencionado con anterioridad todos los compuestos presentaron la capacidad de disminuir la concentración de ATP. Siendo particularmente potente el compuesto 2-OH TPP⁺ C₁₀, convirtiéndolo en candidato para estudios futuros. En este sentido, en el presente estudio queda pendiente la determinación del efecto producido por estos compuestos sobre la actividad de las enzimas quinasas (Adenilato quinasa y AMP quinasa) responsables del restablecimiento de ATP en estados energéticamente desfavorables de la célula.

En este trabajo se pudo determinar que todos los compuestos pueden disminuir la capacidad clonogénica de las células CAL 27 al impedir su proliferación, por lo cual, se esperaría que estos compuestos tuvieran la capacidad de detener el crecimiento tumoral. Además de esto, el ensayo de herida sumado a los resultados del estudio Transwell demostraron concluyentemente que las células sometidas a estos compuestos pierden la capacidad de migrar de un espacio a otro, lo que se traduciría ayudaría a impedir la metástasis de este tipo de cáncer, lo cual es uno de los resultados más promisorios y significativos obtenidos, pues la alta tasa de mortalidad observada en el cáncer oral se debe principalmente a la invasión del cáncer a tejidos adyacentes.

Finalmente, se observó mediante los resultados obtenidos por citometría de flujo que la muerte de las células cancerígenas es producto de apoptosis y no de necrosis. En este aspecto nuestros compuestos demostraron una importante actividad, abriendo la posibilidad, no sólo de detener el crecimiento y expansión por parte de un tumor, sino que también de la eliminación de las células tumorales.

Todo lo mencionado manifiesta la importancia de la acción de estos compuestos, pues el cáncer oral tiene características poco favorables, como ser resistente al cisplatino que es el tratamiento antineoplásico más utilizado en esta patología. Es decir, que el tratamiento estándar resulta poco efectivo en la mayoría de los casos, por tanto, estos derivados del ácido polihidroxi-benzoico representan una nueva ventana terapéutica, que no sólo es alucinada, sino que, por sobre todo, es necesaria.

Por lo tanto, una de las conclusiones que podemos establecer después de analizar y discutir los resultados obtenidos, es la clara candidatura de estos compuestos a estudios *in vivo*, que esperamos muestren resultados igual de satisfactorios y establezcan un paso más en el camino a la victoria en la batalla contra esta compleja y mortal patología.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández A, Córdova P, Badenier O, Esguep A. Epidemiological characterization of oral cancer. Literature review. *J Oral Res.* 2015;4(2):137-145. doi:10.17126/joralres.2015.027.
2. Yokota J, Sugimura T. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J.* 1993;7(10):920-925. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8344488>. Accessed March 14, 2016.
3. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993;7(3):139-146. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8489711>. Accessed March 14, 2016.
4. Ferbeyre Binelfa L, Salinas García JC. Cancer: molecular and genetic basis. *Gac Mex Oncol.* 2005;4(2):42-47.
5. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res Mutat Res.* 2003;544(2):99-106. doi:10.1016/j.mrrev.2003.06.024.
6. Trédaniel J, Zalcman G, Douriez E. Genes and enzymes involved in the metabolism of carcinogens. *Bull Cancer.* 1995;82 Suppl 2:77s-84s. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7626862>. Accessed March 14, 2016.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
9. Itriago Laura SNC. Epidemiology of cancer in Chile and worldwide: present and future. *Rev Médica Clínica CONDES.* 2013;24(4):531-552.
10. Instituto Nacional de Estadísticas. *Estadísticas Vitales, Anuario 2014.* Santiago de Chile; 2014.
11. Wu C-P, V. Ambudkar S. The pharmacological impact of ATP-binding cassette drug transporters on vemurafenib-based therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2014;4(2):105-111. doi:10.1016/j.apsb.2013.12.001.

12. Lehninger AL. *Principios de Bioquímica*. Vol 5a. ed. Barcelona: Omega; 2009.
13. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-707. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.
14. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metab*. 2013;18(2):153-161. doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017.
15. Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA. Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers. *J Nucl Med*. 2008;49(Suppl_2):24S-42S. doi:10.2967/jnumed.107.047258.
16. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies ☆. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2010;1797(6-7):1225-1230. doi:10.1016/j.bbabbio.2010.03.025.
17. Batra S, Adekola KUA, Rosen ST, Shanmugam M. Cancer metabolism as a therapeutic target. *Oncology (Williston Park)*. 2013;27(5):460-467. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25184270>. Accessed March 14, 2016.
18. Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited. *BMC Syst Biol*. 2010;4:58. doi:10.1186/1752-0509-4-58.
19. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007;274(6):1393-1418. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.
20. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):180-192. doi:10.1038/nrc2344.
21. Tsai HJ, Wilson JE. Functional Organization of Mammalian Hexokinases: Both N- and C-Terminal Halves of the Rat Type II Isozyme Possess Catalytic Sites. *Arch Biochem Biophys*. 1996;329(1):17-23. doi:10.1006/abbi.1996.0186.
22. Pedersen PL. 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):123-126. doi:10.1007/s10863-008-9165-7.

23. Mathupala SP, Colen CB, Parajuli P, Sloan AE. Lactate and malignant tumors: A therapeutic target at the end stage of glycolysis. *J Bioenerg Biomembr.* 2007;39(1):73-77. doi:10.1007/s10863-006-9062-x.
24. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2004;447(5):619-628. doi:10.1007/s00424-003-1067-2.
25. Gatenby RA, Gawlinski ET. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res.* 2003;63(14):3847-3854. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873971>. Accessed March 14, 2016.
26. Podar K, Anderson KC. A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways. *Cell Cycle.* 2010;9(9):1722-1728. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404562>. Accessed March 17, 2016.
27. Wong K-K, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2010;20(1):87-90. doi:10.1016/j.gde.2009.11.002.
28. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 2000;103(2):253-262. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057898>. Accessed March 17, 2016.
29. JARA SANDOVAL JA. SINTESIS DE CATIONES TRIFENILFOSFONIO DERIVADOS DE ESTERES DE ACIDO GALICO Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD CITOTOXICA. *Repos Digit Com Nac Investig Cienc y Tecnol - CONICYT-Chile.* 2012.
30. Puzio-Kuter AM. The Role of p53 in Metabolic Regulation. *Genes Cancer.* 2011;2(4):385-391. doi:10.1177/1947601911409738.
31. Rossignol R. Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Res.* 2004;64(3):985-993. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-1101.

32. De Paepe B. Mitochondrial Markers for Cancer: Relevance to Diagnosis, Therapy, and Prognosis and General Understanding of Malignant Disease Mechanisms. *ISRN Pathol.* 2012;2012:1-15. doi:10.5402/2012/217162.
33. Chen LB. Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4(1):155-181. doi:10.1146/annurev.cb.04.110188.001103.
34. García García V, González-Moles M, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral: Revisión bibliográfica. *Av Odontoestomatol.* 2005;21(6):287-295.
35. Binelfa LF, Salinas García JC. Bases genéticas y moleculares del cáncer/ 1a. parte. 2005:42-47. <http://oncocentercancun.com/wp-content/uploads/2011/10/bases-genet-y-molec-del-cancer-1ra-parte4.pdf>. Accessed March 18, 2016.
36. Haplo L, Strasser A, Cory S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(5):1081-1087. doi:10.1242/jcs.090514.
37. Barbosa IA, Machado NG, Skildum AJ, Scott PM, Oliveira PJ. Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: Potential for new therapies. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2012;1826(1):238-254. doi:10.1016/j.bbcan.2012.04.005.
38. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2010;1797(6):1225-1230. doi:10.1016/j.bbabbio.2010.03.025.
39. Ralph SJ, Low P, Dong L, Lawen A, Neuzil J. Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2006;1(3):327-346. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221044>. Accessed December 9, 2016.
40. Biasutto L, Dong L-F, Zoratti M. Mitochondrially targeted anti-cancer agents. *Mitochondrion.* 2010;10(6):670-681. doi:10.1016/j.mito.2010.06.004.

41. Hahn T, Polanczyk MJ, Borodovsky A, Ramanathapuram L V, Akporiaye ET, Ralph SJ. Use of anti-cancer drugs, mitocans, to enhance the immune responses against tumors. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(3):357-376. doi:10.2174/1389201011314030010.
42. Warmoes MO, Locasale JW. Heterogeneity of glycolysis in cancers and therapeutic opportunities. *Biochem Pharmacol.* 2014;92(1):12-21. doi:10.1016/j.bcp.2014.07.019.
43. Neuzil J, Dong L-F, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion.* 2013;13(3):199-208. doi:10.1016/j.mito.2012.07.112.
44. Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion.* 2012;12(1):24-34. doi:10.1016/j.mito.2011.04.001.
45. Locatelli C, Filippin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. *Eur J Med Chem.* 2013;60:233-239. doi:10.1016/j.ejmech.2012.10.056.
46. You BR, Moon HJ, Han YH, Park WH. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(5):1334-1340. doi:10.1016/j.fct.2010.02.034.
47. Frey C, Pavani M, Cordano G, et al. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol.* 2007;146(4):520-527. doi:10.1016/j.cbpa.2006.03.007.
48. Salas MG, Zugasti Cruz A, Yesenia S, et al. Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro.
49. Smith RAJ. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:5407-5412.

50. Jara JA, Castro-Castillo V, Saavedra-Olavarría J, et al. Antiproliferative and Uncoupling Effects of Delocalized, Lipophilic, Cationic Gallic Acid Derivatives on Cancer Cell Lines. Validation in Vivo in Singenic Mice. *J Med Chem.* 2014;57(6):2440-2454. doi:10.1021/jm500174v.
51. Hou Y-Y, Wu M-L, Hwang Y-C, Chang F-R, Wu Y-C, Wu C-C. The natural diterpenoid ovatodiolide induces cell cycle arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma Ca9-22 cells. *Life Sci.* 2009;85(1):26-32. doi:10.1016/j.lfs.2009.04.013.
52. Universidad de Santiago de Compostela. *Tendencias Actuales En El Cáncer Oral.* Vol OP/319A. (Pérez Sayáns M, García García A, eds.). Santiago de Compostela: Servizo de Publicacións e Intercambio Científico; 2011.
53. Pérez-Sayáns. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncol Rep.* 2009;22(6). doi:10.3892/or_00000565.
54. Barh D, Carpi A, Verma M, Gunduz M, eds. *Cancer Biomarkers: Non-Invasive Early Diagnosis and Prognosis.* Vol First Ed. USA: Taylor & Francis LLC; 2013. doi:10.13140/2.1.2371.0725.
55. MINSAL. *Prevención Del Cáncer Bucal: 7a Semana Lucha Contra El Cáncer.* Santiago de Chile; 2014.
56. Bjordal K, Hammerlid E, Ahlner-Elmqvist M, et al. Quality of life in head and neck cancer patients: validation of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire-H&N35. *J Clin Oncol.* 1999;17(3):1008-1019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10071296>. Accessed March 23, 2016.
57. Riera S P, Martínez R B. Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Rev Med Chil.* 2005;133(5). doi:10.4067/S0034-98872005000500007.
58. Pérez-Sayáns M. Determinación De ATP6V1C1 En Muestras De Citología Exfoliativa De La Cavidad Oral: Implicación En El Diagnóstico Del Carcinoma Oral De Células Escamosas. Un Estudio Preliminar. 2010;1. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

59. Johnson NW, Bain CA. Tobacco Intervention: Tobacco and oral disease. *Br Dent J*. 2000;189(4):200-206. doi:10.1038/sj.bdj.4800721.
60. Stolk-Liefferink SAH, Dumans AG, van der Meij EH, Knegt PP, van der Wal KGH. Oral squamous cell carcinoma in children; review of an unusual entity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2008;72(1):127-131. doi:10.1016/j.ijporl.2007.09.006.
61. Hill BT, Price LA. Lack of Survival Advantage in Patients with Advanced Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity Receiving Neoadjuvant Chemotherapy Prior to Local Therapy, Despite Achieving an Initial High Clinical Complete Remission Rate. *Am J Clin Oncol*. 1994;17(1):1-5. doi:10.1097/00000421-199402000-00001.
62. Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 1999;35(3):333-342. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10621856>. Accessed March 26, 2016.
63. BÓRQUEZ M P, CAPDEVILLE F F, MADRID M A, VELOSO O M, CÁRCAMO P M. Sobrevida global y por estadios de 137 pacientes con cáncer intraoral: Experiencia del Instituto Nacional del Cáncer. *Rev Chil cirugía*. 2011;63(4):351-355. doi:10.4067/S0718-40262011000400003.
64. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Cell Viability Assays*; 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>. Accessed March 26, 2016.
65. Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem*. 1985;33(1):77-79. doi:10.1177/33.1.2578146.
66. Krumschnabel G, Eigentler A, Fasching M, Gnaiger E. Use of Safranin for the Assessment of Mitochondrial Membrane Potential by High-Resolution Respirometry and Fluorometry. In: *Methods in Enzymology*. Vol 542. ; 2014:163-181. doi:10.1016/B978-0-12-416618-9.00009-1.

67. Smith RAJ, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(9):5407-5412. doi:10.1073/pnas.0931245100.
68. Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health Perspect*. 1990;87:213-218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2176586>. Accessed March 31, 2016.
69. Germanov E, Berman JN, Guernsey DL. Current and future approaches for the therapeutic targeting of metastasis (review). *Int J Mol Med*. 2006;18(6):1025-1036. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17089005>. Accessed April 1, 2016.
70. Gonzales Rengifo GF, Gonzales Castañeda C, Espinosa Guerinoni D, Rojas Tubeh C. Sobre expresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas. *Acta Médica Peru*. 2007;24(3):187-197.