

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***LA BIOENERGÉTICA TUMORAL ES AFECTADA POR
ISOQUINOLINQUINONAS. UNA OPCIÓN PARA NUEVOS
AGENTES ANTITUMORALES***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Memoria
para optar al Título de Bioquímico por:**

MIGUEL ANGEL CORDOVA DELGADO

Directores de Tesis: Dr. Ramiro Araya Maturana

Dr. Jorge Ferreira Parker

Santiago-CHILE

Diciembre 2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

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

MIGUEL ANGEL CORDOVA DELGADO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Ramiro Araya M. _____

Director de Tesis:

Dr. Jorge Ferreira P. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Dante Miranda _____

Dra. Lilian Jara _____

Dr. Alfonso Paredes _____

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, que le debo todo lo bueno y malo que tengo. A mi padre, que estuvo conmigo en mis peores momentos. A mi tío, abuela y a mi hermano, con quienes he compartido los mejores momentos de mi vida. A mi abuela y a la familia de mi padre, por haber compartido su hogar estos largos años de estudio. A mi amorcín, que a pesar del paso del tiempo sigue siendo lo único que veo. Finalmente, a cada persona que puso una sonrisa en mi camino.

Se agradece el apoyo técnico del Laboratorio de Metabolismo Celular y Bioenergética, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile a cargo del Prof. Dr. César Cárdenas.

FINANCIAMIENTO

Se agradece el financiamiento de FONDECYT, para la Beca Nacional de Magister Complementario año 2013 n° de folio **221320352** por Miguel Cordova Delgado y a los Proyectos n° **1140753** y Anillo **ACT-1107** para Ramiro Araya Maturana y Proyecto n° **1130772** para Jorge Ferreira.

“... hay quienes luchan toda su vida... ellos son los imprescindibles...” B. Bretch

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....4

ÍNDICE DE FIGURAS.....6

ABREVIATURAS.....7

RESUMEN.....9

SUMMARY.....11

MARCO TEÓRICO.....13-21

1.1. Cáncer.....13

1.2. Reprogramación metabólica en células de cáncer.....14

1.3. Características generales de la mitocondria.....16

1.4. ¿Por qué la mitocondria puede ser un blanco farmacológico para atacar el
cáncer?.....18

1.5. Ataque de múltiples vías metabólicas para el tratamiento del cáncer.....20

1.6. Quinonas como agentes antitumorales.....21

2. HIPÓTESIS.....23

3. OBJETIVO GENERAL.....23

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....23

5. METODOLOGÍA.....24-28

5.1. Reactivos.....24

5.2. Cultivo celular.....24

5.3. Compuestos estudiados.....24

5.4. Ensayo de proliferación celular por MTT.....24

5.5. Medición de la velocidad de consumo de oxígeno (OCR) celular.....25

5.6. Preparación de mitocondrias y respiración mitocondrial.....25

5.7. Determinación de la producción de anión superóxido mitocondrial.....26

5.8. Determinación de los niveles de NAD(P)H totales.....26

5.9. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$).....27

5.10. Niveles de ATP intracelular.....27

5.11. Ensayo de muerte celular.....	27
5.12. Ensayo de proliferación celular por MTT con combinación de moléculas.....	28
5.13. Expresión de resultados y análisis estadístico.....	28
6. RESULTADOS.....	29-41
6.1. MQ y MQR8 afectan selectivamente la proliferación de células de cáncer mamario humano.....	29
6.2. MQ y MQR8 producen cambios en los parámetros respiratorios mitocondriales en células MCF-7 y MDA-MB-231.....	31
6.3. MQ y MQR8 producen cambios en los estados respiratorios en mitocondrias aisladas de tumores de ratones TA3/Ha.....	34
6.4. Efecto de MQ y MQR8 sobre la producción de anión superóxido mitocondrial y niveles de NAD(P)H totales.....	36
6.5. MQ y MQR8 producen un colapso del $\Delta\psi$ en células MCF-7.....	38
6.6. Efecto de MQ y MQR8 en los niveles de ATP intracelulares.....	39
6.7. MQ induce muerte celular del tipo apoptótica en células de tumor mamario...40	
6.8. Efecto en la proliferación por acción combinada de MQ y 2-DG.....	41
7. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIONES.....	49
9. BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura mitocondrial.....18

Figura 2. Clasificación de los mitocanes.....20

Figura 3. MQ y MQR8 afectan selectivamente la proliferación de células de tumor de mama humano.....30

Figura 4. MQ y MQR8 producen cambios en los parámetros respiratorios mitocondriales en células MCF-7 y MDA-MB-231.....33

Figura 5. MQ y MR8 alteran los estados respiratorios en mitocondrias aisladas de células TA3/Ha.....35

Figura 6. Efectos de MQ y MQR8 sobre la producción de anión superóxido mitocondrial y los niveles de NAD(P)H totales.....37

Figura 7. MQ y MQR8 producen una disminución del $\Delta\psi$ dependiente de la concentración en células MCF-7.....38

Figura 8. MQ y MQR8 disminuyen significativamente los niveles de ATP a las 2 horas de tratamiento en la línea MCF7, pero de forma más atenuada en la línea MDA-MB-231.....39

Figura 9. MQ induce muerte celular del tipo apoptótica en células de tumor mamario.....40

Figura 10. La combinación de MQ con 2-desoxi-glucosa (2-DG) es capaz de producir una mayor disminución en la proliferación de las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 que ambos compuestos por si solos tras 48 h de tratamiento.....42

Figura 11. Mecanismos de acción a nivel mitocondrial propuesto para las isoquinolinquinonas MQ y MQR8.....48

ABREVIATURAS

ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP	: Adenosíndifosfato
ARN	: Ácido ribonucleico
ARNm	: Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	: Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	: Ácido ribonucleico de transferencia
ASC	: Ascorbato
ATP	: Adenosíntrifosfato
CCCP	: Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona
CTE	: Cadena transportadora de electrones
FCCP	: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona
FPM	: Fuerza protón motriz
G	: Glutamato
h	: horas
Kb	: Kilobase
M	: Malato
ml	: Mililitro
mM	: Milimolar
MME	: Membrana mitocondrial externa
MMI	: Membrana mitocondrial interna
nm	: Nanómetro
O ₂	: Oxígeno molecular
OCR	: Velocidad de consumo de oxígeno
OXPHOS	: Fosforilación oxidativa
PBS	: Tampón fosfato salino
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
SEM	: Error estándar de la media
SUCC	: Succinato
TMPD	: Tetrametil-p-fenil-endiamina

TMRM : Tetrametil rodaminametil éster

μl : Microlitro

μM : Micromolar

RESUMEN

Una serie de alteraciones promueven la transformación de una célula normal a una neoplásica. Entre estas destacan: la resistencia a la muerte celular, una sostenida señalización proliferativa, una evasión al sistema inmune, una capacidad de replicación ilimitada y una reprogramación del metabolismo. La última alteración, permite a las células neoplásicas obtener las macromoléculas y la energía suficiente para satisfacer sus demandas para la proliferación acelerada y otros procesos relacionados. Una de las anomalías metabólicas mejor conocidas es el denominado efecto Warburg, el cual demuestra que las células neoplásicas tienen una elevada glicólisis incluso en presencia de oxígeno. Sin embargo, evidencias bioquímicas y genéticas han demostrado la dependencia de las células tumorales tanto de glicólisis como de la fosforilación oxidativa.

La mitocondria es “la fuente de poder” de la célula, es un reservorio de proteínas pro y anti apoptóticas y tiene un papel fundamental en la interconexión de los diferentes procesos metabólicos dentro de la célula. Además, es importante tener en cuenta el metabolismo mitocondrial anormal que tienen las células tumorales. Por lo tanto, las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de compuestos con acción mitocondrial con la capacidad de inducir muerte selectiva en las células neoplásicas. Estos compuestos pueden actuar en distintos niveles de la mitocondria, por ejemplo, a nivel de los canales mitocondriales (VDAC y ANT), de complejos respiratorios, de las proteínas apoptóticas, del ADNm, produciendo una desestabilización mitocondrial que puede desencadenar procesos de muerte celular.

Existe una isoquinolinquinona (MQ) con actividad antiproliferativa contra diferentes líneas tumorales, sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido evaluado. Nosotros creemos que podría actuar a nivel mitocondrial. Además, sintetizamos dos análogos (MQR8 y MQR16) y evaluamos su actividad antitumoral en células de tumor de mama. Nuestros principales resultados demostraron que MQ posee actividad antiproliferativa en un rango de IC₅₀ entre 10-25 μ M en células tumorales de mama, MQR8 posee una actividad similar al primero y que MQR16 es inactivo. Además, MQ fue capaz de afectar OXPHOS,

produciendo cambios en los parámetros respiratorios en células tumorales intactas y en los estados mitocondriales, junto a un incremento en la producción de anión superóxido mitocondrial y disminución en los niveles de ATP y NAD(P)H citosólicos en las células tumorales de mama por el tratamiento con MQ. El potencial de membrana mitocondrial disminuyó, por efecto del compuesto y tras 24 h de tratamiento las células tumorales tratadas con MQ mueren por apoptosis. Por otro parte, MQR8 tiene un comportamiento similar a MQ en términos de perturbación mitocondrial, sin embargo, existen diferencias en los efectos sobre algunos parámetros bioenergéticos mitocondriales.

SUMMARY

(Tumoral bioenergetics is affected by isoquinolinequinones. An option for new anticancer agents)

A series of alterations promote the transformation of normal to neoplastic cell. Which includes: resistance to cell death, sustained proliferative signaling, immune system evasion, unlimited replicative capacity and metabolic reprogramming. This latter, allows cancer cells to obtain macromolecules and energy to satisfy their demands for accelerated proliferation and related processes. One of the best known metabolic abnormalities is the so called Warburg effect, which demonstrates that cancer cells have high glycolysis even in the presence of oxygen. However, biochemical and genetic evidences have demonstrated the dependence of cancer cells of both glycolysis and oxidative phosphorylation.

The mitochondrion is the "power plant" of the cell, a reservoir of pro and anti apoptotic proteins and plays a fundamental role in the interconnection of the various metabolic processes within the cell. It is also important to consider the abnormal mitochondrial metabolism that has cancer cells. Therefore, research has been focused on finding compounds with mitochondrial action with the ability to induce selective death in neoplastic cells. These compounds may act at different levels on mitochondrion, for example, mitochondrial channel level (VDAC and ANT), respiratory complexes, apoptotic protein, mitochondrial DNA, resulting in mitochondrial destabilization that can trigger cell death processes.

Exists one reported isoquinolinequinone (MQ) with antiproliferative activity against different cancer cell lines, however, its mechanism of action has not been evaluated. We hypothesized that it could act at the mitochondrial level. Also, we synthesized two analogues (MQR8 and MQR16) and assessed their anticancer activity on breast cancer cells. Our main results demonstrated that MQ had antiproliferative activity with an IC_{50} range of 10 to 25 μ M in breast tumor cells, MQR8 had an activity similar to MQ and MQR16 had non activity. Moreover, MQ was able to affect OXPHOS producing changes in

respiratory parameters on intact breast cancer cells and in the mitochondrial states. Along with this, an increase in mitochondrial superoxide anion production and decreased levels of cytosolic ATP and NAD(P)H were produced in breast tumor cells by MQ treatment. The mitochondrial membrane potential decreased by effect of the compound and after 24 h of MQ treatment breast cancer cells died by apoptosis. On the other hand, MQR8 had a similar behavior that MQ in terms of mitochondrial disruption, however, there were differences in the effects over some mitochondrial bioenergetic parameters.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad que en nuestros días causa millones de muertes alrededor del mundo, además de tener altísimos costos emocionales y monetarios para el enfermo y su familia. Las investigaciones durante el siglo XX y lo que va recorrido del siglo XXI nos han ayudado a entender la serie de mecanismos moleculares y bioquímicos que controlan la génesis y el desarrollo de un cáncer; sin embargo, aún no existe cura ni tratamiento eficaz contra esta enfermedad.

Algunas investigaciones en los últimos 50 años han revelado que el cáncer es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma. La identificación de alteraciones genéticas permitió descubrir que mutaciones en determinados genes pueden controlar la transformación de las células normales a células neoplásicas, tales genes son conocidos como oncogenes y genes supresores de tumores [1]. Existen más de cien tipos de cáncer y alrededor de 1,200 subtipos diferentes de tumores, lo cual da cuenta de la complejidad y heterogeneidad de esta enfermedad. Aun cuando, Hanahan y Weinberg [2], sugieren que seis modificaciones en la fisiología celular gobiernan colectivamente la transformación hacia células malignas, entre ellas se encuentran: una sostenida señalización de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de muerte celular programada (principalmente la apoptosis), potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis. En una nueva revisión los mismos autores [3] proponen que junto a las características antes mencionadas la reprogramación del metabolismo energético y la evasión al sistema inmune por parte del tumor, serían nuevas alteraciones en la biología del cáncer, donde una mayor comprensión del funcionamiento de estos procesos en su conjunto permitiría mejorar el tratamiento contra esta enfermedad.

El científico alemán y Premio Nobel de Medicina y Fisiología (1931), Otto Warburg, propuso en la década de 1920 un cambio metabólico al momento de originarse el cáncer, al observar que las células tumorales en crecimiento tienen una velocidad de glicólisis

alrededor de 200 veces mayor que aquellas de tejido normal, incluso en presencia de oxígeno, lo que se denominó “glicolisis aeróbica” [4]. Sin embargo, su teoría comenzó a ser criticada por la comunidad científica a partir de investigaciones que mostraban que el consumo de oxígeno no disminuía en las células neoplásicas y que la fosforilación oxidativa podría ser más alta en tejidos derivados de tumor que en los normales, contrariamente a lo propuesto por Warburg [5, 6]. Junto a lo anterior los avances en la bioenergética general continuaron y fue en la década de 1930 que Hans Adolf Krebs describió el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, quedando en evidencia la relación entre respiración y la fermentación. En la década del 1960 quedó más clara la controversia bioenergética al conocerse la teoría Quimiosmótica de Mitchell [7], la cual permitió entender cómo el gradiente electroquímico de H^+ generado por la cadena de transporte de electrones (CTE) en la mitocondria permitía la síntesis de ATP. A pesar de los avances en la bioenergética del cáncer, los científicos dejaron de fijar su atención en este aspecto de la enfermedad en la década de 1960, debido principalmente a la identificación del primer oncogén, el gen SRC (de sarcoma), gen responsable de la inducción tumoral una vez integrado en el genoma huésped [8] y del primer gen supresor de tumores, el gen RB (de retinoblastoma) [9]. La identificación de estas nuevas entidades genéticas que controlarían la transformación de células normales a neoplásicas relegó al metabolismo del cáncer a un papel secundario en la génesis y desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, evidencias actuales nos dan cuenta de que la reprogramación metabólica de los tumores se podría utilizar para nuevos tratamientos y métodos de diagnóstico. Por ejemplo, la tomografía de emisión de positrones (PET) de 2-Desoxi-2- ^{18}F fluoroglucosa para detectar la presencia de un tumor.

1.2. Reprogramación metabólica en células de cáncer

Un tema en ascenso en la biología del cáncer es cómo la regulación metabólica, la cual controla las decisiones de vida o muerte celular, se encuentra enlazada directamente con el desarrollo tumoral. En términos generales, las células neoplásicas se diferencian de las células normales por su división celular ilimitada, por lo tanto, la transformación

oncogénica de estas células tiene que ir acompañada de una alteración metabólica que facilite su rápido crecimiento y duplicación.

El estudio de la llamada reprogramación metabólica en las células neoplásicas comenzó con los trabajos pioneros de O. Warburg y colegas al observar que las células con cáncer tienen menor consumo de oxígeno y alta producción de ácido láctico, en relación a los tejidos normales, incluso en condiciones de normoxia, concluyendo que las células tumorales prefieren la glicólisis aeróbica antes que fosforilación oxidativa (OXPHOS) para la obtención de energía. Warburg creyó que la disminución en la respiración se debía a defectos mitocondriales, sin embargo, se sabe que una mitocondria funcional es esencial para las células neoplásicas [10] y que estas células no sacrifican la fosforilación oxidativa para aumentar la producción de lactato [11, 12]. Si bien, las células neoplásicas de distinto origen sufren el efecto Warburg aún no se entiende el valor fisiológico de este fenómeno. En este sentido se han propuesto una serie explicaciones para el rol de este efecto, en primer lugar las células con cáncer, al igual que aquellas en proliferación, necesitan una eficiente captación e incorporación de nutrientes para la generación de biomasa utilizada para la formación de nuevas células, en donde la glucosa y determinados aminoácidos se utilizan a través de la vía de las pentosas para la formación de ácidos nucleicos y por otro lado algunos intermediarios glicolíticos son utilizados para la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos no esenciales [13, 14]. Además las células neoplásicas utilizarían la glicólisis como un mecanismo de defensa, debido a que los procesos glicolíticos producen un microambiente ácido el cual sería dañino para las células normales y no tendría efectos en las tumorales [15]. Por otro lado, la glicólisis produce menos especies reactivas del oxígeno (ROS) en relación a la OXPHOS, por lo tanto, la célula tumoral podría eludir el daño debido a altas concentraciones de ROS, lo que resultaría en la resistencia a la apoptosis de estas células [16, 17]. Sin embargo, nuevas investigaciones indican que las células neoplásicas son más sensibles a daño inducido por estrés oxidativo [18].

La alteración metabólica en las células neoplásicas se ha convertido en un marcador característico del cáncer y poder manejar los aspectos bioenergéticos para crear y mejorar

terapias actuales resulta ser un desafío interesante. La existencia de un organelo que actúa como fuente de poder e integrador de señales metabólicas al interior de la célula, la mitocondria, nos brinda la posibilidad de modular la bioenergética celular y algunos procesos alterados en las células neoplásicas, tales como la apoptosis y necrosis, entre otros, convirtiendo así a la mitocondria en un atractivo blanco farmacológico para el tratamiento de esta enfermedad.

1.3. Características generales de la mitocondria

La mitocondria es un organelo que se encuentra en la mayoría de las células eucariontes. El número y localización depende del tipo y requerimiento energético de las células, variando de 2-6 mitocondrias en trombocitos a más de 100.000 en ovocitos. Este organelo posee su propio material genético, el cual se encuentra en vertebrados en orden de 10^3 – 10^4 copias/célula. La secuenciación y análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) y un gran número de genomas bacterianos han permitido apoyar la tesis de que el genoma mitocondrial se origina a partir de un ancestro eubacteriano [19]. El ADNmt se ubica en la matriz mitocondrial y en vertebrados tiene una forma circular y un tamaño de ~16-18 kb, codifica para 13 polipéptidos que componen los complejos de la cadena respiratoria, y que son esenciales para el proceso de fosforilación oxidativa y obtención de energía, además este material genético codifica para 2 ARNr y para los 22 ARNt necesarios para la traducción de los ARNm provenientes de la transcripción del ADNmt. Todos los otros componentes de la compleja maquinaria mitocondrial son codificados por el ADN nuclear y llegan a su objetivo por sistemas específicos de importación mitocondrial [20-22].

La distribución subcelular de este organelo se debe al movimiento de tracción que realiza el citoesqueleto hacia zonas de alta demanda energética. Los procesos de fusión y fisión mitocondrial determinan la cantidad de mitocondrias en la célula de acuerdo a factores ambientales y de crecimiento del organismo, en donde la dinámica mitocondrial se ha relacionado con procesos metastásicos [23]. Existen GTPasas encargadas de regular la morfología mitocondrial, en vertebrados, las proteínas mitofusinas 1 y 2 regulan la fusión de la membrana mitocondrial externa (MME). Por otro lado, en la fusión de la membrana

mitocondrial interna (MMI) está involucrada la proteína OPA1 (que también podría participar en el proceso de fusión de ambas membranas mitocondriales) y donde la proteína relacionada a dinamina 1 (Drp-1) es reclutada desde el citoplasma a la mitocondria para regular el proceso de fisión mitocondrial [24].

En términos estructurales la mitocondria está formada por la MME, MMI, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La MME separa al espacio intermembrana del citoplasma, siendo responsable de la entrada/salida de moléculas de la mitocondria (fig. 1). Por una parte, los canales iónicos dependientes de voltaje (VDAC), localizados en la MME, permiten la entrada de pequeños iones y metabolitos a la mitocondria, por otro lado, la translocación de proteínas a la mitocondria es un proceso complejo el cual es regulado principalmente por la acción conjunta del translocador de la MME (TOM) y el translocador de la MMI (TIM) [21, 22]. Cuando se producen determinados contactos entre estas membranas se forma el denominado poro de transición de permeabilidad mitocondrial, el cual se relaciona con la activación de diferentes tipos de muerte celular [25]. La MMI separa el espacio intermembrana de la matriz, siendo un componente esencial en el transporte de proteínas a la matriz mitocondrial a través de TIM (ver arriba) y en la CTE. Los complejos mitocondriales están alojados en la MMI, la oxidación de NADH y succinato permite la transferencia de dos electrones al complejo I y II respectivamente. Estos electrones son transferidos a la ubiquinona que se reduce a ubiquinol transfiriéndose posteriormente al complejo III y luego al complejo IV vía la proteína redox soluble, citocromo c, que también tiene un rol en la apoptosis [20]. El aceptor final de estos electrones es el oxígeno molecular (O_2) el cual es reducido a H_2O . Junto con esta transferencia de electrones los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, el movimiento de protones entre estos compartimientos mitocondriales produce un gradiente electroquímico ($\Delta\mu H^+$), conocido como “fuerza protón-motriz” (FPM), la cual incluye el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) y el gradiente de protones (ΔpH). La FPM es utilizada para la producción de ATP dentro de la matriz mitocondrial por parte de la F_1F_0 -ATP sintasa a

partir de ADP y fosfato. Finalmente el ATP producido es translocado de la mitocondria hacia el citoplasma por la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT).

Muchas mutaciones en componentes de la maquinaria mitocondrial han sido relacionadas con la transformación hacia células malignas; alteraciones genéticas en las enzimas metabólicas mitocondriales como fumarato hidratasa, succinato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa II se consideran mutaciones oncogénicas [26]. Es por esta razón que las moléculas capaces de alterar en mayor o menor grado diferentes componentes mitocondriales se han convertido en promisorios agentes anti-cáncer al mejorar en gran medida la selectividad contra células neoplásicas, la principal desventaja de las drogas utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad.

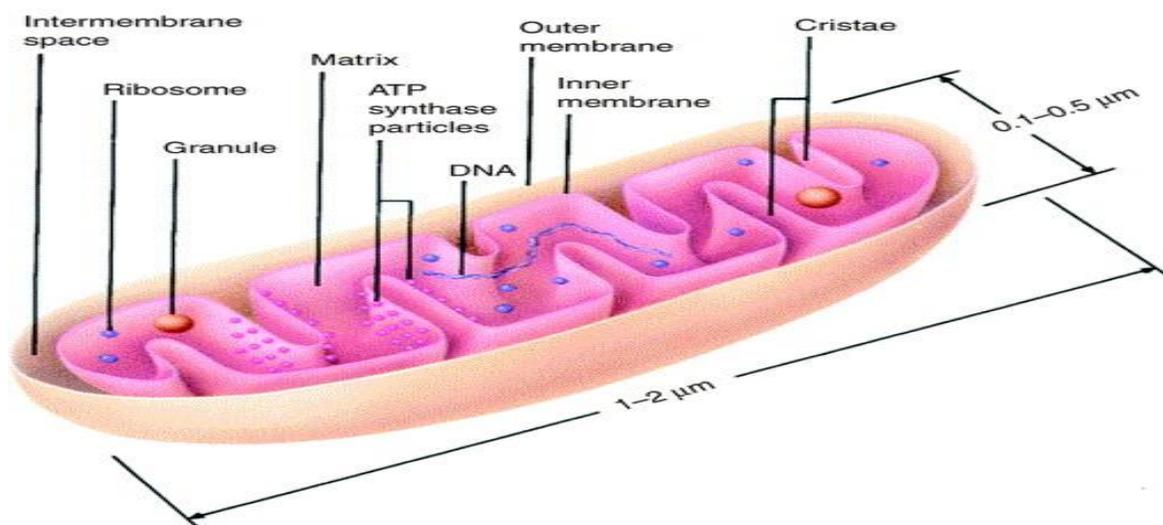


Figura 1. **Estructura mitocondrial.** La mitocondria contiene un sistema de dos membranas, una externa (MME) que la separa del citoplasma y una interna (MMI) que separa el espacio intermembrana de la matriz mitocondrial. Los complejos mitocondriales se encuentran en la MMI y son los responsables del transporte de electrones y bombeo de protones al espacio intermembrana. El gradiente de protones luego es utilizado por la ATP sintasa para la síntesis de ATP. Figura adaptada de [27].

1.4. ¿Por qué la mitocondria puede ser un blanco farmacológico para atacar el cáncer?

Dada la complejidad de la biología del cáncer, pensar que con la alteración de un gen o una vía de señalización sería suficiente para suprimir la enfermedad es una ilusión. En la

búsqueda de un blanco invariable y que permita una estrategia general para el tratamiento eficiente de la amplia gama de neoplasias surgió la mitocondria, un blanco integrador/funcional (al menos en cierta medida) en una gran cantidad de cánceres [28]. La mitocondria es considerada la “fuente de poder” química de la célula y en ella destacan funciones interesantes relacionadas con la biología de la célula tumoral, entre ellas destacan: la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa, ser un organelo integrador de vías de metabólicas al conectar la vía glicolítica con la vía de los ácidos tricarboxílicos, llevar a cabo la oxidación de ácidos grasos y la señalización celular a través de la generación de ROS, además de una compleja función en la muerte celular por apoptosis al regular el proceso de formación del poro de transición mitocondrial, la liberación de citocromo c y la sobrecarga de Ca^{+2} [29] y en la muerte celular por necrosis regulada o también conocida necroptosis [30, 31] .

Los compuestos con acción anti-cáncer y que actúan a nivel mitocondrial se denominan mitocanes (acrónimo de mitocondria y cáncer), y en los últimos años han mostrado un sostenido desarrollo gracias a su selectividad por la células neoplásicas [10, 32, 33]. Neuzil et al. [34] propuso una clasificación de los mitocanes basado en el sitio de acción de estas moléculas en la mitocondria. En primer lugar están los compuestos inhibidores de la hexoquinasa (2-desoxiglucosa y 3-bromopiruvato); en la segunda clase los compuestos que tienen como blanco las proteínas de la familia Bcl-2 (α -tocoferilsuccinato); las clases tres y cuatro corresponden a las drogas que tienen como blanco ANT/VDAC más los inhibidores redox de tioles (isotiocianatos, lonidamina y arsenitos); en la quinta clase se encuentran los compuestos que tienen como blanco la CTE (α -tocoferilsuccinato, MitoVES, tamoxifeno); la clase seis incluye a los cationes lipofílicos que afectan la MMI (rodamina 123 y péptido $(\text{KLAKKLAL})_2$); el grupo siete incluye a los compuestos que afectan el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (dicloroacetato y 3-bromopiruvato); y finalmente la clase ocho que corresponde a los compuestos que tienen como blanco el DNAm (vitamina K3, fialuridina, 1-metil-4-fenil-pyridinium y MitoVES). Para revisión completa ver [32, 34, 35] (fig. 2).

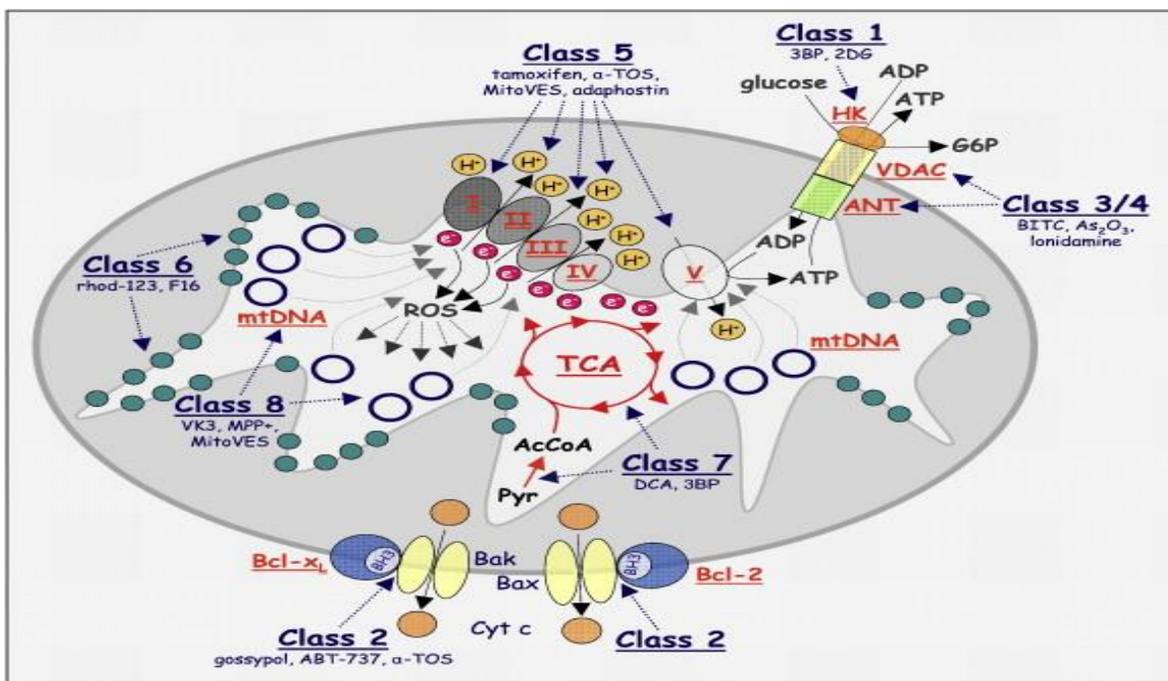


Figura 2. **Clasificación de los mitocanes.** Los denominados mitocanes son compuestos que tienen la capacidad de desestabilizar la mitocondria a distintos niveles. Entre los sitios de la mitocondria susceptibles de ser atacados por estos compuestos destacan: los complejos y canales de la mitocondria, el ADNmt, proteínas pro/anti apoptóticas y componentes del ciclo de Krebs en la matriz mitocondrial. Figura tomada de [34].

1.5. Ataque de múltiples vías metabólicas para el tratamiento del cáncer

En el último tiempo, una interesante estrategia de ataque a las células neoplásicas es utilizar las diferencias bioquímicas entre las células transformadas y las normales. En este sentido una diferencia fundamental radica en la reprogramación metabólica que sufren las células neoplásicas, desplazando su metabolismo energético desde la OXPHOS hacia la “glicólisis aeróbica” para generar ATP. Agentes inhibidores de la glicólisis (como por ejemplo 2-desoxiglucosa, 2-DG) mostraron prósperos resultados anti-cáncer en estudios in vitro y en modelos animales. Sin embargo, no se emularon dichos resultados en investigaciones humanas, debido principalmente a los efectos tóxicos a nivel sistémico de este tipo de compuestos [36]. Por otro parte, ciertas investigaciones actuales muestran que los efectos antitumorales de compuestos con acción mitocondrial son capaces de aumentar al combinarse con agentes inhibidores de la glicólisis, como la 2-DG. Tales efectos se logran a través de la disminución de los niveles de ATP, aumento de la

producción de ROS, inhibición de la autofagia, entre otros [9, 37-39]. Esto sugiere que el ataque dual de vías metabólicas en células neoplásicas se convierte en una interesante estrategia para el tratamiento de esta enfermedad.

1.6. Quinonas como agentes antitumorales

Nuestro laboratorio ha venido investigando compuestos químicos antitumorales que tienen como blanco de acción la mitocondria. En términos estructurales estos compuestos se caracterizan por tener núcleos quinónicos/hidroquinónicos los cuales serían los responsables de sus propiedades. Esta función química les permite tener diferentes blancos de acción celular, entre ellos destacan: la intercalación con el ADN, la alquilación biorreductiva de macromoléculas, generación de ROS a través de ciclos redox e interacción con diferentes componentes de la CTE mitocondrial [40, 41]. Se ha reportado que diferentes hidroquinonas tienen la capacidad de modular la respiración celular al afectar de distinta forma componentes de la CTE mitocondrial, además estas moléculas mostraron efectos antiproliferativos contra diferentes líneas tumorales humanas y de ratón [42-44]. Sin embargo, estos compuestos mostraron una modesta selectividad, el talón de Aquiles de la mayoría de los compuestos antitumorales y la quimioterapia. En la búsqueda de quinonas/hidroquinonas con acción selectiva se eligió una isoquinolinquinona (**MQ**) que ha mostrado una actividad antiproliferativa en el rango micromolar contra una serie de líneas de cáncer humano y una baja actividad para fibroblastos de pulmón normal [45]. Sin embargo, no se conocía el mecanismo de acción del compuesto ni si presenta actividad en líneas celulares de cáncer mamario. Nosotros proponemos que **MQ** podría tener un mecanismo mitocondrial relacionado con su capacidad selectiva contra las diferentes líneas tumorales. Por otro lado, se ha reportado que variaciones en la lipofilia de algunas moléculas con acción mitocondrial, a través de la adición de cadenas alquílicas de diferentes largo, tienen interesantes efectos en su actividad [46]. Debido a esto, diseñemos 2 análogos de MQ que presentan una adición de una cadena alquílica de 8 y 16 carbonos, denominados **MQR8** y **MQR16**, respectivamente y nos propusimos evaluar el efecto antitumoral y sus posibles efectos mitocondriales en

líneas celulares de cáncer mamario, lo que nos permitiría orientar nuestra búsqueda de moléculas más efectivas y selectivas para el tratamiento de esta enfermedad.

2. HIPÓTESIS

"El aumento de la lipofilia de la molécula de referencia MQ, permite incrementar la perturbación de la bioenergética mitocondrial y con eso la selectividad contra las células de cáncer mamario humano".

3. OBJETIVO GENERAL

Dilucidar el mecanismo celular involucrado en el efecto antitumoral de las isoquinolinquinonas en células de cáncer mamario humano.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar el efecto sobre la proliferación y selectividad celular de las isoquinolinquinonas en células de tumor de mama humano y discutir su relación estructura/actividad.
- II. Estudiar el efecto sobre los parámetros bioenergéticos de los compuestos que presentaron actividad antitumoral.
- III. Evaluar el efecto citotóxico de los compuestos que presentaron acción antitumoral en células de tumor de mama humano.
- IV. Evaluar el efecto sobre la proliferación de células tumorales de mama que tiene MQ en combinación con 2- desoxiglucosa (2-DG).

5. METODOLOGÍA

5.1. Reactivos

Los reactivos antimicina A, rotenona, oligomicina, CCCP, FCCP, glutamato, malato, TMPD y ascorbato fueron comprados a Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU). DMSO fue comprado a Merck (Darmstadt, Alemania) y el MTT a Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU), ambos de alta pureza. Además los kits MitoSOX[®] Red fue adquirido en Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU), CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay en Promega (Madison, WI, EEUU) y el de Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit en Abcam (Cambridge, MA, EE.UU).

5.2. Cultivo celular

Las líneas tumorales de cáncer de mama humanas MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[®]) y MDA-MB-231 (ATCC[®] HTB-26[®]) fueron adquiridas en ATCC (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Ambas líneas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco[®], Carlsbad, CA, EEUU), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (HyClone, Logan, UT, EEUU) y antibióticos (100 UI de penicilina/mL y 100 µg/mL de estreptomycin). La línea MCF10A (ATCC[®] CRL-10317[®]) fue adquirida en ATCC, fue cultivada en medio MEGM (Lonza, Walkersville, MD, EE.UU).

Todas las líneas fueron mantenidas en un ambiente con 5% de CO₂ a 37 ° C.

5.3. Compuestos estudiados

Las isoquinolinquinonas fueron preparadas en el laboratorio del Profesor Ramiro Araya para su evaluación biológica.

Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración final de 0,1 M, a partir de ese stock se prepararon las concentraciones deseadas para cada experimento.

5.4. Ensayo de proliferación celular por MTT

Se sembraron 1 x 10⁵ células MCF-7, MDA-MB-231 o MCF 10A/ml, se incubaron por 24 horas y luego fueron expuestas a concentraciones crecientes de los compuestos por 24,

48 y 72 h. La proliferación celular fue determinada mediante el ensayo por MTT (570 nm). El valor de IC_{50} corresponde a la concentración de compuesto, con la cual se inhibe un 50% la proliferación con respecto a las células tratadas con el vehículo, DMSO y fueron obtenidos de los datos de la curva dosis-respuesta.

5.5. Medición de la velocidad de consumo de oxígeno (OCR) celular

El OCR celular (un indicador de OXPHOS) fue medido en tiempo real utilizando un XF96 Extracellular Flux Analyzer (Bioscience, Billerica, CA). El Seahorse XF96 basa su sistema en el uso de sondas fluorescentes altamente sensibles para detectar O_2 y así poder determinar específicamente la funcionalidad mitocondrial. La ventaja de esta aproximación es que se logra medir el OCR mientras las células permanecen adherentes lo que permite mantener un contexto celular intacto aislando la dinámica mitocondrial, sin embargo, aumenta la dificultad del análisis e interpretación de datos por todas las interferencias a nivel celular que se pueden producir [16, 47]. Las células MCF-7 ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) y MDA-MB-231 ($1,0 \times 10^4$ células/pocillo) fueron sembradas en una XF96-well microplate y se incubaron por 24 h a $37^\circ C$. Luego las células se lavaron con medio de ensayo (Bioscience, Billerica, CA) y se incubaron por 1 h a $37^\circ C$ en una atmósfera libre de CO_2 . Inmediatamente, las células fueron cargadas con medio de ensayo y se realizó un perfil metabólico que evaluó la función mitocondrial de acuerdo al protocolo publicado por Dranka et al. [47]. Luego de medir el OCR basal se inyectaron los moduladores bioenergéticos: Oligomicina ($1 \mu M$), FCCP (100 nM), Rotenona ($1 \mu M$) y Antimicina A ($1 \mu M$). Los parámetros respiratorios fueron calculados de acuerdo a las siguientes fórmulas, donde, la *respiración basal mitocondrial* es igual al OCR basal – OCR no mitocondrial (rot/AA), la *máxima respiración mitocondrial* corresponde a OCR (+CCCP) – OCR no mitocondrial (rot/AA) y el *ATP-linked OCR* se calcula restando el OCR basal – *proton leak* (OCR basal mitocondrial – OCR (+olig)).

5.6. Preparación de mitocondrias y respiración mitocondrial

Una suspensión mitocondrial de 0,5 mg de proteínas/mL es preparada a partir de las células TA3/Ha derivadas de tumor de ratón [48]. Para determinar el efecto de los

compuestos sobre la OXPHOS, el OCR fue monitoreado polarográficamente a 25 ° C con un electrodo de Clark. El medio de respiración contiene 200 mM de sacarosa, 50 mM de KCl, 3 mM de K_2HPO_4 , 2 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, 3mM de HEPES, pH=7,4, y los respectivos sustratos, más 0,25 mM de ADP. Se utilizaron diferentes sustratos oxidables de acuerdo al complejo mitocondrial que se quería estudiar. Glutamato más malato (g, 0,5 M+m, 0,5 M) para estimular la respiración del complejo I, succinato (succ, 1,0 M) para el complejo II, duroquinol (dur, 0,25 M) para el complejo III y TMPD/ASC (0,1 M/1,0 M) para el complejo IV. Usando una concentración de mitocondrias de 0.5 mg/ml se midió la respiración basal en estado II (II_{basal}), la cual depende sólo de la oxidación del sustrato en el medio mitocondrial sin la adición de ADP. Luego la inyección de ADP a nivel de saturación nos permite medir la respiración en estado III fosforilante (III_{ADP}) en donde aumenta la respiración y la ATP sintasa sintetiza ATP. Finalmente se llega a un estado IV que refleja la respiración que permanece una vez convertido todo el ADP en ATP (ver fig. 3A).

5.7. Determinación de la producción de anión superóxido mitocondrial

La producción de anión superóxido mitocondrial se midió usando la tinción con la sonda MitoSOX[®] Red (Invitrogen). $1,5 \times 10^5$ células MCF-7 o MDA-MB-231/mL se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron por 24 h y luego fueron tratadas con DMSO (control) y los compuestos a las concentraciones indicadas por 2 h, se lavaron con PBS e incubaron con MitoSOX Red (5 μ M) por 30 minutos. Las células se colectaron, se lavaron y la fluorescencia fue detectada a través de citometría de flujo.

5.8. Determinación de los niveles de NAD(P)H totales

Los niveles de NAD(P)H se midieron a través de la autofluorescencia de estos dinucleótidos. Se sembraron 5×10^5 células MCF-7/MDA-MB-231/mL en placas de 96 pocillos y se incubaron por 1 hora con PBS. Luego las células se trataron con DMSO (control), rotenona 5 μ M y los compuestos MQ y MQR8 a concentraciones de 10-50 μ M por 2 h. La autofluorescencia se midió usando una longitud de onda de excitación de 340 nm y una de emisión de 428 nm.

5.9. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) fue analizado a través de citometría de flujo, utilizando la sonda potenciométrica tetrametilrodamina metil éster (TMRM, Molecular Probe), la cual se acumula en mitocondrias activas en forma dependiente del $\Delta\psi$. $1,5 \times 10^5$ células MCF-7/mL se sembraron en placas de 24 pocillos para luego ser tratadas con DMSO (control) y los compuestos a las concentraciones indicadas por 2 h. Luego las células se lavaron con PBS y se incubaron con 50 nM de la sonda TMRM por 20 minutos. Luego las células fueron colectadas, lavadas y la fluorescencia fue detectada a través de citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el agente desacoplante de OXPHOS CCCP 200 nM.

5.10. Niveles de ATP intracelular

Los niveles de ATP se determinaron a través de la utilización del sistema luciferin-luciferasa de acuerdo al kit comercial CellTiter-GloLuminescent Cell Viability Assay (Promega, USA). Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células MCF-7 o MDA-MB-231/mL en placas de 96 pocillos y se incubaron en presencia (DMSO como control) a diferentes concentraciones de MQ y MQR8 por 2 h. Luego de la exposición, se midió la bioluminiscencia en un luminómetro BioTek. Como control positivo se utilizó oligomicina 1 μ M, inhibidor de la ATP sintasa y rotenona 1 μ M, conocido inhibidor del complejo I.

5.11. Ensayo de muerte celular

Para determinar el tipo de muerte (apoptosis/necrosis) se utilizó tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio. $2,0 \times 10^5$ células MCF-7/mL fueron sembradas en placas de 24 pocillos y tratadas con MQ y MQR8 (10 y 50 μ M), luego fueron teñidas con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Utilizando citometría de flujo, se construyeron dots plot de AV en el eje X contra PI en el eje Y que se usaron para distinguir entre células viables (PI-/AV-), apoptosis temprana (PI-/AV+), apoptosis tardía (PI+/AV+) y necrosis (PI+/AV-). Las células sin teñir y no tratadas (DMSO) son utilizadas como controles.

5.12. Ensayo de proliferación celular por MTT con combinación de moléculas

Se sembraron 1×10^5 células MCF-7 o MDA-MB-231/mL y fueron expuestas por 48 h a concentraciones crecientes de MQ y a una concentración fija de 0.1 mM de 2-DG. La proliferación celular fue determinada mediante el ensayo por MTT (570 nm).

5.13. Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados son expresados como promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Las comparaciones entre el control y las diferentes condiciones experimentales se realizaron utilizando análisis Anova y la prueba Bonfferoni para determinar la significancia estadística de los resultados mediante el software GraphPad Prisma 5.0. Un $p < 0.05$ se estableció como nivel de significancia.

6. RESULTADOS

6.1. MQ y MQR8 afectan selectivamente la proliferación de células de cáncer mamario humano

MQ es un compuesto que ha presentado actividad antiproliferativa en diferentes líneas tumorales humanas [45], sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción. En este estudio nos propusimos explorar el mecanismo y la eficacia antitumoral de MQ y dos nuevas estructuras relacionadas, MQR8 y MQR16 (**fig. 3A**), en dos líneas representativas de tumor mamario humano. Se utilizó la línea MCF-7 (receptor de estrógenos positiva y p53 nativo) como modelo de fenotipo respiratorio y la línea MDA-MB-231 (receptor de estrógenos negativa, p53 mutante y metastásica) como modelo glicolítico. Mediante el ensayo por MTT, basado en la formación de cristales de formazán, se determinó el efecto sobre la proliferación a distintos tiempos (24, 48 y 72 h). El compuesto MQ inhibe la proliferación de las células MCF-7 (**fig. 3C**) de manera dependiente tanto de la concentración como del tiempo de exposición. En cambio, en la línea MDA-MB-231 no existen diferencias significativas en los IC_{50} con respecto al tiempo de tratamiento, pero sí con la concentración (**fig. 3D**). Por otro lado, MQR8 disminuye la proliferación celular en forma dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento, tanto en las células MCF-7, como en las MDA-MB-231 (**fig. 3C y fig. 3D**, respectivamente). El compuesto MQR16 muestra escasa actividad antiproliferativa en la línea MCF-7 a las 48 h de tratamiento, incluso a las más altas concentraciones estudiadas, con un valor de $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ (**fig. 3B**). Por otro lado, la línea normal, MCF10A, resultó ser más resistente a la acción de MQ y MQR8 (**fig. 3E**) a los distintos tiempos ensayados y efectos significativos en la proliferación celular sólo se observan a altas concentraciones (50 μM y 100 μM). Basado en estas observaciones, se seleccionaron los compuestos MQ y MQR8 en un rango de concentraciones de 10-50 μM para los próximos experimentos.

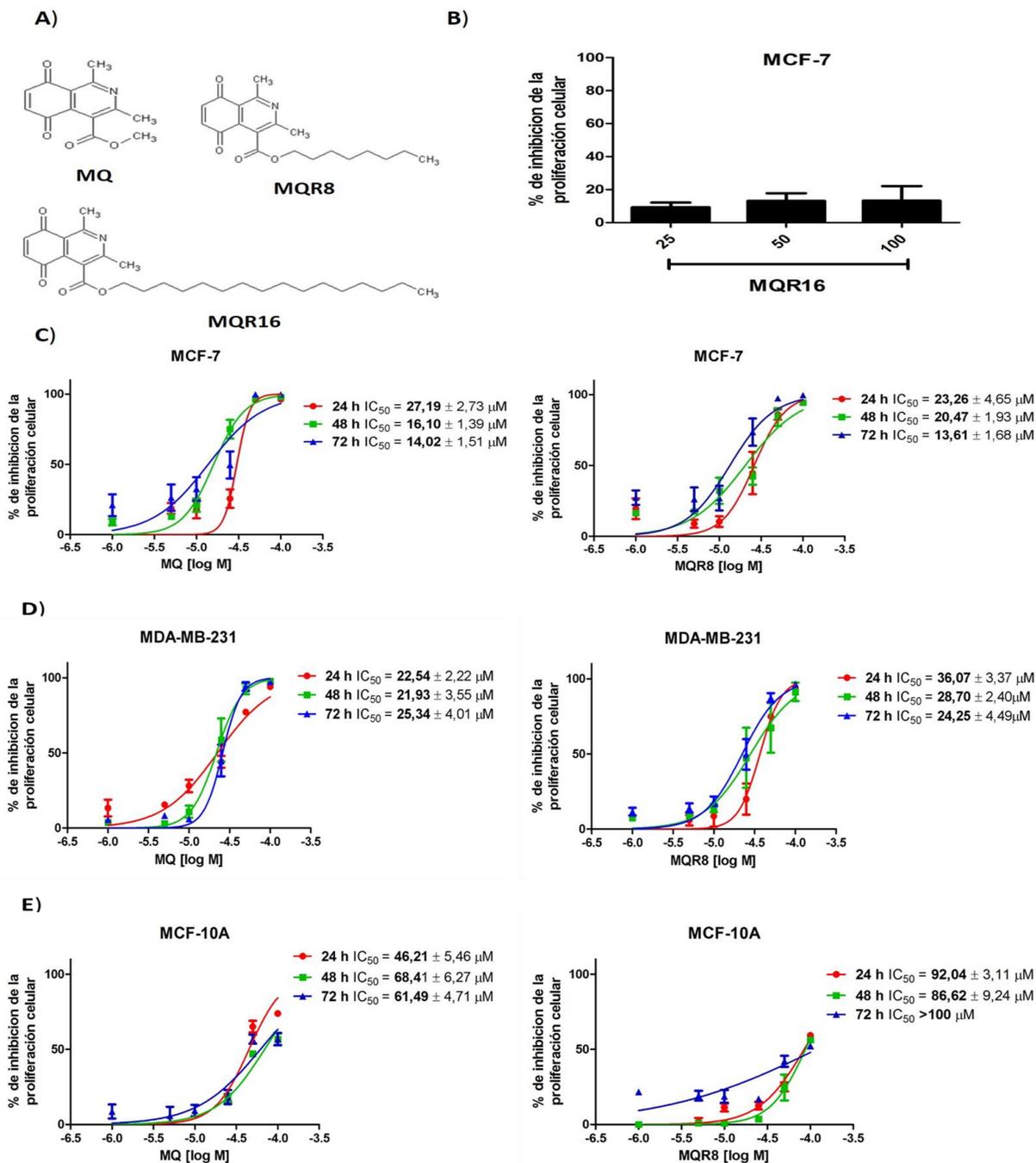


Figura 3. MQ y MQR8 afectan selectivamente la proliferación de células de tumor de mama humano. (A) Estructura química de la serie MQ. Efecto de MQR16 sobre la proliferación celular, mediante el ensayo por MTT, en la línea celular MCF-7 (B) a 48 h y de MQ y MQR8 sobre las líneas MCF-7 (C), MDA-MB-231 (D) y MCF10A (E) a 24, 48 y 72 h a concentraciones crecientes de los compuestos. Los datos son expresados como promedio \pm SEM, (N = 5).

6.2. MQ y MQR8 producen cambios en los parámetros respiratorios mitocondriales en células MCF-7 y MDA-MB-231.

Con el propósito de evaluar el efecto de los compuesto MQ y MQR8 sobre la bioenergética mitocondrial, se midió el OCR celular como un indicador de la fosforilación oxidativa utilizando un XF96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience) en células intactas MCF-7 y MDA-MB-231. Para determinar el efecto de los compuestos MQ y MQR8 sobre la función bioenergética en las células tumorales de mama se utilizó el protocolo publicado por Dranka et al. [47], con algunas modificaciones (ver materiales y métodos). Esta aproximación hace uso de distintos moduladores mitocondriales para determinar varios parámetros respiratorios que dan cuenta de la función mitocondrial. El OCR en las células tumorales fue evaluado utilizando la inyección secuencial de los modulares mitocondriales: oligomicina, FCCP y rotenona/Antimicina A. La inyección de oligomicina, un conocido inhibidor de la subunidad F_0 de la ATP sintasa, disminuye el flujo de electrones y consecuentemente el OCR, siendo un indicador de la respiración utilizada para la síntesis de ATP. El agente desacoplante FCCP, nos permite estudiar el efecto cuando la respiración se encuentra en su máximo estado de flujo de electrones. Finalmente rotenona/Antimicina A (rot, inhibidor del complejo I y AA, inhibidor del complejo III, respectivamente) permite obtener la respiración no mitocondrial.

El compuesto MQ fue capaz de modificar los parámetros respiratorios mitocondriales, tanto en células tumorales MCF-7 como MDA-MB-231. Por un lado, MQ aumenta el OCR basal, con respecto al control, en ambas líneas tumorales, tal incremento es más pronunciado en la línea MDA-MB-231 (**fig. 4A y 4D**). La fracción de la respiración utilizada para la síntesis de ATP (ATP-linked OCR) y la máxima respiración mitocondrial fue examinada utilizando oligomicina y FCCP, respectivamente. El tratamiento de las células MCF-7 con MQ resulta en una disminución significativa en el ATP-linked OCR y de la máxima respiración mitocondrial con respecto al control (**fig. 4B y 4C**), dicho efecto se vuelve evidente a una concentración de 25 μ M. Por otro lado, en las células MDA-MB-231, MQ disminuye la máxima respiración mitocondrial y aumenta en forma significativa el

ATP-linked OCR (**fig. 4E y 4F**), sin embargo, dicho incremento se puede deber al marcado efecto del compuesto en la OCR basal en dicha línea tumoral. Los resultados anteriores indican que MQ al inhibir la máxima respiración mitocondrial podría afectar el transporte de electrones a nivel de la CTE mitocondrial y al afectar la ATP-linked OCR podrían verse alterados los niveles de ATP de origen mitocondrial.

El compuesto MQR8 disminuye el OCR basal en ambas líneas tumorales con respecto al control (**fig. 4A y 4D**), sin embargo, el efecto sólo fue significativo en las células MCF-7 a 25 μM . Además, el tratamiento con MQR8 fue capaz de disminuir significativamente, tanto el ATP-linked OCR como la máxima respiración mitocondrial en MCF-7 (**fig. 4B y 4C**) y MDA-MB-231 (**fig. 4E y 4F**), evidenciándose un marcado efecto a una concentración de 25 μM . Estos resultados sugieren que MQR8 podría generar alguna alteración en la CTE mitocondrial y también en los niveles de ATP provenientes de este organelo. Junto a lo anterior estos resultados nos sugieren que la respiración mitocondrial de estas líneas tumorales podría verse afectada por este tipo de compuestos.

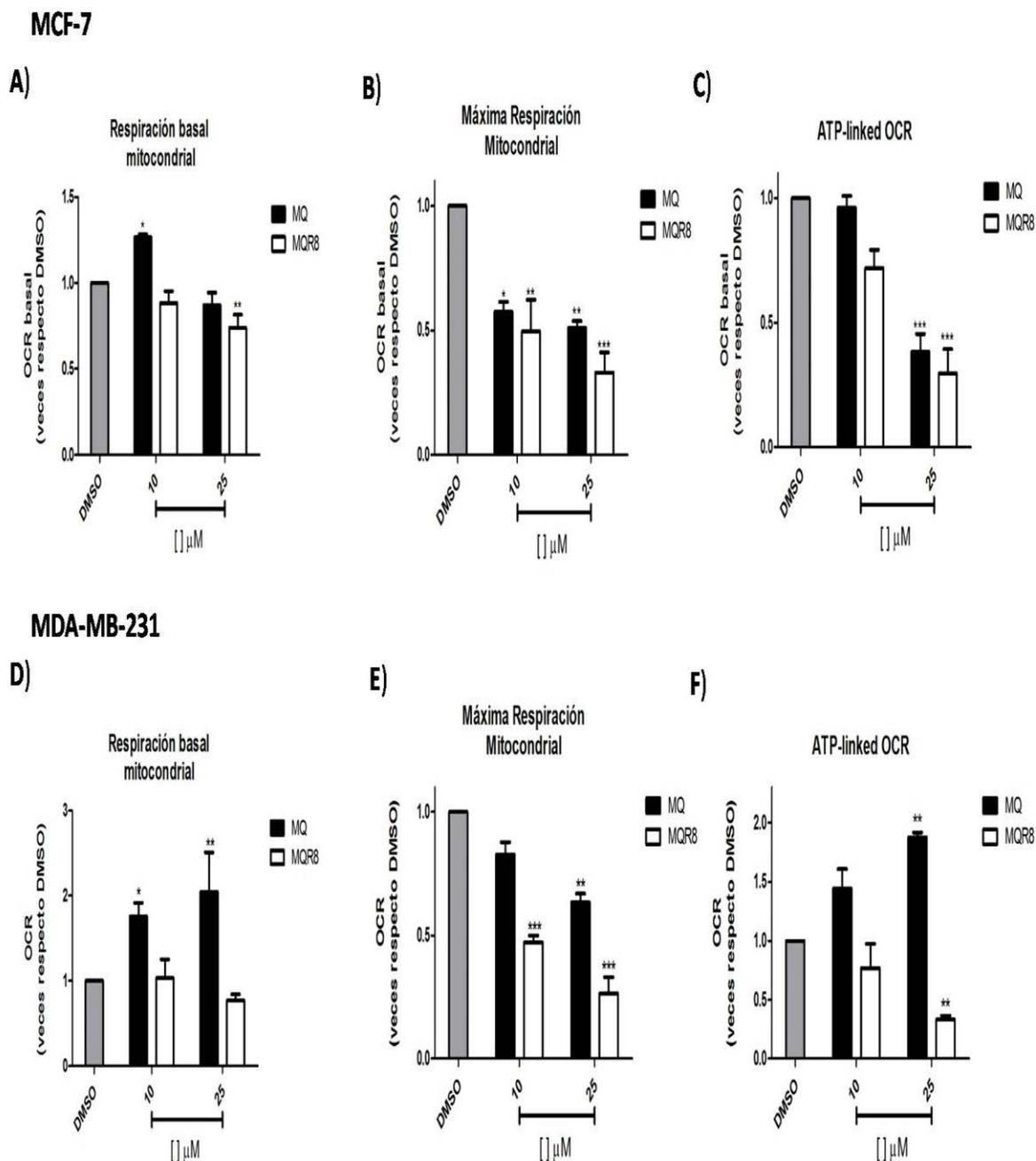


Figura 4. **MQ y MQR8 producen cambios en los parámetros respiratorios mitocondriales en células MCF-7 y MDA-MB-231.** El efecto de los compuestos sobre consumo de O₂ en células enteras fue determinado en tiempo real utilizando un XF96 Extracelular Flux Analyzer (ver métodos). Cambios en los parámetros metabólicos producidos por MQ y MQR8 en la respiración basal mitocondrial, la máxima respiración mitocondrial y el ATP-linked OCR en células MCF-7 (A-C) y MDA-MB-231 (D-F). Los datos se muestran como promedio ± SEM, (N = 3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control (DMSO).

6.3. MQ y MQR8 producen cambios en los estados respiratorios en mitocondrias aisladas de tumores de ratones TA3/Ha.

Debido a que MQ y MQR8 tienen marcados efectos sobre OXPHOS nos propusimos estudiar posibles interacciones a nivel de la cadena de transporte de electrones en mitocondrias aisladas. Nuestro modelo de mitocondrias aisladas obtenidas desde tumores ascíticos de ratones TA3/Ha nos permite contar con una gran cantidad de mitocondrias (cantidad no comparativa si aislamos desde cultivos celulares como MCF-7 y MDA-MB-231), obtener información a nivel de cada complejo mitocondrial y poder extrapolar los datos a un nivel de células humanas.

El OCR se midió polarográficamente a 25 °C con un electrodo de Clark en mitocondrias aisladas. El trazo representativo del OCR estimulando a nivel de complejo I con G+M, del control (DMSO) y MQ 10 μ M (**fig. 5A y 5B, respectivamente**) nos muestra que el compuesto es capaz de producir un explosivo aumento del OCR en estado II_{basal} sin afectar mayormente el estado III_{ADP}. Este incremento en el OCR llega a 5 veces con respecto al control cuando la concentración de MQ es de 25 μ M (**fig. 5C**). Quisimos saber si este efecto sólo se produce cuando la respiración mitocondrial depende del complejo I, para lo cual utilizamos diferentes sustratos oxidables para cada complejo. El incremento en el OCR en estado II_{basal} antes visto para MQ se mantiene independiente del complejo que esté estimulado, sin embargo, el mayor efecto fue cuando los complejo I y III tenían sustratos (**fig. 5D**). Estos resultados sugieren que la acción de MQ podría estar mediada por procesos redox mitocondriales. Por otro lado, el trazo representativo del control (**fig. 5E**) y de MQR8 (**fig. 5F**) 10 μ M, cuando se estimula el complejo I nos muestra un efecto inhibitorio significativo sobre el estado III_{ADP}. La disminución del OCR en estado III_{ADP} llega a cerca de 0.5 y 0.8 veces con respecto al control, a una concentración de MQR8 de 10 μ M y 25 μ M, respectivamente (**fig. 5G**). Si el complejo I es el que se encuentra inhibido por efecto de MQR8, al agregar otros sustratos de los complejos respiratorios mitocondriales debería restablecer el OCR. Los sustratos para el complejo II, III y IV usados fueron SUCC, DUR y TMPD/ASC, respectivamente, los cuales son capaces de restablecer el OCR cuando

este se encontraba inhibido por MQR8 (fig. 5H), sugiriendo fuertemente la participación del complejo I en el efecto de este compuesto.

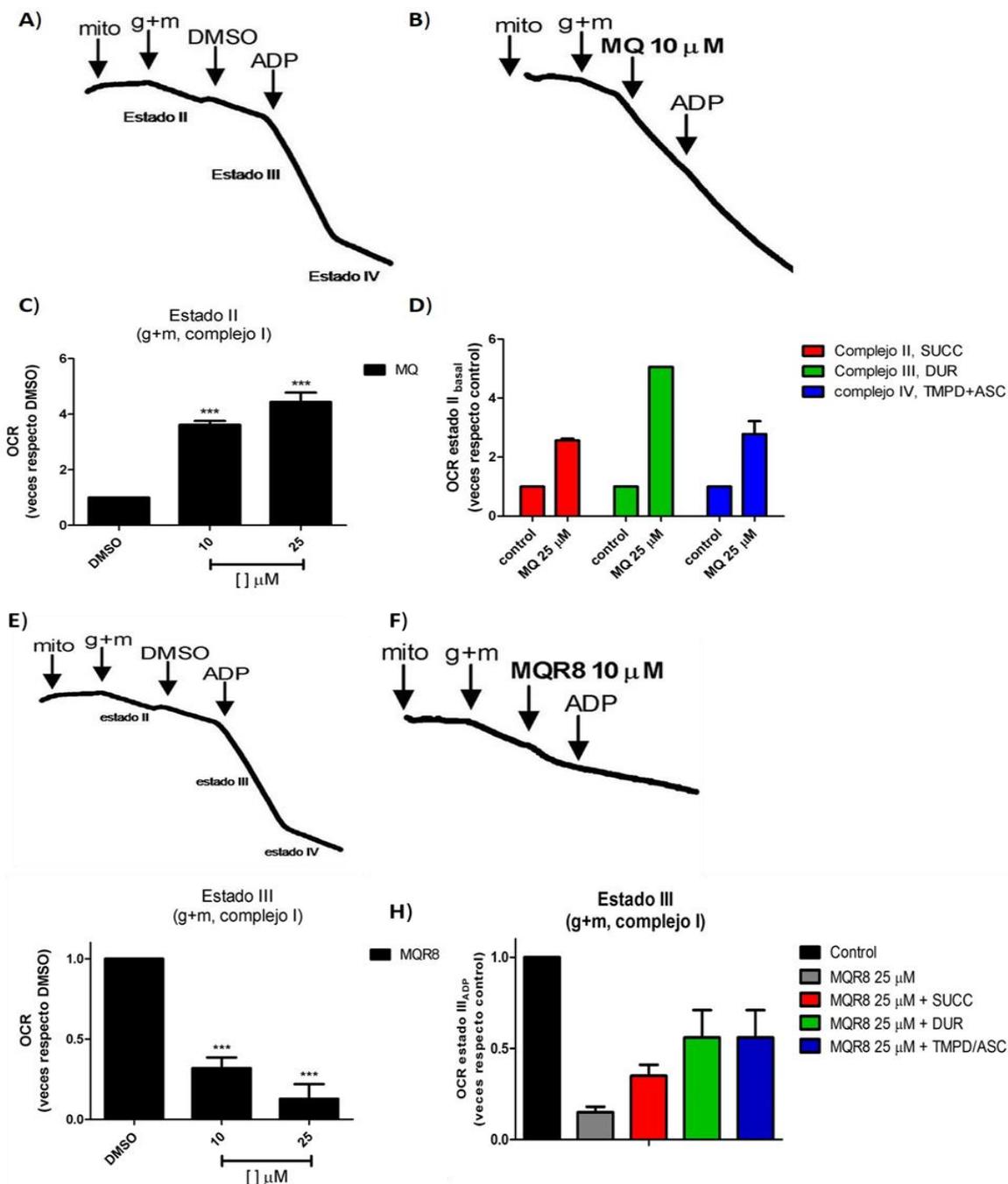


Figura 5. MQ y MR8 alteran los estados respiratorios en mitocondrias aisladas de células TA3/Ha. El efecto de los compuesto MQ y MQR8 sobre la respiración de mitocondrias aisladas de células Ta3/Ha se midió utilizando un electrodo de Clark (ver métodos). Cambios en el estado II_{basal} por efecto de MQ cuando es estimulado el complejo I (A-C) y los complejos II, III y IV (D).

Inhibición de la respiración en estado III_{ADP} por efecto de MQR8 cuando es estimulado el complejo I (E-G) y restauración de la respiración por los sustratos de los complejos II, III y IV cuando este se encontraba inhibida por efecto de MQR8 (H). Los datos se muestran como promedio \pm SEM, (N = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control (DMSO).

6.4. Efecto de MQ y MQR8 sobre la producción de anión superóxido mitocondrial y niveles de NAD(P)H totales

A nivel subcelular la mitocondria resulta ser un importante productor de ROS, debido al constante flujo de electrones a través de los complejos mitocondriales (principalmente a nivel de los complejos I y III) y la concentración de O₂ en este compartimento. Con el antecedente de que los compuestos MQ y MQR8 tienen la capacidad de alterar estados de la respiración mitocondrial, nos propusimos estudiar si tales efectos tienen alguna consecuencia en los niveles de anión superóxido mitocondrial. Para probar esta posibilidad usamos la sonda semi-cuantitativa MitoSox Red (molecular Probe), la cual se acumula en la mitocondria y se oxida en presencia de superóxido. Sin embargo, esta sonda presenta algunos problemas que se relacionan con su dependencia al $\Delta\psi$ y la pérdida de selectividad con respecto al tipo de especies radicalarias que detecta. MQ produce un aumento en la producción de anión superóxido mitocondrial dependiente de la concentración en ambas líneas de tumor, sin embargo, tal aumento es mayor en la línea MDA-MB-231 (**fig. 6A**). Por otro lado, MQR8, sólo en la línea MDA-MB-231, produce un aumento significativo en la producción de anión superóxido mitocondrial (**fig. 6B**).

NADPH es requerido para mantener un ambiente reductor en la célula, siendo esencial para muchas vías biosintéticas y para proteger del daño oxidativo por especies radicalarias como peróxido de hidrógeno y anión superóxido. Por otra parte, a nivel mitocondrial el complejo I utiliza como cofactor el NADH (se oxida a NAD⁺) para la reducción de ubiquinona a ubiquinol y la transferencia de cuatro protones desde la matriz al espacio intermembrana mitocondrial. Inhibidores del complejo I como la rotenona tienen la capacidad de producir una acumulación de NADH. Debido a que los compuestos MQ y MQR8 afectan OXPHOS y además producen un aumento significativo en los niveles de anión superóxido mitocondrial a las 2 h de tratamiento, nos propusimos estudiar el efecto

en los niveles de NAD(P)H en las líneas tumorales de mama tras 2 h de exposición a los compuestos. El compuesto MQ fue capaz de disminuir los niveles de NAD(P)H en ambas líneas tumorales de una manera dependiente de la concentración. Inesperadamente, MQR8 (posiblemente un inhibidor de OXPHOS a nivel de complejo I) también disminuyó de forma dependiente de la concentración los niveles de NAD(P)H en ambas líneas tumorales, sin embargo, el efecto es menor que MQ. Como era de esperar, el control con rotenona 5 μ M fue capaz de producir una acumulación de aproximadamente 2 y 1,5 veces en los niveles de NAD(P)H con respecto al control en MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente (fig. 6C y 6D).

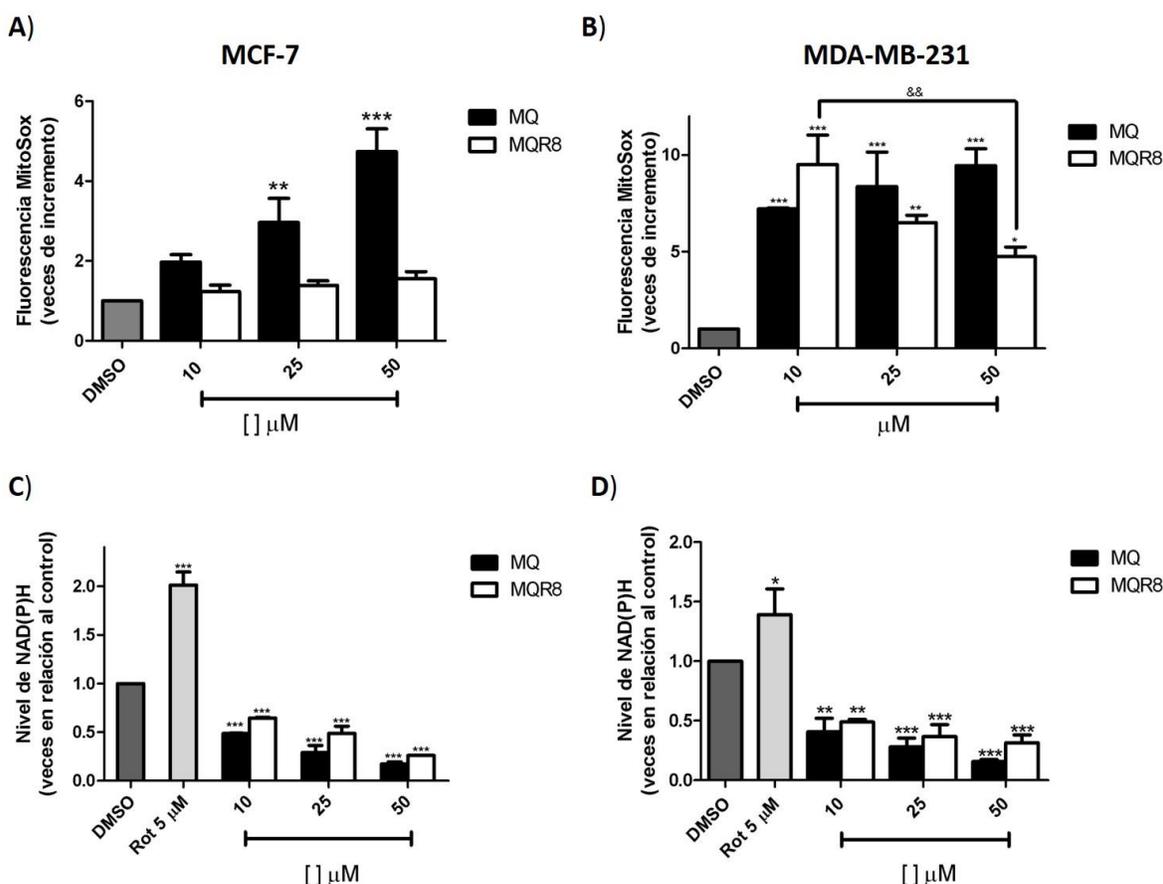


Figura 6. Efectos de MQ y MQR8 sobre la producción de anión superóxido mitocondrial y los niveles de NAD(P)H totales. La producción de \cdot O₂⁻ mitocondrial se midió utilizando la sonda específica MITOSOX™ Red midiendo la fluorescencia a través de citometría de flujo tras 2 horas de exposición a los compuestos MQ y MQR8 en las líneas MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B). Los niveles de NAD(P)H se midieron utilizando la autofluorescencia de estos dinucleótidos de nicotinamida

tras 2 h de exposición a MQ y MQR8 en las líneas MCF-7 (C) y MDA-MB-231 (D). Los datos se muestran como promedio \pm SEM, (N = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control (DMSO).

6.5. MQ y MQR8 producen un colapso del $\Delta\psi$ en células MCF-7

Los complejos mitocondriales I, III y IV son responsables del bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana, produciendo un gradiente electroquímico (diferencia en pH y distribución de cargas) a través de la membrana interna, conocido como $\Delta\psi$. La ATP sintasa es capaz de utilizar este gradiente de protones para generar ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (Pi) [49, 50]. Moléculas con la capacidad de afectar el transporte de electrones a nivel mitocondrial o desacoplar la OXPHOS interfieren en la mantención del $\Delta\psi$ [51, 52], por lo que nos propusimos investigar los cambios en el $\Delta\psi$ en células MCF-7 tras 2 h de tratamiento con MQ y MQR8. Utilizando la sonda TMRM, se observa que MQ y MQR8 producen una disminución significativa y dependiente de la concentración en la intensidad de fluorescencia de la sonda, lo que refleja la pérdida del $\Delta\psi$ en células MCF-7 (fig. 7).

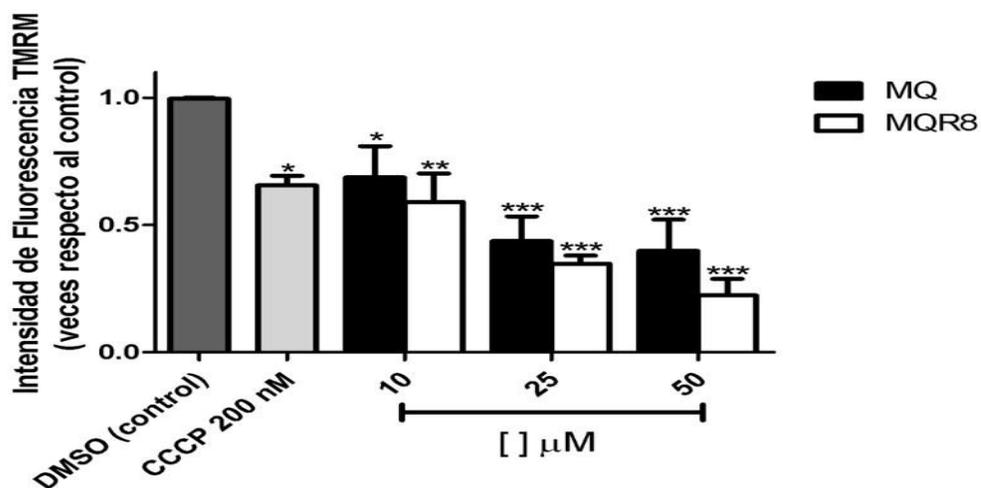


Figura 7. MQ y MQR8 producen una disminución del $\Delta\psi$ dependiente de la concentración en células MCF-7. El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) se midió utilizando la sonda tetrametil rodaminametil éster (TMRM). La fluorescencia se registró utilizando citometría de flujo luego de 2 horas de tratamiento con los compuestos MQ y MQR8. Los datos se muestran como promedio \pm SEM, (N = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control (DMSO).

6.6. Efecto de MQ y MQR8 en los niveles de ATP intracelulares

Los niveles de ATP son un indicador de la función normal de OXPHOS, por lo que nos propusimos investigar si la inhibición de la respiración mitocondrial producida por MQ y MQR8 tiene consecuencias en los niveles totales de ATP en las células tumorales tras 2 h de tratamiento. En la línea MCF-7, ambos compuestos producen una disminución significativa con respecto al control en los niveles de ATP intracelulares en el rango de concentraciones intermedias (10-50 μM) y no a bajas concentraciones (1-5 μM), por ejemplo, MQ y MQR8 1 μM no afectan significativamente los niveles de ATP, pero a una concentración de 10 μM los disminuyen alrededor de 0,3 veces y 0,5 en relación al control, respectivamente (**fig. 8A**). Por otra lado, la línea MDA-MB-231 (**fig. 8B**) fue más resistente a la disminución en los niveles de ATP totales que las células MCF-7 por acción de ambos compuestos, produciendo una disminución significativa en los niveles de ATP intracelulares a partir de concentraciones de 25 μM . Estos resultados concuerdan con observaciones anteriores, debido a que las disminuciones del ATP-linked OCR y de la máxima OCR mitocondrial producidas por estos compuestos impactaron directamente en los niveles de ATP intracelulares.

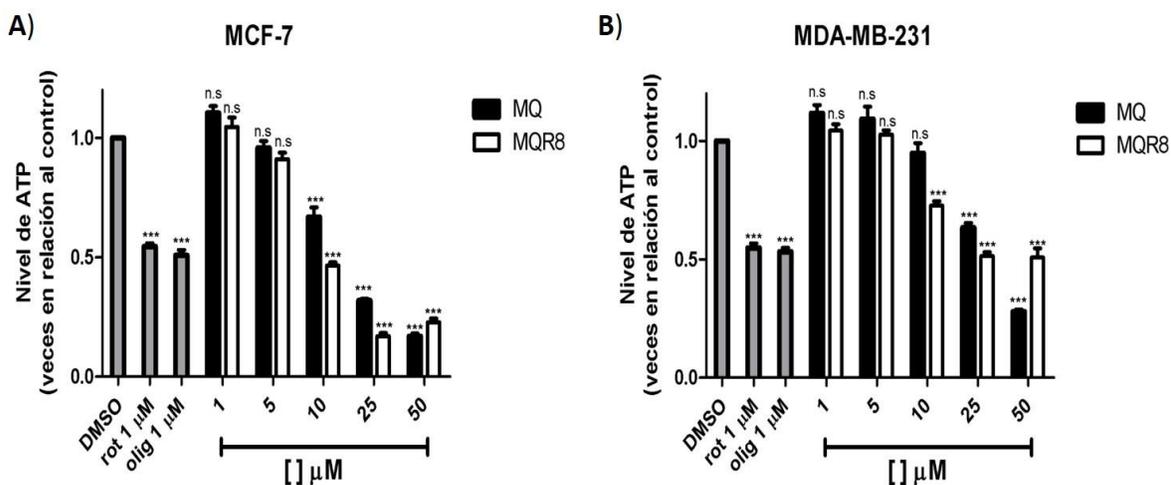


Figura 8. MQ y MQR8 disminuyen significativamente los niveles de ATP a las 2 horas de tratamiento en la línea MCF7 (A), pero de forma más atenuada en la línea MDA-MB-231 (B). Los niveles de ATP se determinaron tras 2 horas de exposición a los compuestos mediante sistema luciferin/luciferasa. Los datos se muestran como promedio \pm SEM, (N = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control (DMSO).

6.7. MQ induce muerte celular del tipo apoptótica en células de tumor mamario

Nos propusimos investigar si la disfunción mitocondrial producida por el compuesto MQ (representativo de la serie) es capaz de desencadenar eventos de muerte en células de tumor de mama humano MCF-7. Después de la incubación de las células MCF-7 (fig. 9A y 9B) y MDA-MB-231 (fig. 9C y 9D), con concentraciones crecientes de MQ por 24 h, se observa un incremento significativo en las células apoptóticas AV+, alcanzando un $71,96 \pm 2,24\%$ y $91,51 \pm 3,83\%$ a $50 \mu\text{M}$ en MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente.

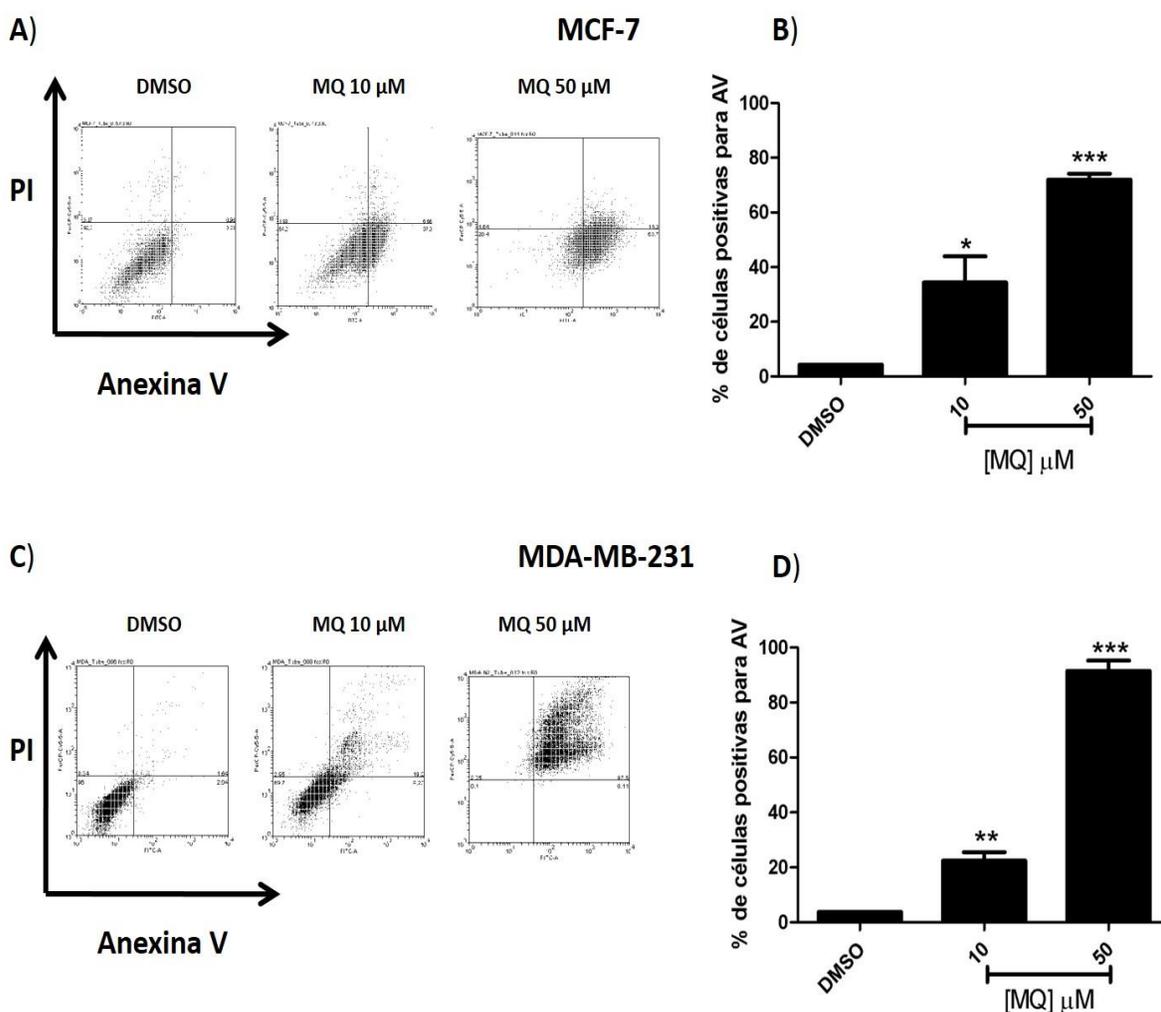


Figura 9. MQ induce muerte celular del tipo apoptótica en células de tumor mamario. Las células MCF-7 (A-B) y MDA-MB-231 (C-D) fueron expuestas por 24 horas a concentraciones de 10 y 50 μM del compuesto MQ. Las diferentes subpoblaciones fueron analizadas por citometría de flujo.

Los datos se muestran como promedio \pm SEM, las condiciones fueron realizadas en cuadruplicado en dos experimentos independientes (N= 2). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control (DMSO).

6.8. Efecto en la proliferación por acción combinada de MQ y 2-DG

Diversos estudios en el último tiempo han demostrado que el conocido inhibidor glicolítico, 2-DG es capaz de aumentar los efectos antitumorales de compuestos con acción mitocondrial. Dicho efecto se relaciona con procesos tales como: la disminución de los niveles de ATP, aumento en producción de ROS, inhibición de la autofagia, entre otros [9, 37-39]. Por lo tanto, nos propusimos investigar si la combinación de la molécula MQ (con acción mitocondrial) con 2-DG tiene algún efecto sobre sus propiedades antitumorales. Evaluamos la proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231 a través del ensayo de MTT a distintas concentraciones de MQ y a una concentración fija de 0.1 mM de 2-DG, esta concentración fue seleccionada debido a que el efecto en la proliferación era menor al 10 % tras 48 h de tratamiento. Como se muestra en la **fig. 10A y 10B** MQ tiene una leve actividad antiproliferativa en ambas líneas tumorales a bajas concentraciones. Pero, cuando se combina con 2-DG su efecto aumenta significativamente. Por ejemplo, en la línea MDA-MB-231 (que resultó ser más sensible al tratamiento combinado) MQ 5 μ M y 2-DG 0,1 mM por sí solos, reducen la proliferación celular con respecto al control, sólo en un $3,33 \pm 0,31\%$ y $4,04 \pm 1,00\%$, respectivamente. Pero la combinación fue capaz de reducir en un $33,36 \pm 0,27$ la proliferación con respecto al control. Estos resultados sugieren que la combinación de ambas moléculas es más eficaz en reducir la proliferación de ambas líneas tumorales que los agentes en forma individual.

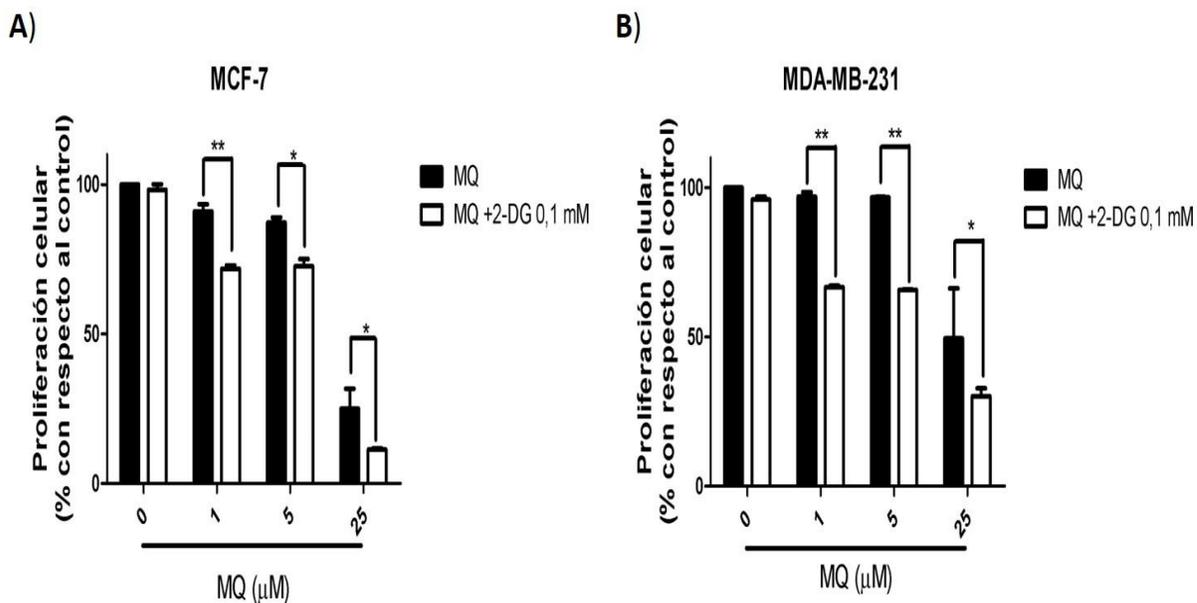


Figura 10. La combinación de MQ con 2-desoxi-glucosa (2-DG) es capaz de producir una mayor disminución en la proliferación de las líneas tumorales MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B) que ambos compuestos por si solos tras 48 h de tratamiento. Efecto combinado del compuesto MQ con 2-DG (inhibidor de la glicolisis). La proliferación fue medida a través del ensayo de MTT y los datos normalizados con respecto al control (DMSO). Los datos son expresado como promedio \pm SEM, (N = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, MQ vs MQ + 2-DG.

7. DISCUSIÓN

Todas las células son capaces de sobrevivir y crecer debido a diferentes procesos metabólicos como la glicólisis, OXPHOS, ciclo de Krebs, entre otros. Los que permiten obtener energía en forma de ATP y macromoléculas para crear los distintos bloques celulares. Las células en proliferación y más aún, las células neoplásicas, tienen diferencias considerables en las vías metabólicas. Es en este sentido, que las últimas usan diversas vías para mantener su creciente necesidad de macromoléculas y rápida proliferación, logrando así la supervivencia, incluso en los ambientes hostiles que rodean al tumor, los cuales se caracterizan por una baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno (hipoxia) [53, 54]. Las modificaciones metabólicas que sustentan la proliferación tumoral se encuentran ampliamente estudiadas y entre estas destacan: la preferencia de las células tumorales por la glicólisis, elevada utilización de la glutamina, alteraciones en el ciclo de Krebs y vía de la pentosas, entre otras [55]. Por lo anterior, el metabolismo tumoral se ha transformado en una interesante opción para el desarrollo de agentes antitumorales.

En este trabajo se estudió la actividad antitumoral frente a dos líneas representativas de cáncer de mama humano de tres isoquinolinquinonas relacionadas químicamente, las cuales tienen modificaciones en el largo de cadena del éster (fig. 3A). MQ y MQR8 afectaron significativamente la proliferación de ambas líneas tumorales, con valores que se encuentran entre los 10 y 30 μM . Adicionalmente ambos compuestos presentaron un efecto mucho menor en la línea celular normal. Por otra parte, el compuesto MQR16 no presentó actividad antiproliferativa en las líneas estudiadas. Ésteres derivados de compuestos como el ácido gálico, con cadenas alquílicas de diferentes largos han demostrado favorables propiedades farmacológicas, relacionadas con el incremento en la afinidad por membranas celulares y permeabilidad. En donde cadenas de 8 a 12 carbonos resultaron ser las más activas en términos antitumorales [46]. Aquí demostramos que para isoquinolinquinonas, cadenas muy largas (16 carbonos) no tienen actividad antitumoral y que cadenas intermedias (8 carbonos) presentaron actividades similares a la más corta (1 carbono) contra líneas de cáncer de mama humanas, sin embargo, el

compuesto de 8 carbonos mejoró la selectividad en relación a compuesto con 1 carbono. Estos resultados muestran que un incremento muy alto en la lipofilia del compuesto MQ produce la pérdida de su actividad antitumoral y que un incremento intermedio permitió mejorar las propiedades antitumorales de la molécula parental.

Debido a los núcleos quinónicos presentes en MQ y MQR8, es posible que la mitocondria fuese uno de los blancos por los cuales estos compuestos ejerzan su efecto antitumoral. Por tal motivo, nos propusimos estudiar el efecto de los compuestos sobre la bioenergética mitocondrial en células tumorales de mama. Los resultados indican que MQ tiene la capacidad de alterar los parámetros respiratorios mitocondriales en las líneas tumorales, produciendo un incremento en el OCR basal, disminución de la máxima respiración mitocondrial y del ATP-linked OCR en la línea tumoral MCF-7. Sin embargo, este compuesto mostró un comportamiento distinto en la línea MDA-MB-231, donde sólo disminuye la máxima respiración, con un incremento significativo de la respiración basal y del ATP-linked OCR (fig. 4). Además, en mitocondrias aisladas de células TA3 MQ fue capaz de incrementar el OCR en estado II_{basal} independiente del complejo mitocondrial que se encuentre estimulado (fig. 5). Estos resultados sugieren que el compuesto afecta procesos de transporte de electrones a nivel mitocondrial. Alteraciones en el flujo de electrones mitocondrial son capaces de incrementar los niveles de producción de ROS [16]. Asimismo, una gran variedad de compuestos antitumorales tienen la capacidad de aumentar la producción de ROS mitocondrial al desestabilizar distintos componentes de este organelo [56-58]. Los niveles de anión superóxido mitocondrial son incrementados por el tratamiento con MQ y los niveles de NAD(P)H totales a nivel celular se reducen por acción del compuesto en las líneas tumorales, indicando la alteración del balance redox por acción de MQ. Por otro lado, si la función mitocondrial se encuentra comprometida su función de síntesis de ATP se encontrará afectada, MQ fue capaz de producir una disminución significativa de los niveles de ATP totales en las líneas tumorales. Estos resultados en su conjunto sostienen la idea de que el compuesto tiene la capacidad de producir una perturbación mitocondrial a varios niveles, la cual puede ser la responsable

de la actividad antitumoral, existiendo una gran cantidad de compuestos antitumorales con acción similar a nivel mitocondrial [44, 51, 52, 57, 59-61].

El nuevo compuesto MQR8 presentó similares efectos que MQ en la bioenergética mitocondrial en las células tumorales. Pero existen algunas diferencias que deben ser mencionadas. El compuesto MQR8 fue capaz de disminuir la función mitocondrial en ambas líneas celulares que se refleja en el efecto inhibitorio de la respiración basal mitocondrial, la respiración reflejada por el flujo máximo de electrones y el ATP-linked OCR en ambas líneas tumorales (fig. 4). Además, se pudo establecer que MQR8 inhibió el OCR en estado III_{ADP} en mitocondrias aisladas de células TA3/Ha y este efecto fue dependiente del complejo I (fig. 5). Por otra parte, MQR8 aumentó los niveles de anión superóxido mitocondrial, pero sólo son significativos en la línea MDA-MB-231, junto con ésto, los niveles de NAD(P)H se vieron significativamente disminuidos en ambas líneas tumorales. Los resultados anteriores no concuerdan del todo, debido a que en la línea MCF-7 el compuesto MQR8 no fue capaz de aumentar significativamente los niveles de ROS mitocondrial, pero si disminuyó significativamente los niveles de los equivalentes reducidos al mismo tiempo de exposición (fig. 6). Esto puede significar que MQR8 en la línea MCF-7 podría producir otra especie de ROS (como peróxido de hidrógeno) capaz de consumir las defensas redox, o bien estar implicado en otros procesos celulares dependientes de NAD(P)H (por ejemplo procesos redox dependientes de reductasas/oxidasas citoplasmáticas). Los niveles de ATP totales también se vieron afectados al disminuir significativamente por la acción de MQR8 en las líneas tumorales (fig. 8). Resultados que concuerdan con la disminución del ATP-linked OCR y del efecto inhibitorio a nivel de complejo I mitocondrial. Estos resultados en su conjunto muestran que MQR8 al igual que MQ producen una perturbación de la función mitocondrial en las células tumorales, sin embargo, se evidenciaron cambios en su modo de acción.

Adicionalmente, existen enzimas encargadas de la detoxificación de quinonas. Una de las más importantes es la NAD(P):quinona oxido reductasa (NQO1), la cual reduce la quinona directamente a la hidroquinona, evitando la aparición del intermediario altamente

reactivo, semi-quinona [62]. Existe un rol dual de este enzima, debido a que algunos compuestos antitumorales son inactivados por esta enzima, como por ejemplo, la timoquinona [63] y otros son activados, como por ejemplo, la β -lapachone, desoxiniboquinone y estreptonigrina [64, 65]. La mayoría de las quinonas sufren un proceso celular llamado ciclaje redox, en el cual enzimas como la NQO1 o la NADPH citocromo P450 reductasa catalizan reacciones de transferencia de 1 o 2 electrones, resultando la formación de la semi-quinona e hidroquinona, respectivamente. La semi-quinona puede reaccionar con el oxígeno y generar superóxido, por lo que los procesos de ciclaje redox de quinonas se caracteriza por un aumento en OCR basal, consumo de NAD(P)H y producción de ROS [66]. También, se ha reportado una sobreexpresión de la NQO1 en varias líneas tumorales, principalmente en cáncer de pulmón, de páncreas, próstata y mama. La línea tumoral MCF-7 tiene elevados niveles de NQO1, [63] por lo que este aspecto sumado a que químicamente MQ y MQR8 son quinonas no se puede descartar la influencia de esta enzima y procesos redox en el efecto celular de estas isoquinolinquinonas.

La mitocondria juega un papel fundamental en los procesos apoptóticos inducidos por agentes antitumorales [67]. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa con la consecuente liberación de proteínas pro-apopticas desde el espacio intermembrana son eventos que las células tumorales son capaces de inhibir o inactivar, sin embargo, la sensibilización a muerte celular programada por compuestos resulta atractivo para el diseño de nuevos fármacos [68, 69]. El colapso del $\Delta\psi$ y la formación del poro transición mitocondrial son eventos necesarios para la inducción de procesos apoptóticos. Al mismo tiempo que, la disrupción de las funciones mitocondrial por agentes antitumorales, las cuales aumentan la producción de ROS, inhiben la respiración mitocondrial o desacoplan la OXPHOS son capaces de gatillar la permeabilización de membrana externa mitocondrial y producir muerte celular [70]. Ambos compuestos tienen la capacidad de producir un colapso en el $\Delta\psi$ en las células MCF-7 (fig. 7) y tal efecto podría estar relacionado con la inducción de apoptosis de MQ (fig. 9) en las líneas tumorales.

Investigaciones recientes se han centrado los estudios en la búsqueda de compuestos que inhiban el metabolismo celular del tumor. Una de las primeras observaciones de la biología tumoral, se relacionó con la preferencia que tienen las células tumorales por un metabolismo glicolítico en vez de uno oxidativo. Sin embargo, el uso de inhibidores glicolíticos como agentes terapéuticos no han mostrado los resultados esperados [71]. Nuevas aproximaciones tienen como blanco el ataque de múltiples vías metabólicas para lograr así mayores efectos antitumorales [72]. Investigaciones han usado agentes que inhiben OXPHOS (rotenona, antimicina, oligomicina) junto con inhibidores glicolíticos para erradicar las células tumorales [73]. Esta aproximación se basa en el hecho de que un compromiso de la OXPHOS estimula un metabolismo glicolítico para la generación de ATP y que el ataque de ambas vías puede ser una efectiva estrategia para eliminar células tumorales [74]. Fue puesto a prueba el efecto combinado del compuesto MQ (con efecto a nivel mitocondrial) junto con la 2-DG (efecto a nivel glicolítico) sobre la proliferación de las líneas tumorales de mama. Interesantemente, el efecto de la combinación fue mayor que el efecto de los compuestos por separado en ambas líneas tumorales (fig. 10). Efectos similares se han observado al combinar otros compuestos con blanco mitocondrial y 2-DG, mecanismos como la disminución de los niveles de ATP, aumento en producción de ROS, inhibición de la autofagia pueden ligarse al aumento del efecto antiproliferativo [9, 36-39]. Estos resultados sugieren que el ataque al metabolismo glicolítico y oxidativo de las células tumorales de mama podría ser un interesante acercamiento para el tratamiento esta enfermedad.

El efecto de los compuesto sobre la bioenergética tumoral estudiados en este trabajo se resumen en el modelo propuesto (fig. 11), el cual da cuenta de las principales alteraciones en los parámetros mitocondriales producidas por las isoquinolinquinonas.

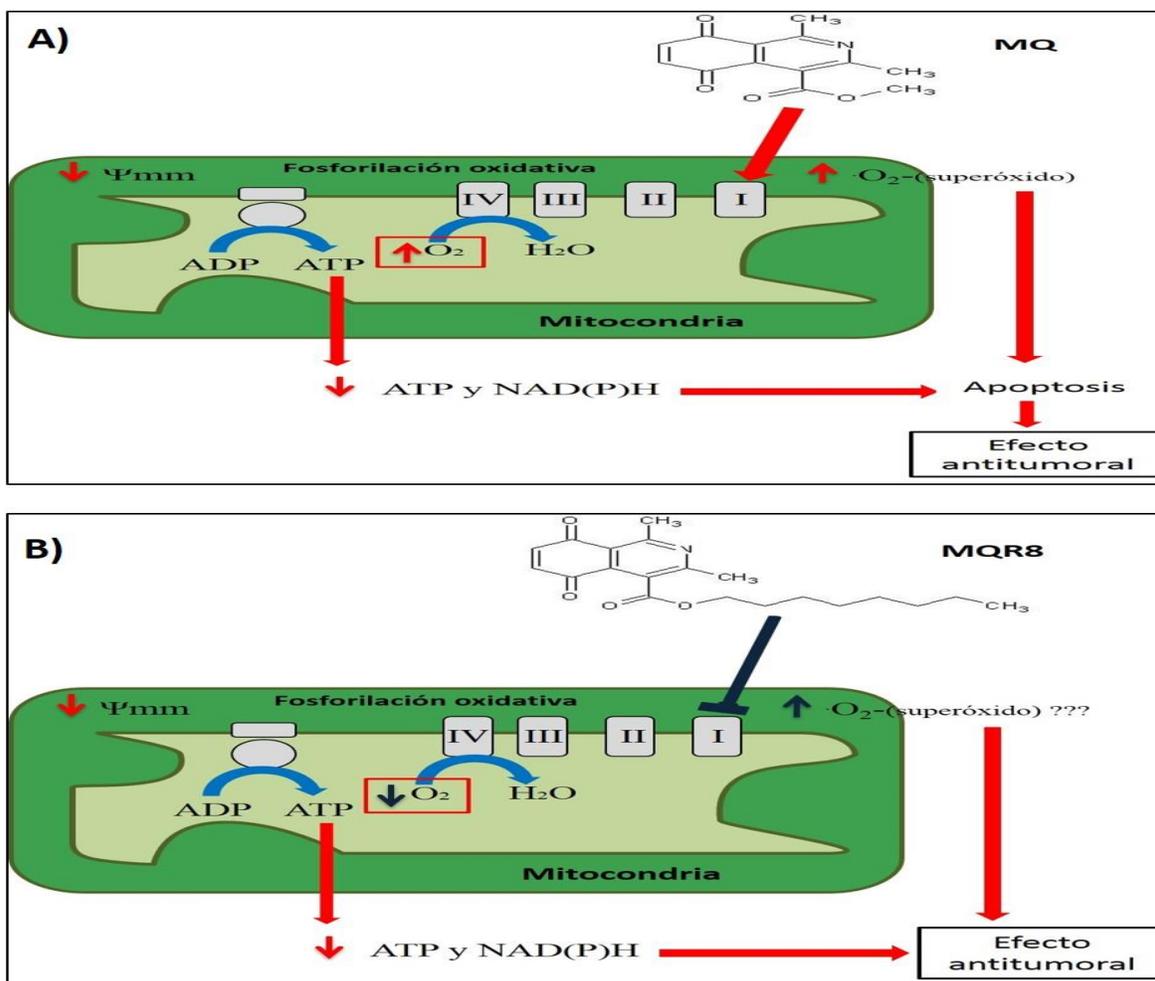


Figura 11. **Mecanismos de acción a nivel mitocondrial propuesto para las isoquinolinquinonas MQ (A), MQR8 (B).** El compuesto MQ muestra una actividad antiproliferativa en un rango de IC_{50} entre 10-25 μM en las líneas tumorales, es capaz de aumentar el OCR basal y disminuir la máxima respiración mitocondrial en células tumorales intactas. Además, incrementa el OCR en estado II_{basal} en mitocondrias aisladas. Este efecto en los componentes de la respiración mitocondrial podría ser el causante del aumento en la producción de anión superóxido mitocondrial y la caída del potencial de membrana mitocondrial. La disminución en el ATP y NAD(P)H totales podría estar relacionada con el efecto sobre OXPPOS y la producción de anión superóxido de MQ. Finalmente, MQ produce apoptosis en las células tumorales, evento que puede dar cuenta del efecto antitumoral de este compuesto.

El compuesto MQR8 con actividad antiproliferativa en un rango de IC_{50} entre 15-40 μM en las líneas tumorales, disminuye el OCR basal y la máxima respiración mitocondrial en células tumorales intactas. Además, en mitocondrias inhibe el OCR en estado 3_{ADP} a nivel de complejo I. Por otro lado, el compuesto afecta los diferentes parámetros bioenergéticos evaluados: incrementado la producción de anión superóxido, disminuyendo los niveles de ATP y NAD(P)H totales y produciendo una caída del potencial de membrana mitocondrial. Estos eventos en su conjunto podrían dar cuenta de los efectos antitumorales del MQR8.

8. CONCLUSIONES

- I. MQ y MQR8 presentaron actividad antiproliferativa contra las líneas tumorales de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, con un efecto más atenuado en la línea normal, MCF 10A.
- II. MQ y MQR8 producen alteraciones en los parámetros respiratorios mitocondriales en células intactas MCF-7 y MDA-MB-231.
- III. En mitocondrias aisladas MQ aumenta el OCR en estado II_{basal} independiente del sustrato de respiración.
- IV. MQR8 inhibe el OCR en estado III_{ADP} a nivel del complejo I, en mitocondrias aisladas.
- V. Las isoquinolinquinonas producen disfunción mitocondrial por aumento en la producción de anión superóxido mitocondrial, disminución del $\Delta\psi$ y la caída en los niveles de NAD(P)H y ATP totales.
- VI. MQ induce muerte del tipo apoptótica en las células tumorales de mama.
- VII. 2-DG aumenta el efecto antiproliferativo de MQ contra las líneas tumorales de mama.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bishop, J.M. and R.A. Weinberg, *Molecular Oncology*. (New York: Scientific American, Inc.), 1996.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Warburg, O., K. Posener, and E. Negelein, *Ueber den Stoffwechsel der Tumoren*. Biochemische Zeitschrift, 1924. **152**: p. 319-344.
5. Wenner, C.E. and S. Weinhouse, *Metabolism of neoplastic tissue. III. Diphosphopyridine nucleotide requirements for oxidations by mitochondria of neoplastic and non-neoplastic tissues*. Cancer Res, 1953. **13**(1): p. 21-6.
6. Boyland, E. and M.E. Boyland, *Studies in tissue metabolism: The effect of fumarate and succinate on tumour respiration*. Biochem J, 1936. **30**(2): p. 224-6.
7. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism*. Nature, 1961. **191**: p. 144-8.
8. Stehelin, D., et al., *Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses*. J Mol Biol, 1976. **101**(3): p. 349-65.
9. Lee, W.H., et al., *Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence*. Science, 1987. **235**(4794): p. 1394-9.
10. Wallace, D.C., W. Fan, and V. Procaccio, *Mitochondrial energetics and therapeutics*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 297-348.
11. Weinhouse, S., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 267-9.
12. Newsholme, E.A., B. Crabtree, and M.S. Ardawi, *The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells*. Biosci Rep, 1985. **5**(5): p. 393-400.
13. Wu, W. and S. Zhao, *Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013. **45**(1): p. 18-26.
14. Munoz-Pinedo, C., N. El Mjiyyad, and J.E. Ricci, *Cancer metabolism: current perspectives and future directions*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e248.
15. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 891-9.
16. Brand, K.A. and U. Hermfisse, *Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species*. FASEB J, 1997. **11**(5): p. 388-95.
17. Spitz, D.R., et al., *Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?* Ann N Y Acad Sci, 2000. **899**: p. 349-62.
18. Trachootham, D., J. Alexandre, and P. Huang, *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(7): p. 579-91.
19. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *The origin and early evolution of mitochondria*. Genome Biol, 2001. **2**(6): p. REVIEWS1018.
20. Kulawiak, B., et al., *The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1827**(5): p. 612-26.
21. Shadel, G.S. and D.A. Clayton, *Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 409-35.
22. Truscott, K.N., K. Brandner, and N. Pfanner, *Mechanisms of protein import into mitochondria*. Curr Biol, 2003. **13**(8): p. R326-37.

23. Zhao, J., et al., *Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells*. *Oncogene*, 2012. **32**(40): p. 4814-24.
24. Otera, H., N. Ishihara, and K. Mihara, *New insights into the function and regulation of mitochondrial fission*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(5): p. 1256-68.
25. Siemen, D. and M. Ziemer, *What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not?* *IUBMB Life*, 2013. **65**(3): p. 255-62.
26. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(5): p. 325-37.
27. Frey, T.G. and C.A. Mannella, *The internal structure of mitochondria*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(7): p. 319-24.
28. Ralph, S.J., et al., *Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger*. *Mol Aspects Med*, 2010. **31**(1): p. 29-59.
29. Newmeyer, D.D. and S. Ferguson-Miller, *Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death*. *Cell*, 2003. **112**(4): p. 481-90.
30. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of regulated necrosis*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014.
31. Jain, M.V., et al., *Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development*. *J Cell Mol Med*, 2013. **17**(1): p. 12-29.
32. Fulda, S. and G. Kroemer, *Mitochondria as therapeutic targets for the treatment of malignant disease*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(12): p. 2937-49.
33. Shoshan-Barmatz, V. and D. Ben-Hail, *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target*. *Mitochondrion*, 2012. **12**(1): p. 24-34.
34. Neuzil, J., et al., *Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria*. *Mitochondrion*, 2013. **13**(3): p. 199-208.
35. Rohlena, J., et al., *Anticancer drugs targeting the mitochondrial electron transport chain*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(12): p. 2951-74.
36. Cheng, G., et al., *Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death*. *Cancer Res*, 2012. **72**(10): p. 2634-44.
37. Choi, Y. and J.H. Lee, *The combination of tephrosin with 2-deoxy-D-glucose enhances the cytotoxicity via accelerating ATP depletion and blunting autophagy in human cancer cells*. *Cancer Biol Ther*, 2011. **12**(11): p. 989-96.
38. Gu, Y., et al., *Arctigenin preferentially induces tumor cell death under glucose deprivation by inhibiting cellular energy metabolism*. *Biochem Pharmacol*, 2012. **84**(4): p. 468-76.
39. Fath, M.A., et al., *Mitochondrial electron transport chain blockers enhance 2-deoxy-D-glucose induced oxidative stress and cell killing in human colon carcinoma cells*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(13): p. 1228-36.
40. Paz, M.M., et al., *Selective activation of mitomycin A by thiols to form DNA cross-links and monoadducts: biochemical basis for the modulation of mitomycin cytotoxicity by the quinone redox potential*. *J Med Chem*, 2001. **44**(17): p. 2834-42.
41. Kumagai, Y., et al., *The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012. **52**: p. 221-47.
42. Araya-Maturana, R., et al., *Effects of 4,4-dimethyl-5,8-dihydroxynaphtalene-1-one and 4,4-dimethyl-5,8-dihydroxytetralone derivatives on tumor cell respiration*. *Bioorg Med Chem*, 2002. **10**(9): p. 3057-60.
43. Araya-Maturana, R., et al., *Effects of 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone derivatives on tumor cell respiration*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(13): p. 4664-9.

44. Urra, F.A., et al., *An ortho-carbonyl substituted hydroquinone derivative is an anticancer agent that acts by inhibiting mitochondrial bioenergetics and by inducing G(2)/M-phase arrest in mammary adenocarcinoma TA3*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. **267**(3): p. 218-27.
45. Valderrama, J.A., et al., *Studies on quinones. Part 41: synthesis and cytotoxicity of isoquinoline-containing polycyclic quinones*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(14): p. 5003-11.
46. Locatelli, C., F.B. Filippin-Monteiro, and T.B. Creczynski-Pasa, *Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review*. *Eur J Med Chem*, 2013. **60**: p. 233-9.
47. Dranka, B.P., et al., *Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(9): p. 1621-35.
48. Cordano, G., et al., *Inhibitory effect of vanillin-like compounds on respiration and growth of adenocarcinoma TA3 and its multiresistant variant TA3-MTX-R*. *Eur J Pharm Sci*, 2002. **16**(4-5): p. 255-63.
49. Babcock, G.T. and M. Wikstrom, *Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration*. *Nature*, 1992. **356**(6367): p. 301-9.
50. Mitchell, P., *Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1807**(12): p. 1507-38.
51. Jara, J.A., et al., *Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice*. *J Med Chem*, 2014. **57**(6): p. 2440-54.
52. Jana, F., et al., *Tumor cell death induced by the inhibition of mitochondrial electron transport: the effect of 3-hydroxybakuchiol*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. **272**(2): p. 356-64.
53. Swietach, P., R.D. Vaughan-Jones, and A.L. Harris, *Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 299-310.
54. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure, *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 437-43.
55. Singletary, J., A. Sreedhar, and Y. Zhao, *Components of cancer metabolism and therapeutic interventions*. *Mitochondrion*, 2014. **17C**: p. 50-55.
56. Pathania, D., et al., *Design and discovery of novel quinazolinone-based redox modulators as therapies for pancreatic cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(1): p. 332-43.
57. Hahm, E.R., et al., *Withaferin A-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23354.
58. Kawiak, A., et al., *Induction of apoptosis in HL-60 cells through the ROS-mediated mitochondrial pathway by ramentaceone from *Drosera aliciae**. *J Nat Prod*, 2012. **75**(1): p. 9-14.
59. Blackman, R.K., et al., *Mitochondrial electron transport is the cellular target of the oncology drug elesclomol*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29798.
60. Skrzypski, M., et al., *Capsaicin induces cytotoxicity in pancreatic neuroendocrine tumor cells via mitochondrial action*. *Cell Signal*, 2014. **26**(1): p. 41-8.
61. Sassi, N., et al., *Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: Interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1837**(10): p. 1781-9.
62. Lewis, A.M., et al., *Targeting NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) in pancreatic cancer*. *Mol Carcinog*, 2005. **43**(4): p. 215-24.
63. Sutton, K.M., C.D. Doucette, and D.W. Hoskin, *NADPH quinone oxidoreductase 1 mediates breast cancer cell resistance to thymoquinone-induced apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **426**(3): p. 421-6.

64. Huang, X., et al., *An NQO1 substrate with potent antitumor activity that selectively kills by PARP1-induced programmed necrosis*. *Cancer Res*, 2012. **72**(12): p. 3038-47.
65. Li, L.S., et al., *Modulating endogenous NQO1 levels identifies key regulatory mechanisms of action of beta-lapachone for pancreatic cancer therapy*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(2): p. 275-85.
66. Cadenas, E., *Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism*. *Biochem Pharmacol*, 1995. **49**(2): p. 127-40.
67. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 99-163.
68. Fulda, S., *Exploiting mitochondrial apoptosis for the treatment of cancer*. *Mitochondrion*, 2010. **10**(6): p. 598-603.
69. Mathupala, S.P. and P.L. Pedersen, *Voltage dependent anion channel-1 (VDAC-1) as an anti-cancer target*. *Cancer Biol Ther*, 2010. **9**(12): p. 1053-6.
70. Gogvadze, V. and B. Zhivotovsky, *Alteration of mitochondrial function and cell sensitization to death*. *J Bioenerg Biomembr*, 2007. **39**(1): p. 23-30.
71. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. *Oncogene*, 2006. **25**(34): p. 4633-46.
72. Tennant, D.A., R.V. Duran, and E. Gottlieb, *Targeting metabolic transformation for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(4): p. 267-77.
73. de Jong, S., et al., *Increased sensitivity of an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line to mitochondrial inhibitors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **182**(2): p. 877-85.
74. Kurtoglu, M. and T.J. Lampidis, *From delocalized lipophilic cations to hypoxia: blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors*. *Mol Nutr Food Res*, 2009. **53**(1): p. 68-75.