



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FISICOQUÍMICA**

**6-(4-METIL-PENT-3-ENIL)-1,4-NAFTOQUINONA INDUCE
EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS MEDIADOS POR LA
PRODUCCIÓN DE ROS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

DANIELA INÉS GUZMÁN RIVERA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Directores de Memoria

Dr. Jorge Ferreira Parker
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa de Farmacología Molecular
y Clínica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Ramiro Araya Maturana
Departamento de Química Orgánica y
Fisicoquímica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante

Dr. Ramiro Araya Maturana
Departamento de Química Orgánica y
Fisicoquímica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2015

AGRADECIMIENTOS

*Esta tesis está dedicada a mis padres **Aurelina y Daniel** por su gran cariño, apoyo, y comprensión durante toda mi vida para superar los distintos desafíos.*

Quiero agradecer a mi familia y a mis amistades por estar presentes en los buenos momentos, pero especialmente en los más difíciles, que me ayudaron a seguir adelante.

A mis amigos, compañeros y profesores de los Laboratorios de Mecanismos de Reacción y del Programa de Farmacología Molecular y Clínica por su orientación y amabilidad para ayudarme y enseñarme.

A todos, muchas gracias.

FINANCIAMIENTO

La presente Memoria contó con el apoyo financiero del Proyecto FONDECYT Regular N°1130772 y el Proyecto FONDECYT N° 1110176. Se realizó en el Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Aspectos generales del cáncer	1
1.2. Rol de la mitocondria en células eucariotas	2
1.2.1. Maquinaria bioenergética y fosforilación oxidativa	2
1.2.2. Rol en la muerte celular	3
1.3. Mitocondria y cáncer	5
1.3.1. Transformación metabólica en células tumorales	5
1.4. Naftoquinonas	7
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivos Generales	9
3.2. Objetivos Específicos	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Reactivos	10
4.2. Compuesto en estudio	10
4.3. Propagación y obtención de células tumorales TA3/Ha	10
4.4. Cultivo celular	11
4.5. Determinación de la proliferación celular	11
	ii

4.6 Ensayo de formación de colonias	12
4.7 Evaluación del efecto de MPENQ sobre el OCR y ECAR	12
4.8 Preparación de mitocondrias aisladas y determinación del efecto de MPENQ sobre el consumo de oxígeno mitocondrial	13
4.9 Determinación de los niveles intracelulares de anión superóxido	14
4.10 Determinación de los niveles intracelulares de ATP	14
4.11 Incorporación de yoduro de propidio	15
4.12 Determinación de los niveles intracelulares de NAD(P)H	15
4.13 Determinación de los niveles de glutatión	15
4.14 Determinación de la migración celular	16
4.15 Determinación del tipo de muerte celular	16
4.16 Análisis estadístico	17
5. RESULTADOS	
MPENQ presenta efectos antiproliferativos en líneas tumorales murinas y humanas	18
Efecto antiproliferativo de MPENQ no es mediado por NQO1	21
MPENQ afecta irreversiblemente la clonogenicidad de células tumorales	23
MPENQ afecta el metabolismo tumoral mediante disminución de la respiración mitocondrial máxima	25
MPENQ afecta la respiración mitocondrial por inhibición del complejo I y II	28
Efecto de MPENQ sobre parámetros bioenergéticos en células MCF7 y MDA-MB-231	30
NAC y catalasa protegen frente al efecto antiproliferativo de MPENQ	34
Efecto de MPENQ sobre los niveles de glutatión en células tumorales	37
MPENQ induce apoptosis en líneas tumorales humanas	39
MPENQ afecta la migración de células tumorales MDA-MB-231	42
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cadena transportadora de electrones	4
Figura 2. Estructura química del compuesto en estudio: 6-(4-metil-pent-3-enil)-1,4-naftoquinona (MPENQ)	8
Figura 3. Efecto de MPENQ sobre la proliferación en células TA3/Ha, MDA-MB-231, MCF7 y MCF-10A	19
Figura 4. Selectividad de MPENQ sobre la proliferación en células MCF-10A	20
Figura 5. Efecto sobre la proliferación de MPENQ en células MCF7 es independiente de NQO1	22
Figura 6. Efecto de MPENQ sobre la capacidad clonogénica en células MCF7 y MDA-MB-231	24
Figura 7. Efecto de MPENQ sobre el metabolismo tumoral en células MCF7	26
Figura 8. Efecto de MPENQ sobre el metabolismo tumoral en células MDA-MB-231	27
Figura 9. Efecto de MPENQ sobre la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de TA3/Ha	29
Figura 10. Efecto de MPENQ sobre los niveles de ATP intracelulares en células MCF7 y MDA-MB-231	32
Figura 11. Efecto de MPENQ sobre la producción de anión superóxido en líneas MCF7 y MDA-MB-231	33
Figura 12. Efecto de MPENQ sobre los niveles intracelulares de NAD(P)H en células MCF7 y MDA-MB-231	33
Figura 13. Efecto protector de NAC frente al efecto antiproliferativo de MPENQ	35
Figura 14. Efecto protector de catalasa frente al efecto antiproliferativo de MPENQ	36
Figura 15. Efecto sobre los niveles de GSH en células MCF7 y MDA-MB-231	38
Figura 16. Efecto de MPENQ sobre el tipo de muerte celular en MCF7	40
Figura 17. Efecto de MPENQ sobre el tipo de muerte celular en MDA-MB-231	41

Figura 18. Efecto de MPENQ sobre la migración en células MDA-MB-231	43
Figura 19. Efecto de MPENQ sobre la cadena transportadora de electrones	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de IC ₅₀ de MPENQ en células TA3/Ha, MDA-MB-231, MCF7 y MCF-10A	20
--	----

ABREVIATURAS

ADP	:	Adenosín difosfato
ANT	:	Translocasa de nucleótidos de adenina
ASC	:	Ascorbato
ATP	:	Adenosín trifosfato
AV	:	Anexina V
CAT PEG	:	Catalasa polietilenglicol
CCCP	:	Carbonil Cianuro- <i>m</i> -Clorofenilhidrazona
CTE	:	Cadena transportadora de electrones
DMEM HG	:	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle alto en glucosa
DMEM LG	:	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle bajo en glucosa
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
ECAR	:	Tasa de acidificación del medio extracelular
FADH₂	:	Flavina Adenina Dinucleótido reducida
FCCP	:	Carbonil Cianuro- <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
GLU + MAL	:	Glutamato + Malato
GSH	:	Glutación reducido
HEPES	:	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfónico
MCF7	:	Células de cáncer mamario humano
MCF-10A	:	Células de epitelio mamario humano
MDA-MB-231	:	Células de cáncer mamario humano metastásicas
MME	:	Membrana mitocondrial externa
MMI	:	Membrana mitocondrial interna
MPENQ	:	6-(4-metil-pent-3-enil)-1,4-naftoquinona
MTT	:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NAC	:	N-acetilcisteína

NADH	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NAD(P)H	:	NADH y NADPH
NQO1	:	NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1
OCR	:	Tasa de consumo de oxígeno
PBS	:	Amortiguador fosfato salino
PI	:	Yoduro de propidio
PMM	:	Permeabilidad membrana mitocondrial
PMME	:	Permeabilidad de membrana mitocondrial externa
PTP	:	Poros de transición de permeabilidad
ROS	:	Especies reactivas de oxígeno
SFB	:	Suero fetal bovino
TMPD	:	N,N,N',N'-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina
TA3/Ha	:	Células de adenocarcinoma mamario murino
VDAC	:	Canal aniónico dependiente de voltaje
$\Delta\rho$:	Fuerza protón-motriz
$\Delta\Psi_m$:	Potencial de transmembrana mitocondrial

RESUMEN

El mitocondrion es un organelo que juega un papel crucial en el metabolismo y la regulaci3n de la muerte celular. Por otra parte, se ha descrito que las c3lulas tumorales presentan alteraciones en la bioenerg3tica mitocondrial que favorecen la resistencia a la muerte celular. En este contexto, aquellos compuestos que afecten esta funci3n pueden ofrecer un atractivo blanco para el dise1o de agentes antitumorales.

En esta tesis se evaluaron algunos mecanismos de acci3n posibles que presenta el compuesto 6-(4-metil-pent-3-enil)-1,4-naftoquinona (MPENQ), que explican el efecto antiproliferativo sobre las c3lulas tumorales. Debido a que 3l o los mecanismos por los cuales ejerce su acci3n no han sido a1n determinados. Se utiliz3 para este prop3sito c3lulas de c3ncer de mama humano MCF7 y c3lulas metast3sicas MDA-MB-231, exhibiendo un efecto sobre la proliferaci3n con valores de IC₅₀ menores de 20 μM. Conjuntamente, se utiliz3 la l3nea de epitelio mamario humano MCF-10A. MPENQ present3 grado de selectividad a 5 y 10 μM hacia las c3lulas tumorales.

Se evalu3 la actividad de MPENQ sobre la respiraci3n celular comprob3ndose una importante inhibici3n de la respiraci3n m3xima mitocondrial. Se utiliz3 tambi3n mitocondrias aisladas de c3lulas de adenocarcinoma mamario murino TA3/Ha, en las cuales se comprob3 que MPENQ afecta la cadena transportadora de electrones al inhibir los complejos I y II. Igualmente, MPENQ fue capaz de afectar los par3metros bioenerg3ticos al disminuir los niveles intracelulares de ATP, aumentar la producci3n de ROS y producir acumulaci3n de NAD(P)H a bajas concentraciones.

La incubaci3n con N-acetilciste3na y catalasa durante 48 horas previno el efecto antiproliferativo de MPENQ, sugiriendo que este efecto sobre c3lulas de c3ncer de mama est3 mediado por la generaci3n de ROS.

Los resultados obtenidos indican que la crisis bioenergética producida por MPENQ fue capaz de inducir apoptosis y tanto la inhibición de la cadena transportadora de electrones como la generación de ROS están implicadas en la acción citotóxica.

ABSTRACT

6-(4-methyl-pent-3-enyl)-1,4 naphthoquinone induces antiproliferative effects in breast cancer cells by ROS production

The mitochondrion is an organelle that plays a crucial role in the metabolism and regulation of cell death. On the other hand, it has been described that tumor cells present alterations in mitochondrial bioenergetics favoring the resistance to the cell death. In this context, those compounds that affect these functions can offer an attractive target for designing of antitumor agents.

In this thesis, it was assessed some possible action mechanisms of 6-(4-metil-pent-3-enil)-1,4-naphthoquinone (MPENQ) which would explain the antiproliferative effect on tumor cells. Since, they have not been yet well determined. It was used for this purpose human breast cancer MCF7 cells and metastatic MDA-MB-231 cells, exhibiting IC₅₀ values on proliferation inhibition of less than 20 µM MPENQ. Together, we also used the human mammary epithelium cell line MCF-10A, showing selectivity toward tumor cells at 5 and 10 µM MPENQ.

Activity of MPENQ on cellular respiration was evaluated checking the important inhibition of mitochondrial respiration maximum. Mitochondria isolated from mammary adenocarcinoma of murine cells line TA3/Ha was also used, in which was found that MPENQ affects the electron flow through of the electron transport chain inhibiting both complex I and II. Also, MPENQ was able to affect the bioenergetics parameters decreasing the intracellular ATP levels, increasing the ROS production, and producing accumulation of NAD(P)H at low concentrations of MPENQ.

Incubation with N-acetylcysteine and catalase by 48 hours prevented the antiproliferative effect of MPENQ, suggesting that this effect on breast cancer cells is mediated by the generation of ROS.

The results obtained indicated that the bioenergetics crisis produced by MPENQ was able to induce apoptosis and both the inhibition of the electron flow through the respiratory chain and the generation of ROS are involved in this cytotoxic action.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se estima que el año 2012 hubo 14,1 millones de casos nuevos y 8,2 millones de muertes producidas por los diversos tipos de cáncer. De los cuales el 57% de los casos nuevos y el 65% de las muertes corresponden a países en vías de desarrollo (WHO, 2014).

El cáncer es considerado actualmente como una patología compleja con un importante carácter genético, caracterizada por la ganancia de funciones a través de la activación de oncogenes por medio de mutaciones y la pérdida de funciones mediante la mutación de genes supresores de tumores (Ortega et al., 2009).

La investigación científica se ha enfocado en la comprensión de los principios básicos del comportamiento del fenotipo de las células cancerosas, lo cual se resume en los denominados marcadores del cáncer, entre los cuales se encuentra la autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anticrecimiento, evasión de la apoptosis, ilimitado poder replicativo, angiogénesis sostenida y finalmente la invasión a tejidos y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000). Recientemente se han reconocido dos características que se suman a las ya nombradas, la evasión a la respuesta inmune y la reprogramación del metabolismo energético (Hanahan and Weinberg, 2011).

Debido a la baja efectividad de los tratamientos por la alta resistencia de las células tumorales a la acción de diversos quimioterápicos y a la radioterapia (Moreno-Sanchez et al., 2007), se ha utilizado como estrategia inducir la muerte al provocar alteraciones que originen disfunción mitocondrial, pues este orgánulo regula procesos claves en la vida celular. Existen muchas señales de transducción de muerte celular que convergen en la mitocondria, las cuales buscan causar la

permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME), permitiendo con ello la liberación al citosol de proteínas pro-apoptóticas y la alteración de las funciones bioenergéticas de este organelo (Kroemer et al., 2007).

1.2 Rol de la mitocondria en células eucariotas

La mitocondria cumple varias funciones importantes en la vida celular, que en condiciones fisiológicas y patológicas están totalmente reguladas con el objeto de responder a las necesidades celulares específicas. Entre ellas, las más importantes son: la generación de energía mediante la maquinaria bioenergética que involucra la síntesis de ATP, la homeostasis del Ca^{+2} celular (Carafoli, 2010; Nicholls, 2005), la producción de ROS (Hamanaka and Chandel, 2010) y el control de la muerte celular, principalmente de la vía intrínseca de la apoptosis (Wang and Youle, 2009).

1.2.1 Maquinaria bioenergética y fosforilación oxidativa

Una de las más conocidas y trascendentales funciones es la generación de energía por la maquinaria bioenergética. La glicólisis ocurre en el citosol, proceso en el cual se produce a partir de un mol de glucosa, dos moles de ATP, dos moles de NADH y dos moles de piruvato. Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio celular, en condiciones anaerobias o cercano a la anaerobiosis, el piruvato es reducido a lactato, por la enzima lactato deshidrogena (LDH) y la piruvato deshidrogenasa es inhibida, en cambio en condiciones aeróbicas es principalmente oxidado en la mitocondria.

Dentro de la mitocondria, específicamente en la matriz mitocondrial, el piruvato ingresa al ciclo de Krebs. Aquí se reduce NAD^+ y FAD, intermediarios que almacenan energía en forma de energía química, convirtiéndola en fuerza electromotriz (Δp) a medida que fluyen los electrones a través de la cadena transportadora de electrones (CTE) hasta el O_2 . La CTE consiste en cinco complejos proteicos embebidos en la membrana mitocondrial interna (MMI) que transportan electrones en forma secuencial, éstos corresponden a NADH:ubiquinona oxidoreductasa

(complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa (complejo III), citocromo c oxidasa (complejo IV) y F₁F₀ATP sintasa (complejo V).

Los complejos I y II oxidan NADH y FADH₂ respectivamente, producidos en el ciclo de Krebs. Estos complejos son el punto de entrada de los electrones a la CTE. La transferencia secuencial de estos electrones permite el bombeo de protones (por los complejos I, III y IV) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico, el cual es utilizado por el complejo V, para sintetizar ATP desde ADP y fosfato inorgánico (Pi) (**Figura 1**) (Fogg et al., 2011).

1.2.2 Rol en la muerte celular

Los aspectos bioquímicos y morfológicos que definen la apoptosis han sido ampliamente descritos (Galluzzi et al., 2007). Se reconocen dos vías, la intrínseca y la extrínseca en las cuales la mitocondria cumple un rol central (Wang and Youle, 2009).

La permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM) es considerada un punto de no retorno en el caso de la vía intrínseca y es inducida por el predominio de señales pro-apoptóticas (Galluzzi et al., 2010). PMM puede ocurrir por dos procesos, el primer mecanismo involucra la familia de proteínas Bcl-2, las cuales juegan un rol regulatorio en el proceso apoptótico. La familia Bcl-2 se puede dividir en dos tipos: antiapoptótica como Bcl-XL, Bcl-w, y proapoptóticas como Bax y Bak (Cory and Adams, 2002). Además existe una familia de proteínas BH3 y se proponen dos modelos de activación de la apoptosis: de manera indirecta mediante la unión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 con BH3, inhibiendo la acción antiapoptótica (Youle and Strasser, 2008). El modelo directo indica que las proteínas BH3 se unen y activan a Bax/Bak, las cuales son responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (PMME), mediante su oligomerización e inserción en la MME (**Figura 1**) (Wang and Youle, 2009).

El segundo mecanismo para PMM es debido al ensamblaje del poro de transición de permeabilidad (PTP), una entidad supramolecular que se extiende entre MMI y MME. PTP está compuesto por VDAC, ANT y ciclofilina D, entre otras. PTP normalmente tiene un rol de intercambio de metabolitos y presenta un estado de baja conductancia. Sin embargo, bajo señales pro-apoptóticas cambia a un estado de alta conductancia ocurriendo la “transición de la permeabilidad mitocondrial”. Este proceso consiste en la pérdida de la impermeabilidad de la MMI a los distintos solutos, disipación del potencial de transmembrana ($\Delta\Psi_m$), aumento de permeabilidad del agua e hinchamiento osmótico de la matriz mitocondrial, ocurriendo la ruptura de la MME. Además, ocurre una liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana al citosol, como citocromo c. (Brenner and Grimm, 2006)

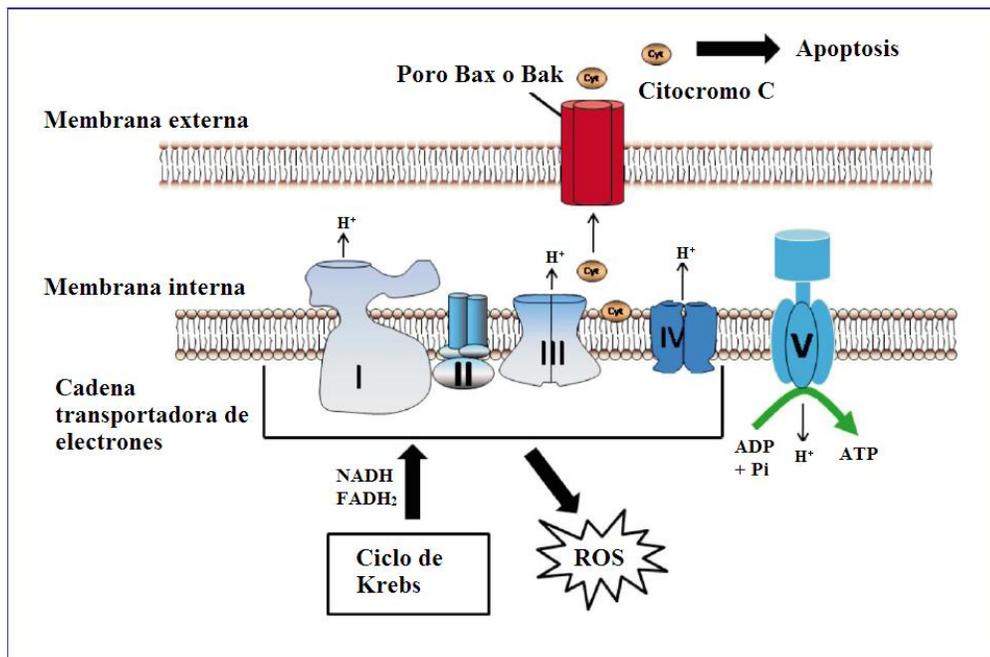


Figura 1: Cadena transportadora de electrones

1.3 Mitocondria y cáncer

Dado que la mitocondria juega un rol fundamental tanto en la regulación del metabolismo energético como en la producción de ROS y la muerte celular, se piensa que este organelo de las células tumorales representa un blanco farmacológico clave. Es importante además considerar el metabolismo diferencial de las células tumorales y los requerimientos anabólicos que poseen para el crecimiento y proliferación celular en comparación a su contraparte no-tumoral (Cairns et al., 2011).

La mitocondria es uno de los orgánulos que presenta mayor diferencia entre las células tumorales y su contraparte no-tumoral. Se ha demostrado que las mitocondrias de células tumorales presentan una gran disminución del número total, son relativamente pequeñas y muestran alteraciones ultraestructurales (Galluzzi et al., 2010). Presentan una disminución en la actividad de enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa y son deficientes en ciertas subunidades de F_0F_1 de la ATP sintasa. Además poseen una diferencia de potencial de transmembrana ($\Delta\Psi_m$) elevado, indicando que los defectos primarios en la cadena respiratoria podrían contribuir con la glicolisis aeróbica (Putignani et al., 2008; Rossignol et al., 2004)

1.3.1 Transformación metabólica en células tumorales

Desde el punto de vista metabólico, es relevante destacar que existe un cambio en el fenotipo de las células cancerosas, que corresponde a la producción de energía por la vía glicolítica que está ampliamente exacerbada, a pesar de la disponibilidad de oxígeno, conocido como efecto Warburg, lo que se traduce en la sobreexpresión de proteínas que participan en esta vía (Christofk et al., 2008; Pedersen, 2007).

En las células tumorales no sólo se ha observado la sobreexpresión de las enzimas que participan en la vía glicolítica, sino que además, de los transportadores de glucosa, específicamente GLUT-1, GLUT-3 y GLUT-4, los cuales tienen alta afinidad en comparación a otras isoformas. Esto le permite a las células tumorales la

captación de altas concentraciones de glucosa de los tejidos circundantes, además de mantener la fosforilación oxidativa funcional. Con este exceso de glucosa, las células cambian su organización energética hacia la glicólisis, lo que les permite sobrevivir en ambientes con disponibilidad de oxígeno limitada, además de liberar grandes cantidades de ácido láctico a los tejidos circundantes, lo cual favorecerá la posterior invasión de las células tumorales, la formación de metástasis y mayor agresividad (Gogvadze et al., 2010; Mathupala et al., 2010).

Otra enzima clave en el patrón energético de las células tumorales, es la hexoquinasa (HK), siendo la HK-II la isoenzima sobreexpresada en respuesta al factor de transcripción HIF-1 α . Esta enzima, clave en la glicólisis de las células tumorales, se encuentra unida a la MME en la zona de VDAC, por lo que utiliza el ATP recientemente sintetizado por el sistema de la fosforilación oxidativa para fosforilar la glucosa a glucosa 6-fosfato (Mathupala et al., 2010; Moreno-Sanchez et al., 2007). Este fenómeno representa el principal nexo entre la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP a través de la glicólisis, constituyendo un blanco farmacológico interesante desde el punto de vista energético. Además es uno de los factores más importantes de supervivencia para las células tumorales, ya que HK-II al estar unida a VDAC impide la apertura de PTP, lo que le permite ejercer resistencia a la apoptosis (Majewski et al., 2004).

Por lo tanto, las moléculas que puedan interferir en forma selectiva con la homeostasis mitocondrial de las células tumorales, afectarán toda la maquinaria que confiere a estas células sus características malignas (Neuzil et al., 2007).

1.4 Naftoquinonas

Se ha descrito que las 1,4-naftoquinonas poseen una variedad de propiedades farmacológicas, dentro de las cuales destacan la acción antibacteriana (Sheng-Tung et al., 2002), antifúngica (Tandon et al., 2004), antiviral (Da Silva et al., 2002; Iliina et al., 2002), antiinflamatoria (Checker et al., 2009; Huang et al., 1998) y anticancerígena (Kayashima et al., 2009; Lee et al., 2007; Seshadri et al., 2011). Algunos estudios han demostrado que la fracción quinónica es esencial para la actividad citotóxica y se ha propuesto como mecanismo de acción la adición de nucleófilos al anillo quinónico, resultando en la arilación de importantes moléculas como ácidos nucleicos y proteínas (Bolton et al., 2000; O'Brien, 1991). Además las quinonas sufren repetidas reducciones y oxidaciones de su radical libre semiquinona (ciclo redox), resultando en la formación de ROS como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, responsables del estrés oxidativo en células (Goulart et al., 2003; Watanabe and Forman, 2003). La mayoría de las células de tumor mamario expresan la enzima NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1) (Jamshidi et al., 2012). Esta enzima es una flavoproteína multifuncional que cataliza la reducción de quinonas, utilizando NAD(P)H como donador de protones, con el fin de evitar la formación de semiquinonas, las cuales son capaces de reaccionar generando especies reactivas de oxígeno (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010).

El grupo terpenilo de la MPENQ (**Figura 2**), aumenta su lipofilia en relación a la 1,4-naftoquinona no sustituida, permitiendo una mayor disponibilidad a nivel celular. En este trabajo, considerando los IC₅₀ determinados para MPENQ en líneas tumorales murinas y humanas (Miguel del Corral et al., 2002), y los mecanismos por los que actúan las quinonas, se estudiará su actividad antiproliferativa en líneas tumorales de mama humana y la identificación del mecanismo por el cual ejerce su actividad.

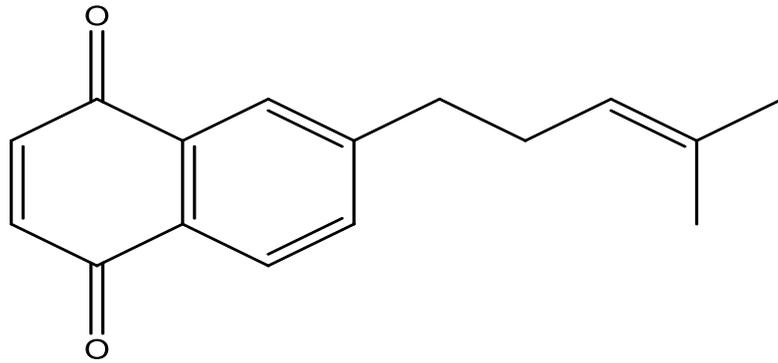


Figura 2: Estructura química del compuesto en estudio: 6-(4-metil-pent-3-enil)-1,4-naftoquinona (MPENQ)

2. HIPÓTESIS

- 2.1** El compuesto 6-(4-metil-pent-3-enil)-1,4-naftoquinona (MPENQ) ejerce un efecto antiproliferativo en líneas de cáncer mamario MCF7 y MDA-MB-231, ya que induce la generación de ROS mitocondrial, mediante la inhibición del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar y proponer un mecanismo de acción para el efecto antiproliferativo del compuesto MPENQ en líneas de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar el efecto antiproliferativo del compuesto MPENQ en líneas tumorales y normales humanas.

Determinar el efecto de la naftoquinona MPENQ en la respiración celular de las líneas tumorales.

Determinar el efecto del compuesto MPENQ sobre la respiración en mitocondrias aisladas de la línea tumoral murina TA3/Ha.

Identificar el sitio de acción de la naftoquinona en la cadena transportadora de electrones en mitocondrias aisladas de la línea tumoral murina TA3/Ha.

Evaluar el efecto sobre parámetros bioenergéticos (ATP, NAD(P)H, ROS).

Evaluar el efecto del compuesto sobre la migración en células MDA-MB-231.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Dicumarol, Antimicina A, Rotenona, Oligomicina, CCCP, FCCP, N-acetilcisteína (NAC), Catalasa PEG fueron adquiridos en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE. UU). Los demás reactivos corresponden a aquellos de la mayor pureza disponible.

4.2 Compuesto en estudio

MPENQ (**Figura 2**) se sintetizó en el Laboratorio de Mecanismos de Reacción de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de Universidad de Chile, de acuerdo a lo publicado (Gordaliza et al., 1996; Miguel del Corral et al., 2002; Miguel del Corral et al., 1998; Molinari et al., 2000). Los reactivos *p*-benzoquinona, α -mirceno y trifluoruro de boro etearato fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Las soluciones de stock de MPENQ fueron preparadas en DMSO (Merck, Darmstadt, Alemania).

4.3 Propagación y obtención de células tumorales TA3/Ha

La propagación de células de tumor ascítico TA3/Ha se realizó intraperitonealmente en ratones de la cepa CAF 1/Jax. Después de 5-6 días desde la inoculación y propagación, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Las células tumorales fueron obtenidas desde los fluidos ascíticos mediante incisión en el abdomen y suspendidas en solución amortiguadora a 4°C, que contiene NaCl 150 mM, KCl 5 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (Moreadith and Fiskum, 1984). Luego, las células se centrifugaron a 180g por 5 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante por aspiración. Este procedimiento se repitió hasta eliminar los eritrocitos contaminantes. Finalmente, el pellet resultante se resuspendió en la misma solución amortiguadora y se determinó la concentración

de proteínas mediante el método del Biuret, adaptado en el laboratorio (Frey et al., 2007).

4.4 Cultivo celular

Las líneas tumorales de cáncer de mama humanas MCF7 (Código ATCC[®] HTB-22[®]) y MDA-MB-231 (Código ATCC[®] HTB-26[®]) fueron adquiridas en ATCC (ATCC, Manassas, VA, USA). Ambas líneas fueron cultivadas en Medio de Eagle modificado por Dulbecco bajo en glucosa (DMEM LG, Gibco[®], Carlsbad, CA, USA), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (HyClone, Logan, UT, USA) y antibióticos (100 UI de penicilina/mL y 100 µg/mL de estreptomomicina).

Las células tumorales murinas TA3/Ha se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (DMEM HG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de SFB y antibióticos (100 UI de penicilina/mL y 100 µg/mL de estreptomomicina).

La línea MCF-10A (ATCC[®] CRL-10317[®]) fue adquirida en ATCC. Fue cultivada en medio DMEM HG, suplementado con 5% de suero equino, insulina bovina (10 µg/mL), factor de crecimiento epidérmico (20 ng/mL), hidrocortisona (0,5 µg/mL) y antibióticos (100 UI de penicilina/mL y 100 µg/mL de estreptomomicina).

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en una atmósfera humidificada (37°C y CO₂ al 5%).

4.5 Determinación de la proliferación celular

La evaluación del efecto sobre la proliferación celular del compuesto MPENQ se realizó mediante el ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de reducir enzimáticamente el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), reacción que genera un compuesto coloreado azul (cristales de formazán). Las células MCF7, MDA-MB-231, MCF-10A y TA3/Ha

fueron sembradas en placas de 96 pocillos a concentración 1×10^4 células/pocillo, incubadas por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Luego las células se trataron con el compuesto MPENQ en concentraciones crecientes (5, 10, 25 y 50 μM). Luego de 48 horas, se lavaron con PBS y se agregó 100 μL de MTT (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) a cada pocillo a concentración final de 0,5 mg/mL y se incubó por una hora. Los cristales de formazán fueron solubilizados con 20 μL de Tritón X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 10% en HCl 0,01 N. Los valores fueron obtenidos, mediante espectrofotometría, $\lambda = 570\text{nm}$. El IC_{50} de proliferación celular se determinó de la curva dosis-respuesta.

4.6 Ensayo de formación de colonias

Se sembraron células MCF7 y MDA-MB-231 en placas de 6 pocillos (3 pocillos con 250 y 3 pocillos con 500 células), de acuerdo a lo descrito en la literatura (Franken et al., 2006), y se mantuvieron por 24 horas. Luego, se trataron con 5 y 10 μM de compuesto MPENQ durante 24 horas. Concluido el tiempo de exposición, se reemplazó el medio de incubación por uno libre de compuesto y las células se incubaron durante 7 días para permitir la formación de colonias. Las colonias fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol y lavadas con agua para retirar los excedentes de tinción. La cantidad de colonias formadas se determinó con el software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) y la disminución de la fracción sobreviviente de células se calculó de acuerdo al protocolo publicado (Franken et al., 2006).

4.7 Evaluación del efecto de MPENQ sobre el OCR y ECAR

El consumo de oxígeno (OCR) y acidificación del medio extracelular (ECAR) en células se determinó utilizando el Analizador de Flujo Extracelular XF[®]96 (Seahorse, Bioscience). Se sembraron células MCF7 y MDA-MB-231 en placas de Seahorse de 96 pocillos (1×10^4 células por pocillo). Una hora antes de la medición, se lavaron las células con medio a pH 7,4 de acuerdo a los

procedimientos indicados por el fabricante. Una vez calibrado el equipo, se inyectó automáticamente MPENQ a concentraciones 5, 10 y 25 μM . Para determinar la respiración acoplada a la síntesis de ATP, se inyectó oligomicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para inhibir la subunidad F_0 de la ATP sintasa, FCCP (1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) para obtener la máxima respiración y rotenona - antimicina A para inhibir los complejos I y III, evitando así el consumo de oxígeno mitocondrial. La medición se realizó por dos horas. Se determinó la función mitocondrial según literatura (Dranka et al., 2010; Wu et al., 2007).

4.8 Preparación de mitocondrias aisladas y determinación del efecto de MPENQ sobre el consumo de oxígeno mitocondrial

Las suspensiones mitocondriales fueron preparadas desde células tumorales murinas TA3/Ha mediante centrifugación diferencial, según procedimientos descritos (Moreadith and Fiskum, 1984).

Para determinar el efecto producido de MPENQ sobre el consumo de oxígeno se midió polarográficamente con un electrodo de oxígeno Clark No. 5331 (Yellow Springs Instruments, Yellow Spring, OH, EE. UU.) inserto en una cámara termorregulada a 25°C. Se utilizó un monitor YSI modelo 53 conectado a un módulo DI-148U con interfase USB. Los datos se obtuvieron utilizando el software Windaq Acquisition Waveform Recorder (DataQ Instruments, EE. UU.).

El medio de respiración contiene 200 mM de sacarosa, 50 mM de KCl, 3 mM de K_3HPO_4 , 2 mM de MgCl_2 , 0,5 mM EGTA, 3 mM de HEPES, pH=7,4. Se utilizó una concentración de 0,5 mg/mL de proteína mitocondrial. La respiración mitocondrial se estimuló con glutamato y malato (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EE. UU.) ambos a concentración 8,3 mM.

Para determinar el efecto ejercido por MPENQ sobre la cadena transportadora de electrones, se agregó CCCP 200 nM para obtener el desacoplamiento máximo de la fosforilación oxidativa. Se realizaron mediciones con succinato 8,3 mM (Sigma

Chemical Co, St. Louis, MO, EE. UU.), sustrato de complejo II, duroquinol 0,3 mM como sustrato de complejo III y TMPD 75 μ M + ascorbato 1,5 mM como sustrato del complejo IV (Urrea et al., 2013). Dado que en la cadena transportadora de electrones se produce una secuencia de eventos, si se entrega un sustrato específico para un complejo, y éste no es capaz de revertir la disminución en el consumo de oxígeno inducida por un inhibidor, es porque éste actúa antes de dicho complejo.

4.9 Determinación de niveles intramitocondriales de anión superóxido

La medición de generación de anión superóxido producto de la acción de MPENQ fue medida a través de citometría de flujo ocupando la sonda fluorescente MitoSOX[®] Red (Molecular Probes[®], Eugene, OR, EE. UU.). Esta sonda se acumula de manera rápida y selectiva en la mitocondria, donde es oxidada preferentemente por el anión superóxido y no por otras especies radicalarias de oxígeno o nitrógeno. La molécula oxidada exhibe una fluorescencia roja medida a 580 nm cuando es excitada a 530 nm.

Las células MCF7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una concentración de $1 \cdot 10^5$ células/pocillo. El reactivo MitoSOX[®] fue preparado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las células fueron incubadas con la sonda (5 μ M) por 30 minutos protegidas de la luz. Posteriormente se estimuló con concentraciones crecientes de MPENQ (5, 10 y 25 μ M) en medio fresco por dos horas. Las muestras fueron tripsinizadas y resuspendidas en 200 μ L de PBS y analizadas mediante citometría de flujo FACS (FACSAria[®]III, BD Biosciences) a las longitudes de onda ya señaladas.

4.10 Determinación de los niveles intracelulares de ATP

Los niveles de ATP se midieron en células MCF7 y MDA-MB-231 siguiendo las especificaciones del kit CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Se sembraron 1×10^4 células/pocillo en placas

de 96 pocillos y se trataron a concentraciones crecientes de MPENQ (5, 10 y 25 μM) durante 2 horas. Al término fueron lavadas con PBS dos veces. Los niveles intracelulares de ATP se determinaron en células lisadas y se leyó la luminiscencia en un espectrofluorómetro lector de placas Varioskan[®] Flash (Thermo Scientific).

4.11 Incorporación de yoduro de propidio

La incorporación de yoduro de propidio (PI) se utilizó para determinar los efectos del compuesto MPENQ en la permeabilidad de la membrana celular. Células MCF7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una concentración de $1 \cdot 10^5$ células/pocillo. Se estimuló con concentraciones crecientes de MPENQ (5, 10 y 25 μM) en medio fresco por dos horas. Las células se despegaron por tripsinización y posteriormente fueron resuspendidas en 200 μL de PBS. Finalmente se les agregó PI, se analizó la fluorescencia al excitar a 535 nm y la emisión se registró mediante citometría de flujo FACS (FACS Aria[®] III, BD Biosciences) a 617 nm.

4.12 Determinación de los niveles intracelulares de NAD(P)H

Los niveles de intracelulares NAD(P)H se midieron en células MCF7 y MDA-MB-231. Se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron a concentraciones crecientes de MPENQ (5, 10 y 25 μM) durante una hora. Las células emiten auto-fluorescencia a 430 nm de modo proporcional a su contenido de moléculas de NAD(P)H cuando son excitadas a 340 nm (Petit et al., 2001). La fluorescencia fue determinada en un espectrofluorómetro lector de placas Varioskan[®] Flash (Thermo Scientific).

4.13 Determinación de los niveles de glutatión

Los niveles de glutatión se midieron en células MCF7 y MDA-MB-231 con la sonda fluorescente CellTracker[®] Green CMFDA (Molecular Probes[®], Eugene, OR, EE. UU.), la cual contiene grupos funcionales capaces de reaccionar con

grupos tioles, en una reacción mediada por la glutatión S-transferasa (Zhang et al., 1992). Se sembraron 1×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se trataron a concentraciones crecientes de MPENQ (5, 10 y 25 μM) durante 2 horas. Posteriormente se incubó con la sonda a concentración 1 μM . La medición indirecta de los niveles de glutatión se determinó al excitar la sonda a 492 nm en un espectrofluorómetro lector de placas Varioskan[®] Flash (Thermo Scientific) a una emisión de 517 nm.

4.14 Determinación de la migración celular

Se ha demostrado que la línea celular MDA-MB-231 posee la capacidad de migrar (Ning et al., 2013). Se realizó el ensayo de la herida, el cual consiste en romper la superficie celular y se observó la capacidad migratoria de las células en presencia del compuesto MPENQ. Se sembraron 1×10^5 células/pocillo en placas de 12 pocillos, incubadas con DMEM LG + 10% SFB hasta su adhesión durante 24 horas. Posteriormente, se dañó la superficie de cada pocillo con una punta de 200 μL , se lavó dos veces con PBS y se agregó el compuesto MPENQ a 1 y 2,5 μM , en medio DMEM LG suplementado con 1% SFB, para evitar la proliferación de las células durante el periodo del experimento. Se consideró un tiempo inicial posterior a la realización de la herida y luego de 24 horas de incubación con el compuesto, las células se fotografiaron para determinar los cambios y los datos se analizaron con el software Image J (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). Cada herida se comparó con su propio control a tiempo inicial.

4.15 Determinación del tipo de muerte celular

El tipo de muerte celular, apoptosis o necrosis, producto de la acción del compuesto MPENQ se determinó mediante la incorporación de Anexina V (AV) y Yoduro de propidio (PI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.). Se utilizaron 1×10^5 células/pocillo, sembradas en placas de 24 pocillos, las cuales

fueron tratadas con el compuesto MPENQ (5, 10 y 25 μM) durante 24 horas. Luego de tripsinizadas, cada muestra fue resuspendida en 250 μL de “annexin V binding buffer” y se le agregó 2,5 μL de AV y 2,5 μL de PI por muestra. Finalmente, las células se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz y se analizaron mediante citometría de flujo (FACSAria[®]III, BD Biosciences).

4.16 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graph Pad Prism 5.0 utilizando el análisis ANOVA de una vía con post test de Bonfferoni. Se estableció como nivel de significancia $p \leq 0,05$. Los valores de IC_{50} obtenidos del ensayo con MTT se calcularon de la curva dosis respuesta ajustada a una curva no lineal.

5. RESULTADOS

MPENQ PRESENTA EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS EN LÍNEAS TUMORALES MURINAS Y HUMANAS

Se evaluó la actividad del compuesto MPENQ sobre la proliferación en células tumorales murinas TA3/Ha y en las líneas tumorales humanas MCF7 y MDA-MB-231. Se utilizó el ensayo de MTT y las células se cultivaron en presencia de MPENQ en un rango de 5 a 50 μM durante 48 horas.

En la **Figura 3** se observa que el efecto antiproliferativo producido es estadísticamente significativo ($p \leq 0,001$) en la mayoría de las concentraciones, lo cual es consistente con lo reportado previamente en otras líneas tumorales (Miguel del Corral et al., 2002).

La línea en que se observó mayor efecto antiproliferativo fue en el modelo murino TA3/Ha, con un IC_{50} de $4,99 \pm 0,54 \mu\text{M}$ (**Figura 3-A**). En las líneas tumorales humanas, también se aprecia un fuerte efecto antiproliferativo, pero a valores de IC_{50} alrededor del doble y del triple mayores para MDA-MB-231 y MCF7 respectivamente.

Para evaluar selectividad en el efecto antiproliferativo se utilizó una línea de mama humana normal, MCF-10A. El valor de IC_{50} fue $15,69 \pm 1,49 \mu\text{M}$ (**Figura 3-D**), resultando similar a las líneas tumorales humanas utilizadas. Sin embargo a bajas concentraciones (5 y 10 μM), MPENQ afectó selectivamente a las células tumorales (**Figura 4**).

En la **Tabla 1** se resumen los valores de IC_{50} correspondientes a las líneas celulares estudiadas.

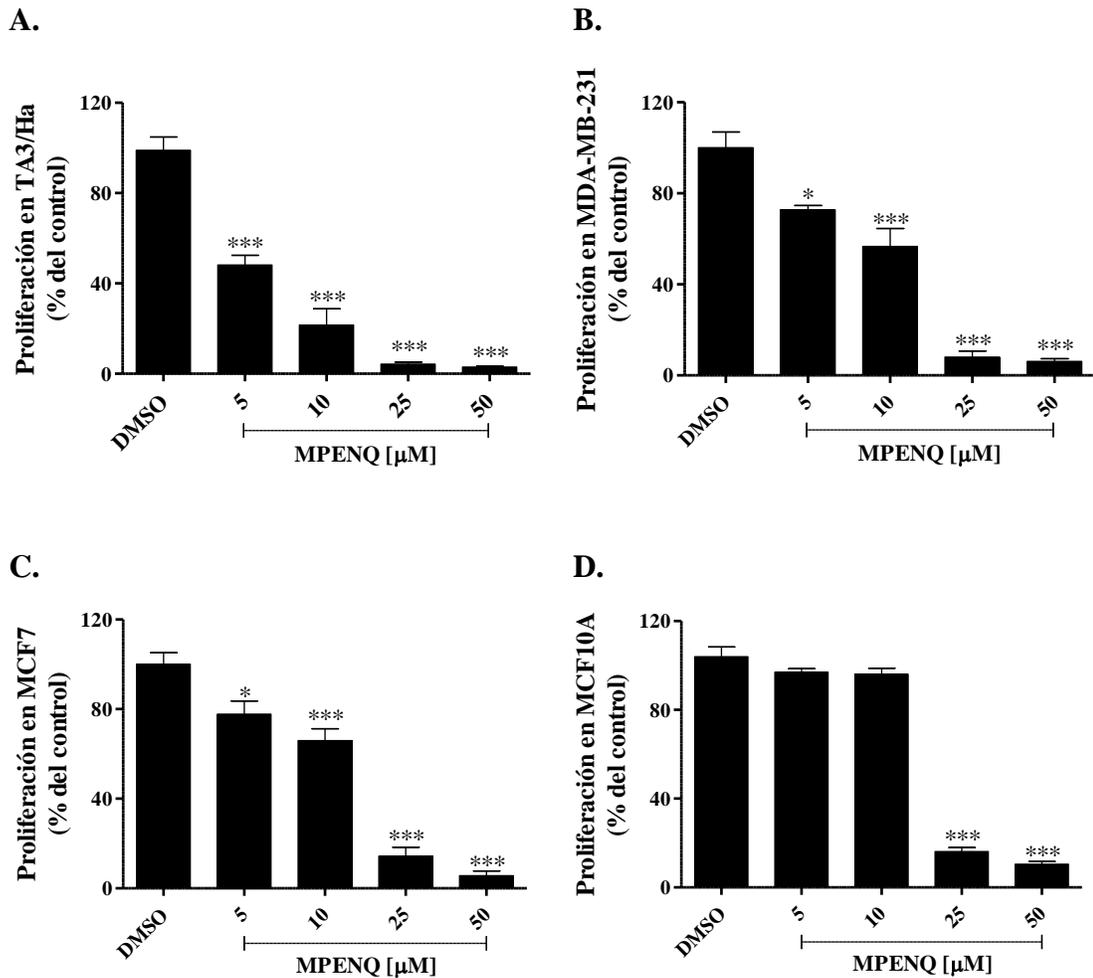


Figura 3: Efecto de MPENQ sobre la proliferación en células (A) TA3/Ha, (B) MDA-MB-231, (C) MCF7 y (D) MCF-10A. Las células fueron incubadas con 10% de suero fetal bovino y expuestas a concentraciones crecientes (5 a 50 μM) de MPENQ durante 48 horas. El efecto sobre la proliferación se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 48 horas.

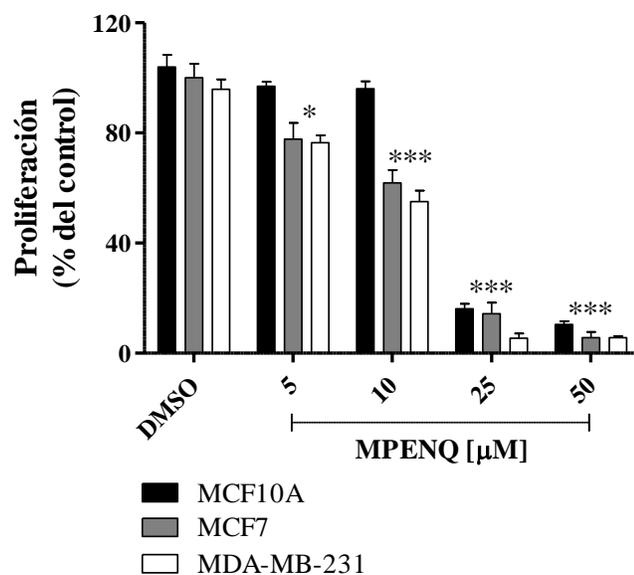


Figura 4: Selectividad de MPENQ sobre la proliferación en células MCF-10A. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (5 a 50 μM) de MPENQ durante 48 horas. El efecto sobre la proliferación se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

Línea celular	IC ₅₀ (48h)
TA3/Ha	4,99 \pm 0,54
MDA-MB-231	11,5 \pm 1,30
MCF7	17,82 \pm 2,69
MCF-10A	15,69 \pm 1,49

Tabla 1: Valores de IC₅₀ de MPENQ [μM] en células TA3/Ha, MDA-MB-231, MCF7 y MCF-10A. Los valores de IC₅₀ a 48 horas de exposición de MPENQ son expresados como promedio \pm SEM, N = 3.

EFEECTO ANTIPROLIFERATIVO DE MPENQ NO ES MEDIADO POR NQO1

NQO1 es una enzima detoxificante que cataliza la reducción de quinonas (como MPENQ) a hidroquinonas, inactivándolas o en algunos casos activándolas en sus efectos biológicos (Zhang and Go, 2009). Para evaluar si el efecto antiproliferativo de MPENQ es mediado por NQO1, se utilizaron células MCF7, en las cuales se ha reportado que está sobreexpresada la enzima, no así en la línea MDA-MB-231 (Sutton et al., 2012). Para ello, se utilizó dicumarol, un inhibidor no competitivo de NQO1 (Preusch et al., 1991), a la concentración de 5 μ M, la cual no afecta la proliferación de las células MCF7 (**Figura 5-A**). Se determinó el efecto mediante el ensayo de MTT, en el cuál las células se cultivaron con MPENQ en un rango de 5 a 50 μ M, en ausencia y presencia de dicumarol 5 μ M, durante 48 horas.

Como muestra la **Figura 5-B**, no se aprecian diferencias significativas entre el tratamiento con MPENQ en ausencia o presencia de dicumarol, sugiriendo que el efecto antiproliferativo de MPENQ en células MCF7 es independiente de la inhibición de NQO1.

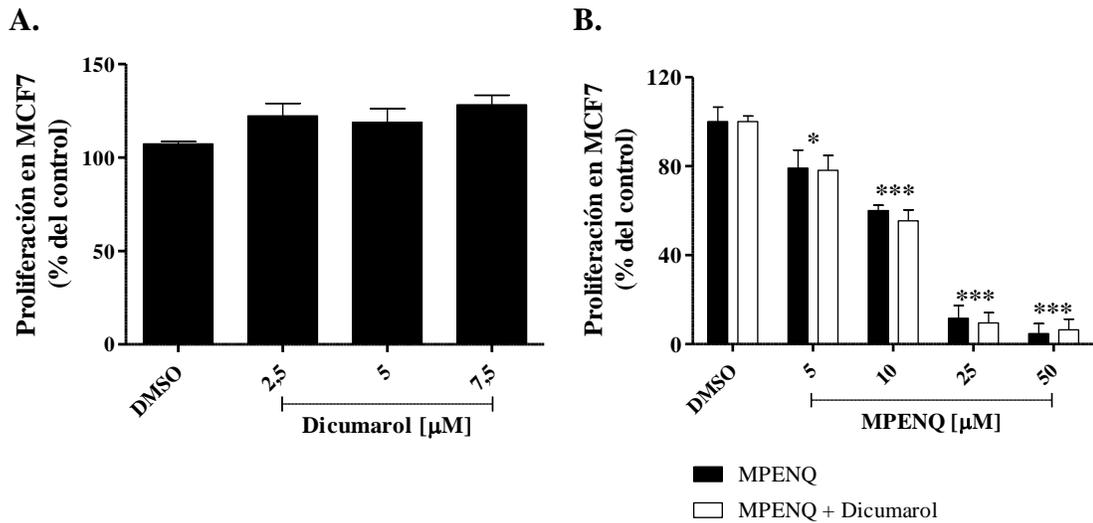


Figura 5: Efecto sobre la proliferación de MPENQ en células MCF7 es independiente de NQO1. (A) Efecto de dicumarol sobre la proliferación de células MCF7 y (B) efecto de la combinación MPENQ + dicumarol sobre la proliferación de células MCF7. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (5 a 50 μM) de MPENQ durante 48 horas. La concentración de dicumarol utilizada fue de 5 μM . El efecto sobre la proliferación se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 48 horas.

MPENQ AFECTA IRREVERSIBLEMENTE LA CLONOGENICIDAD DE CÉLULAS TUMORALES

Se ha descrito que una de las características de las células tumorales es su capacidad para formar colonias (Franken et al., 2006). Para evaluar si el efecto de MPENQ sobre la proliferación puede ser un evento reversible, células MCF7 y MDA-MB-231 fueron expuestas a concentraciones de 5 y 10 μ M durante 24 horas. Terminadas las 24 horas de exposición con el compuesto, se permitió la recuperación de las células tumorales para formar colonias durante 7 días. Como se muestra en la **Figura 6 A-B**, células MCF7 y MDA-MB-231 exhibieron una importante disminución en la formación de colonias. A pesar del tiempo transcurrido, una significativa disminución de la fracción sobreviviente de células fue obtenida (**Figura 6 C-D**), especialmente en células MDA-MB-231. Estos resultados sugieren que MPENQ produce un efecto irreversible sobre la capacidad clonogénica de células tumorales.

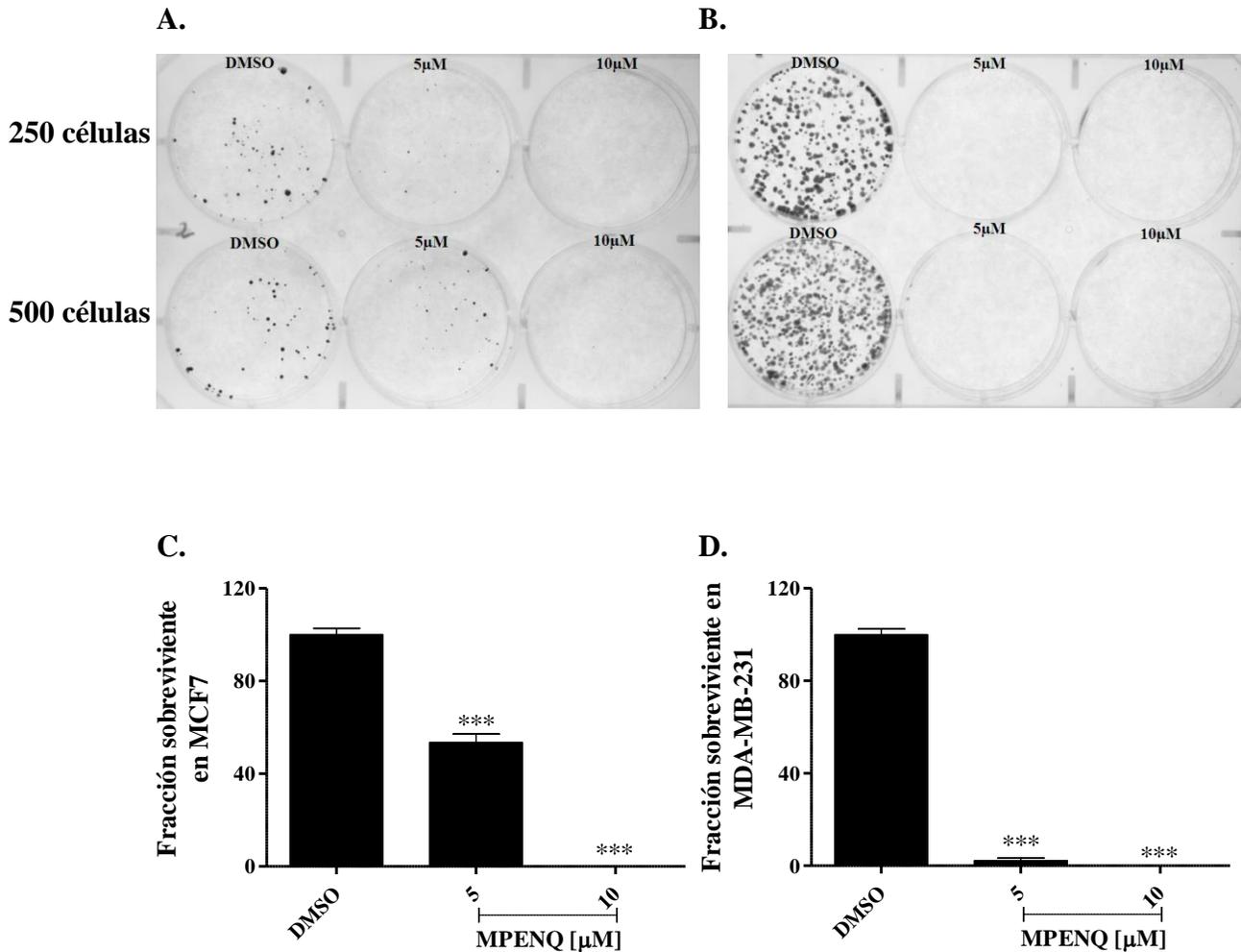


Figura 6: Efecto de MPENQ sobre la capacidad clonogénica en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Cálculo de la fracción sobreviviente en células (C) MCF7 y (D) MDA-MB-231. Se utilizaron 250 y 500 células, las cuales fueron expuestas a dos concentraciones (5 y 10 μM) de MPENQ durante 24 horas y se permitió el crecimiento de las colonias durante 7 días. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 24 horas.

MPENQ AFECTA EL METABOLISMO TUMORAL MEDIANTE DISMINUCIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL MÁXIMA

Considerando la importancia de la mitocondria y el metabolismo diferencial que poseen las células tumorales, se evaluó si MPENQ es capaz de afectar la respiración celular (OCR) y la acidificación del medio extracelular (ECAR) como una medida de la actividad glicolítica. Para ello se utilizaron las líneas tumorales humanas MCF7 y MDA-MB-231. Los cambios en los perfiles bioenergéticos (OCR y ECAR) de ambas líneas bajo distintas condiciones experimentales, se obtuvieron mediante el analizador de flujo extracelular XF⁹⁶. Los resultados presentados en la **Figura 7** y **Figura 8** muestran los efectos del compuesto MPENQ, en concentraciones de 5 a 25 μM , sobre el metabolismo tumoral en las células MCF7 y MDA-MB-231 respectivamente.

El compuesto produce una ligera inhibición en la respiración basal mitocondrial para la línea MCF7 (**Figura 7-A**), la que se recupera a mayor concentración (25 μM). Lo anterior, se traduce en un incremento leve de la acidificación del medio extracelular (**Figura 7-C**). En el caso de la línea MDA-MB-231 se observa una inhibición de la respiración basal mitocondrial (**Figura 8-A**) pero no se presenta un aumento significativo de la acidificación del medio extracelular (**Figura 8-C**). De forma interesante, estos datos sugieren que MPENQ afecta la respiración mitocondrial, además de inhibir el incremento compensatorio de la glicolisis en la línea MDA-MB-231, debido a su alta actividad glicolítica (Robey et al., 2008).

El mayor efecto inhibitorio de la respiración mitocondrial en ambas líneas tumorales es observado cuando se alcanza la respiración mitocondrial máxima (respiración en presencia de FCCP 100 nM) (**Figura 7-B** y **8-B** para MCF7 y MDA-MB-231 respectivamente). Estos resultados sugieren que MPENQ inhibe la respiración mitocondrial por interacción con la cadena transportadora de electrones.

Además se observa en la **Figura 7-D**, que el compuesto es capaz de inhibir la respiración acoplada a la síntesis de ATP, sugiriendo que MPENQ puede disminuir la síntesis de ATP mitocondrial.

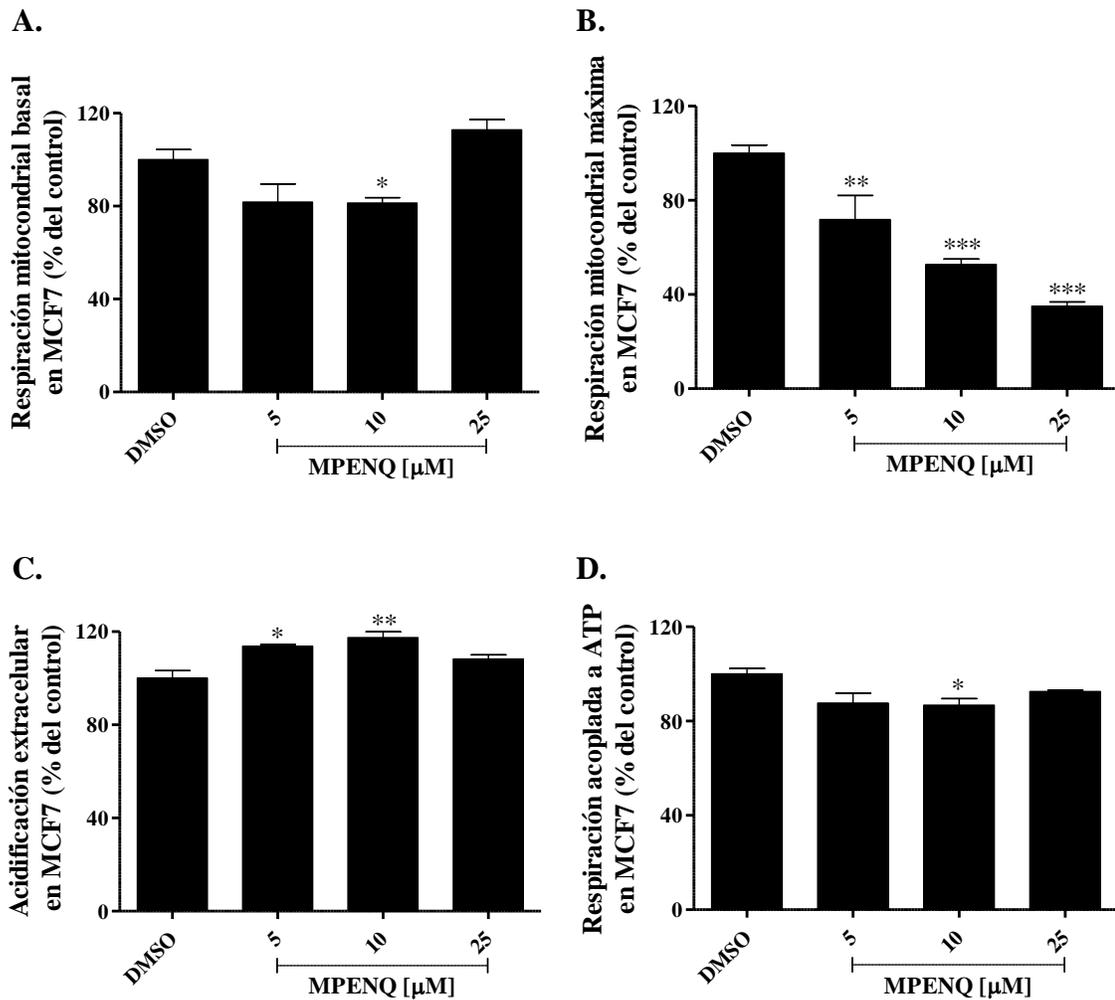


Figura 7: Efecto de MPENQ sobre el metabolismo tumoral en células MCF7. (A) Respiración basal mitocondrial, (B) respiración mitocondrial máxima, (C) acidificación extracelular del medio y (D) respiración acoplada a síntesis de ATP. El efecto sobre el consumo de oxígeno y acidificación del medio se obtuvieron mediante la inyección de MPENQ en Seahorse Bioscience. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

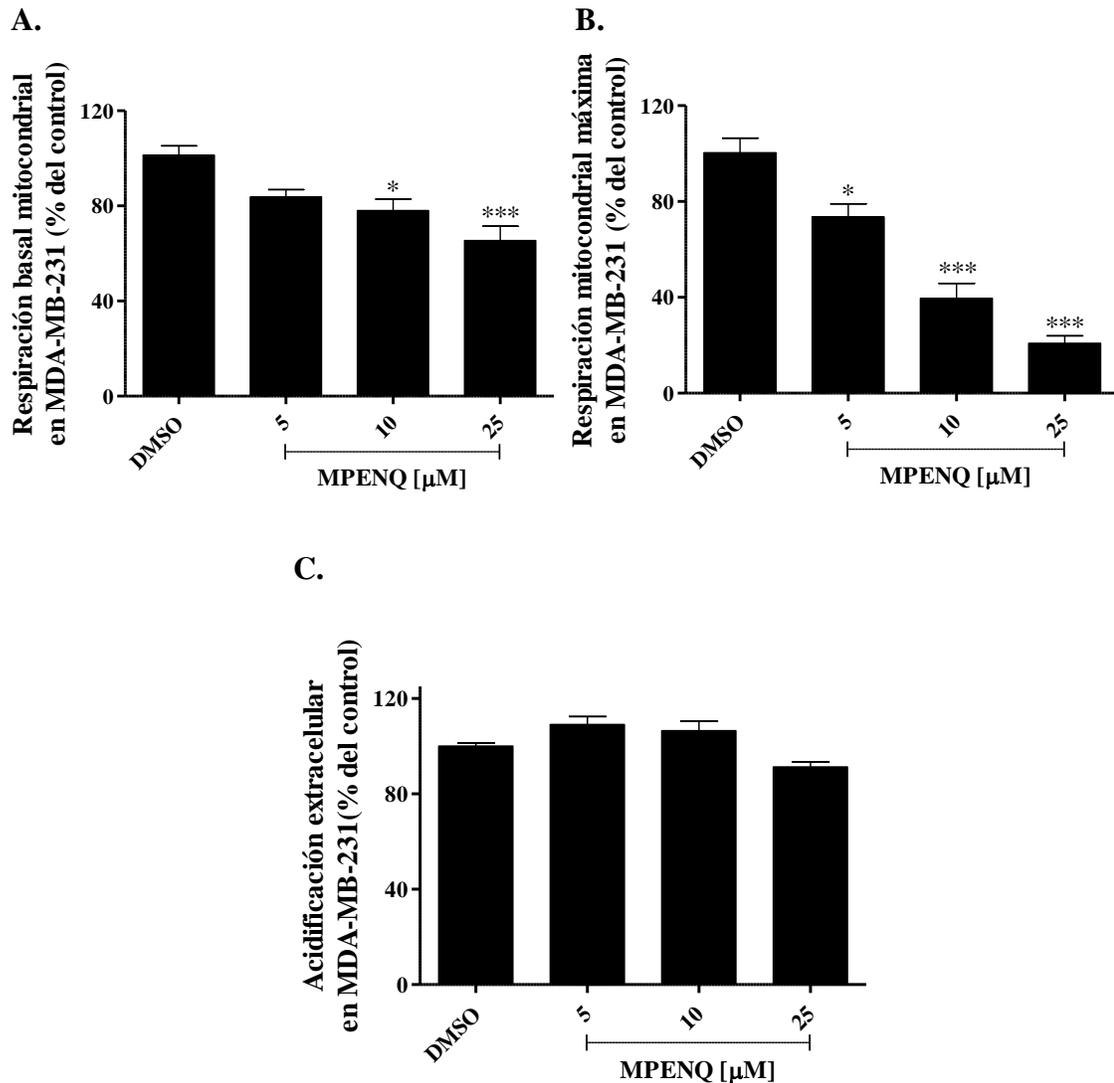


Figura 8: Efecto de MPENQ sobre el metabolismo tumoral en células MDA-MB-231. (A) Respiración basal mitocondrial, (B) respiración mitocondrial máxima y (C) acidificación extracelular del medio. El efecto sobre el consumo de oxígeno y acidificación del medio se obtuvieron mediante la inyección de MPENQ en Seahorse Bioscience. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control.

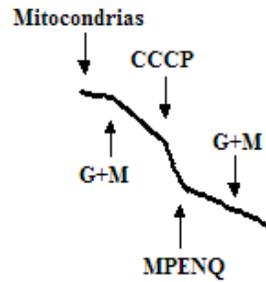
MPENQ AFECTA LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL POR INHIBICIÓN DEL COMPLEJO I Y II

Se evaluó el efecto del compuesto MPENQ en un modelo experimental de mitocondrias aisladas de TA3/Ha, para determinar si éste es capaz de interactuar con algún sitio de la cadena transportadora de electrones. Este modelo posee la ventaja de que se pueden suministrar sustratos específicos para cada complejo de la CTE, lo cual permite controlar las condiciones experimentales.

Para determinar si MPENQ interactúa con la CTE y modula la fosforilación oxidativa, se agregó el compuesto en presencia del desacoplante CCCP. Se utilizaron concentraciones en un rango de 10 a 50 μM de MPENQ.

Para identificar el sitio de acción del compuesto, se realizaron mediciones de la variación del consumo de oxígeno utilizando diferentes sustratos específicos para cada complejo de la cadena respiratoria. En la **Figura 9** se observa que MPENQ inhibe la respiración máxima mitocondrial dependiente de la concentración, cuando es estimulado el complejo I con glutamato + malato. Además se observa que el consumo de oxígeno es restaurado cuando el sustrato agregado, posterior a MPENQ, es duroquinol o TMPD + Ascorbato, no así con glutamato + malato o succinato. Esto sugiere que el compuesto MPENQ interactúa principalmente a nivel del complejo I y II.

A.



B.

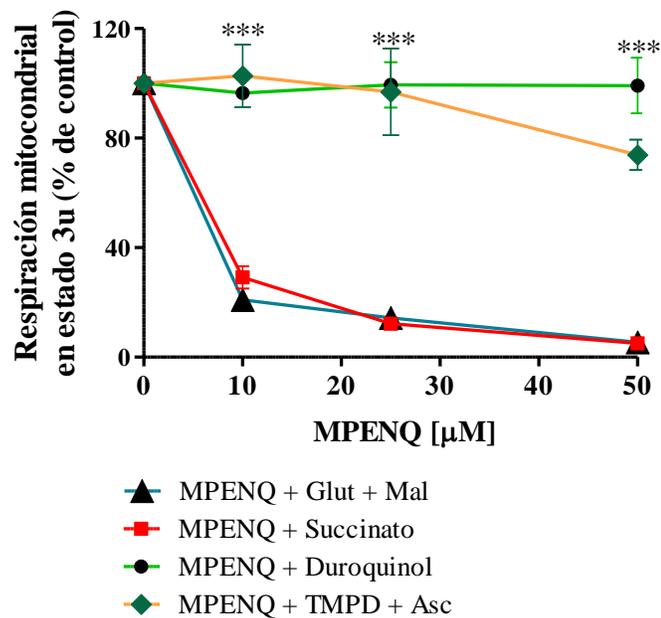


Figura 9: Efecto de MPENQ sobre la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de TA3/Ha. (A) Trazo representativo de mitocondrias. (B) Respiración mitocondrial en TA3/Ha. Las mitocondrias fueron expuestas a concentraciones crecientes del compuesto MPENQ (10 a 50 μM). Se denomina estado 3u al obtenido cuando se agrega un desacoplante como CCCP a las mitocondrias en presencia de oxígeno y sustratos, con lo cual aumenta la respiración a un estado similar al estado 3, donde la velocidad del flujo de electrones está limitada sólo por la capacidad de la cadena respiratoria. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. *** = $p \leq 0,001$ con respecto a MPENQ. Cada sustrato se normalizó por su propio control de respiración máxima.

EFEECTO DE MPENQ SOBRE PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS EN CÉLULAS MCF7 Y MDA-MB-231

El compuesto MPENQ es capaz de alterar el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones, puesto que ejerce una acción inhibitoria en los complejos I y II, lo cual se traduce en una alteración en el funcionamiento normal de la mitocondria que puede desencadenar en un efecto antiproliferativo.

Para evaluar cómo MPENQ es capaz de afectar la homeostasis mitocondrial, se evaluaron cambios en los parámetros bioenergéticos, los cuales dan cuenta del estado metabólico de las células analizadas tales como: el contenido intracelular de ATP, los niveles intracelulares de NAD(P)H y la producción de ROS mitocondrial

Teniendo en cuenta lo presentado en secciones anteriores, se evaluó el efecto de MPENQ sobre la respiración dependiente de la síntesis de ATP (**Figura 7-D**), sugiriendo una disminución en la síntesis de este nucleótido. Por lo tanto, se midieron los niveles intracelulares de ATP en líneas tumorales MCF7 y MDA-MB-231, las cuales se trataron con distintas concentraciones de MPENQ (5-25 μM) por 2 horas.

Como se muestra en la **Figura 10-A**, MPENQ produce una disminución en los niveles de ATP en MCF7 y MDA-MB-231, en forma dependiente de la concentración. A 5 μM de MPENQ, el contenido de ATP total disminuyó significativamente en MCF7 a $72,27 \pm 5,41\%$, y en MDA-MB-231 a $78,14 \pm 4,05\%$.

Para comprobar que la disminución de los niveles de ATP es producto de la alteración mitocondrial que realiza MPENQ y no de una alteración en la permeabilidad de la membrana externa de las células analizadas, se evaluó la integridad de ésta mediante el ensayo de incorporación de PI. Células MCF7 no incorporaron PI (**Figura 10-C**), indicando que mantienen su membrana íntegra a las concentraciones de MPENQ utilizadas. En contraste células MDA-MB-231 luego de 2 horas de tratamiento, presentan un deterioro importante de la permeabilidad (**Figura 10-D**). Estos resultados

indican que el compuesto actúa rápidamente en las células MDA-MB-231 afectando la homeostasis mitocondrial y la permeabilidad de la membrana en comparación con las células MCF7.

Debido a las características moleculares y el efecto inhibitorio que presenta MPENQ, se determinó si este compuesto al interferir con la CTE puede afectar los niveles de ROS mitocondrial en células tumorales. MPENQ aumentó la fluorescencia de la sonda respecto al control de manera dosis dependiente, entre 5 y 25 μM de manera significativa (**Figura 11**), en especial en la línea celular MDA-MB-231 (**Figura 11-B**), sugiriendo que MPENQ produce un incremento de anión superóxido a nivel mitocondrial. Estos resultados indican que este compuesto puede actuar por un mecanismo mediado por especies radicalarias a nivel mitocondrial.

Finalmente, se evaluó como MPENQ afecta los niveles intracelulares de NAD(P)H, debido a que éste nucleótido es la mayor fuente de equivalentes reducidos para el sistema antioxidante dependiente de glutatión (Chance et al., 1979). En la **Figura 12-A** y **12-B** se observa que MPENQ aumentó la fluorescencia correspondiente a NAD(P)H en ambas líneas tumorales a una concentración de 5 μM , similar a rotenona, un inhibidor conocido del complejo I. Lo anterior sugiere su acumulación producto de la inhibición de la CTE. De manera interesante, a mayores concentraciones de MPENQ, el aumento a 5 μM MPENQ no se observó, por el contrario los niveles de NAD(P)H en células MCF7 caen por debajo del control. Lo anterior sugiere que la línea MCF7 frente a MPENQ, utiliza los equivalentes de NAD(P)H, probablemente en la regeneración de glutatión reducido.

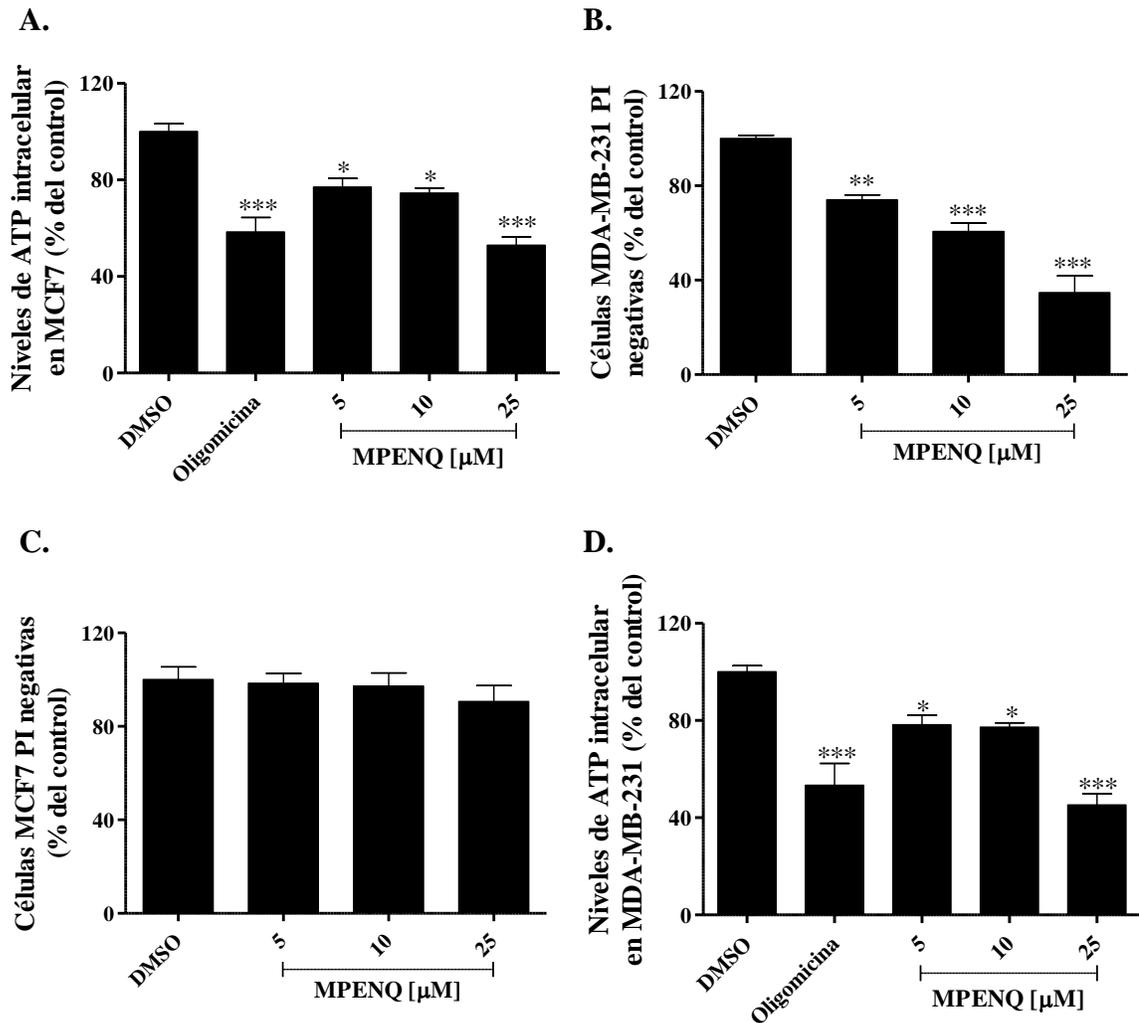


Figura 10: Efecto de MPENQ sobre los niveles de ATP intracelulares. Efecto de MPENQ sobre niveles ATP intracelulares en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Los niveles de ATP intracelular se obtuvieron mediante el ensayo luciferin-luciferasa previa incubación con MPENQ durante 2 horas. Se utilizó oligomicina 1mg/mL. **Incorporación de PI a 2 horas en células (C) MCF7 y (D) MDA-MB-231.** Los datos de incorporación de PI se obtuvieron mediante citometría de flujo previa incubación con MPENQ durante 2 horas. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 2 horas.

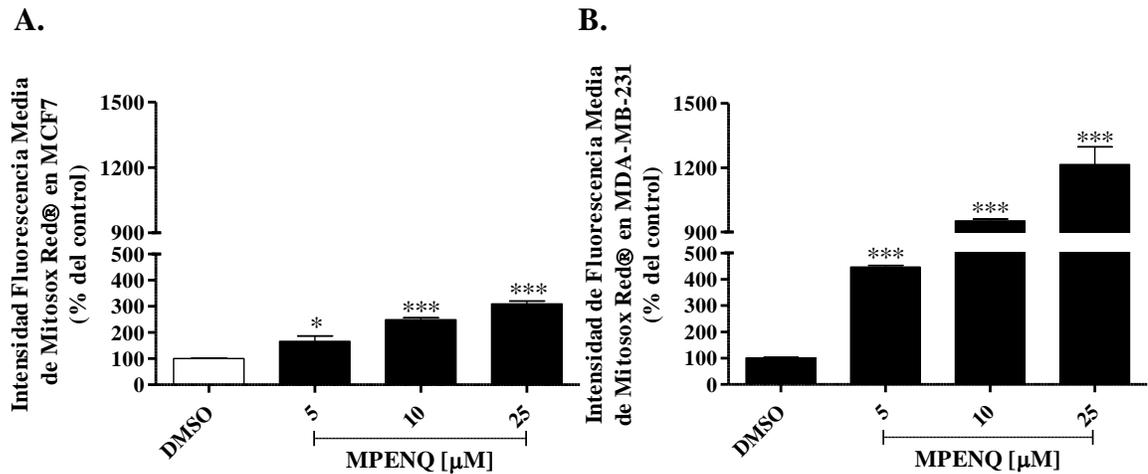


Figura 11: Efecto de MPENQ sobre la producción de anión superóxido en líneas (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. La intensidad de fluorescencia media de MitoSOX[®] Red se obtuvo mediante citometría de flujo. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 2 horas.

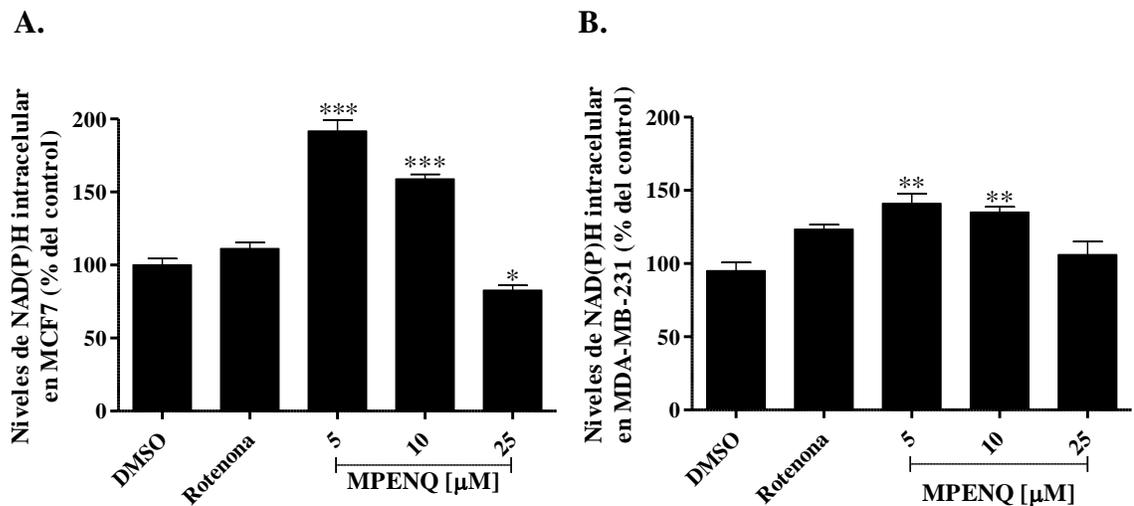


Figura 12: Efecto de MPENQ sobre los niveles intracelulares de NAD(P)H en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. La fluorescencia de NAD(P)H se obtuvo a 428nm mediante un espectrofluorómetro. Se utilizó rotenona 5 μ M. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 1 hora.

NAC Y CATALASA PROTEGEN FRENTE AL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE MPENQ

Debido a las características presentadas por MPENQ al inhibir el flujo de electrones en el complejo I y el complejo II con la consiguiente producción de ROS mitocondrial, se evaluó si las especies reactivas de oxígeno están involucradas en el efecto antiproliferativo del compuesto.

Para determinar lo anterior, se utilizó el antioxidante NAC a la concentración de 5 mM, donde la proliferación no presentó diferencias con respecto al control, en ninguna de las líneas utilizadas (**Figura 13-A** para células MCF7 y **Figura 13-C** para MD-MB-231).

Se determinó este efecto por el ensayo de MTT, en el cuál las células se cultivaron con MPENQ en un rango de 5 a 50 μ M, en ausencia y presencia de NAC 5 mM, durante 48 horas. En la **Figura 13-B** y **Figura 13-D** se observa que la disminución en la proliferación celular, en MCF7 y MDA-MB-231 respectivamente, es prevenida en presencia de NAC de manera significativa en la mayoría de las concentraciones de MPENQ. Este efecto protector se aprecia en forma más significativa en la línea MCF7.

Por otra parte, considerando el aumento en la producción de anión superóxido mitocondrial (**Figura 11**), el cual es transformado a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y éste es detoxificado por catalasa, se decidió incubar las células con catalasa PEG (CAT PEG).

Se determinó el efecto mediante el ensayo de MTT, en donde las células se cultivaron con MPENQ en un rango de 5 a 25 μ M, en ausencia y presencia de CAT PEG 100 U, la cual no afecta la proliferación celular de acuerdo a lo reportado (Pramanik et al., 2011), durante 48 horas. En la **Figura 14-A** se observa que la disminución en la proliferación celular en MCF7 es prevenida en presencia de CAT PEG a 25 μ M de MPENQ de manera significativa, no así en la línea MDA-MB-231 (**Figura 14-B**).

Ambos resultados sugieren que ROS está involucrado en el efecto antiproliferativo del compuesto al prevenir la disminución de la proliferación con NAC y catalasa.

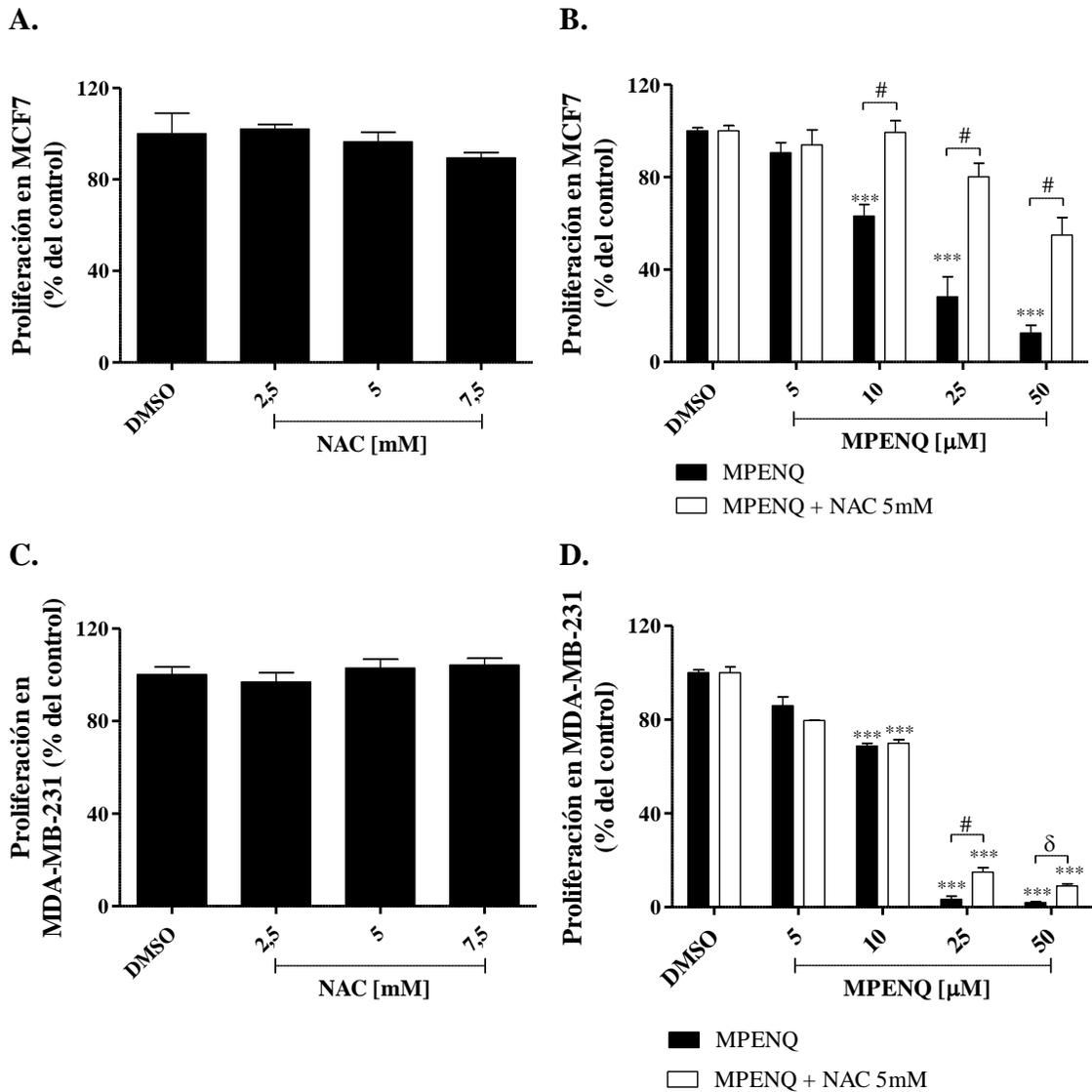


Figura 13: Efecto protector de NAC frente al efecto antiproliferativo de MPENQ. (A) Efecto de NAC sobre la proliferación en células (A) MCF7 y (C) MDA-MB-231. Efecto de MPENQ + NAC sobre la proliferación en células (B) MCF7 y (D) MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (5 a 50 μM) de MPENQ durante 48 horas. El efecto sobre la proliferación se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados son expresados como promedio ± SEM, N = 3. * = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 48 horas. # = $p \leq 0,001$; δ = $p \leq 0,05$.**

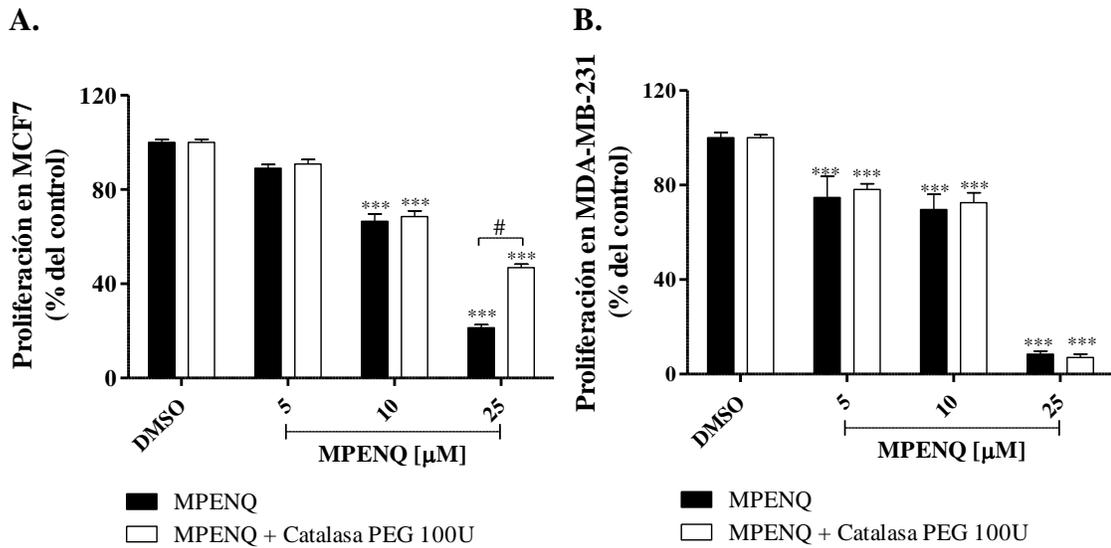


Figura 14: Efecto protector de catalasa frente al efecto antiproliferativo de MPENQ. Efecto de MPENQ + catalasa sobre la proliferación en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (5 a 50 μM) de MPENQ durante 48 horas. El efecto sobre la proliferación se estimó mediante el ensayo de MTT. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, $N = 3$. *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 48 horas. # = $p \leq 0,001$.

EFEECTO DE MPENQ SOBRE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN EN CÉLULAS TUMORALES

Glutación (GSH), es la principal molécula antioxidante presente en células y se ha reportado que tiene directa relación en la regulación de ROS mitocondrial. La desregulación en los niveles de GSH está relacionado con el estrés oxidativo y la inducción de muerte celular (Franco and Cidlowski, 2009). GSH actúa para reducir el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno generando el producto oxidado GSSG, el cual se reduce nuevamente a GSH por la glutación reductasa, enzima que utiliza equivalentes de NAD(P)H como sustrato (Chance et al., 1979).

Dada la importancia de GSH en el control del estrés oxidativo, se midió el efecto de MPENQ sobre los niveles intracelulares de dicho tripéptido. Para ello se utilizó la sonda fluorescente CMFDA, entregando una medición indirecta de la cantidad total de GSH presente. En células MCF7 y MDA-MB-231, la incubación con MPENQ durante 2 horas, no produce cambios respecto al control (**Figura 15**), sugiriendo que este proceso de detoxificación no está fuertemente alterado impidiendo a que el proceso de necrosis fuese un mecanismo de muerte celular importante.

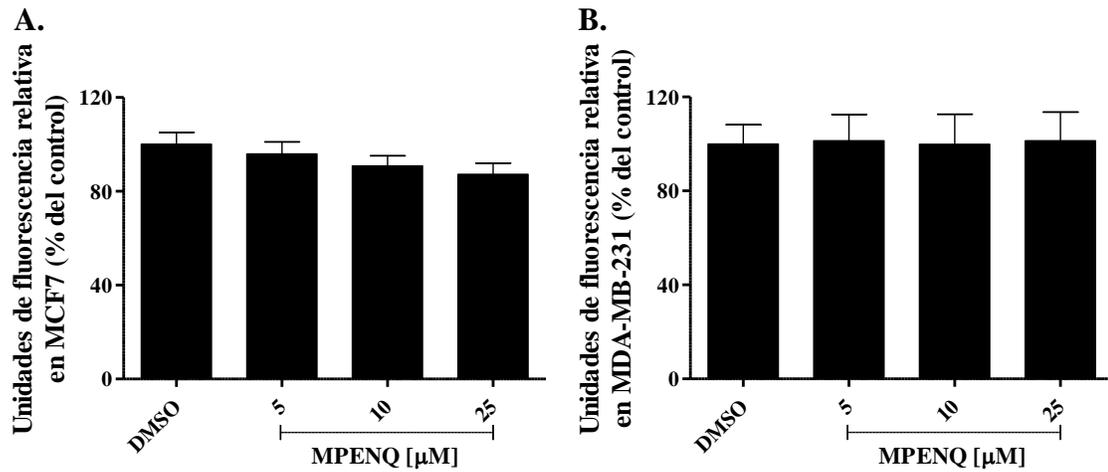


Figura 15: Efecto sobre los niveles de GSH en células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de MPENQ (5 a 50 μ M) durante 48 horas. Los niveles de GSH se midieron mediante la sonda CMFDA. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 2 horas.

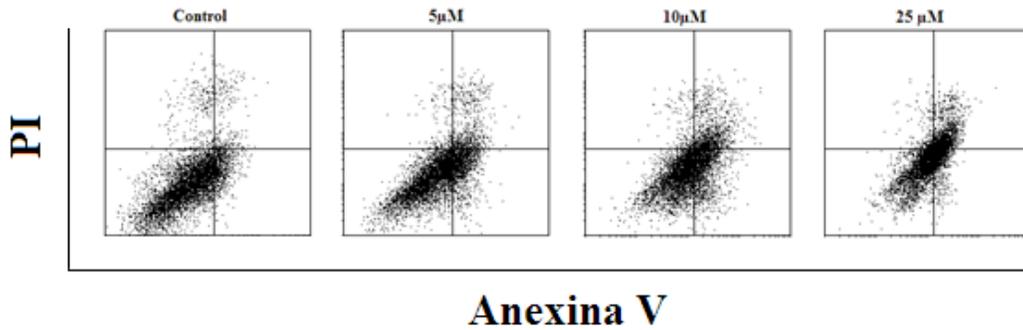
MPENQ INDUCE APOPTOSIS EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS

Se ha descrito que alteraciones en las funciones bioenergéticas, como la disminución del potencial de membrana, síntesis de ATP y la generación de ROS inducen la muerte celular. De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, se determinó el tipo de muerte que el compuesto MPENQ es capaz de producir en células MCF7 y MDA-MB-231. Para ello se evaluaron parámetros morfológicos y bioquímicos clásicos de la muerte celular, como la exposición de fosfatidilserina, un marcador de apoptosis, el cual puede ser identificado mediante anexina V (AV) y la permeabilización de la membrana plasmática, que se aprecia por la incorporación de yoduro de propidio (PI).

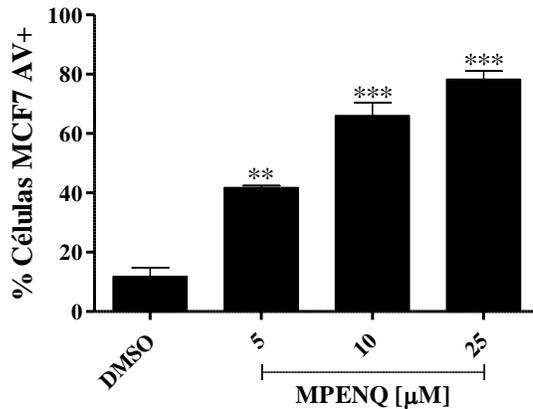
En la **Figura 16-A** se observa que en células MCF7, luego de 24 horas de incubación con MPENQ (5 – 25 μ M), el compuesto induce apoptosis, la cual puede ser diferenciada como apoptosis temprana, definida como población PI-/AV+ y tardía (población PI+/AV+). En la **Figura 16-B** se presenta apoptosis total, la cual aumenta significativamente hasta un $75,27 \pm 11,77\%$ a 25 μ M. Además, se evaluó la presencia de necrosis (población PI+/AV-), en la **Figura 16-C**, la cual no supera el 4% en todas las concentraciones. De la misma manera, en la **Figura 17-A** se observa en células MDA-MB-231 un aumento significativo de la apoptosis temprana, pero principalmente tardía luego de 24 horas de tratamiento. En la **Figura 17-B** se presenta apoptosis total, la cual alcanza hasta un $75,37 \pm 5,04\%$ a 25 μ M. En el caso de la población PI+/AV- (**Figura 17-C**), éstas no superan el 3% en todas las concentraciones.

Estos resultados sugieren que el compuesto MPENQ induce predominantemente muerte celular apoptótica en ambas líneas tumorales.

A.



B.



C.

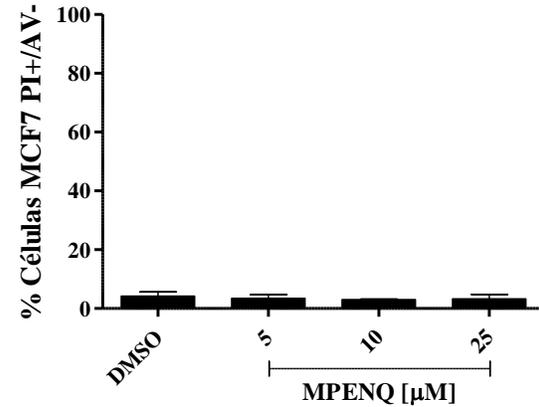


Figura 16: Efecto de MPENQ sobre el tipo de muerte celular en MCF7. (A) Efecto de MPENQ sobre la muerte celular en MCF7. (B) Apoptosis total (temprana y tardía) y (C) población PI+/AV-. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (5 a 50 μ M) de MPENQ durante 24 horas. El tipo de muerte se determinó mediante citometría de flujo por incorporación de Anexina V y PI. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 24 horas.

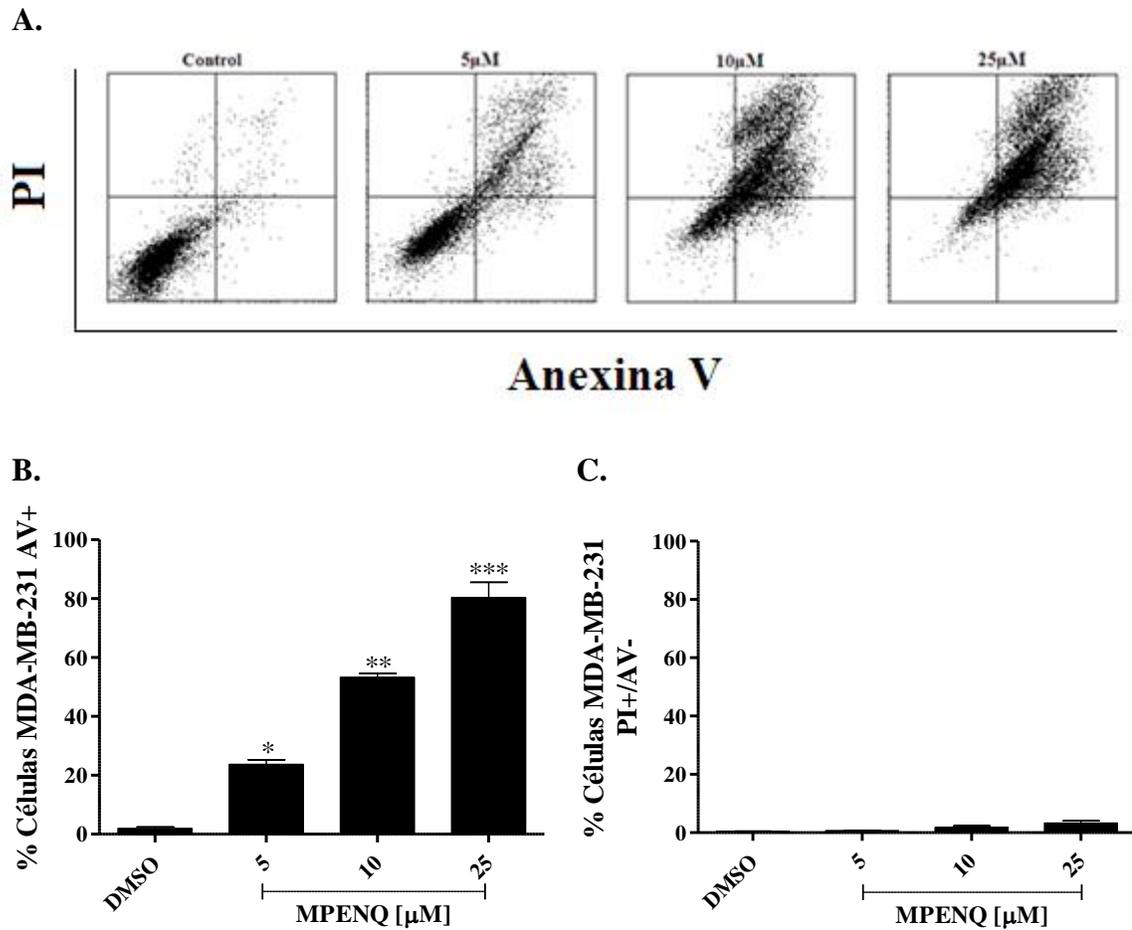


Figura 17: Efecto de MPENQ sobre el tipo de muerte celular en MDA-MB-231. (A) Efecto de MPENQ sobre la muerte celular en MDA-MB-231. (B) Apoptosis total (temprana y tardía) y (C) población PI+/AV-. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (5 a 50 μM) de MPENQ durante 24 horas. El tipo de muerte se determinó mediante citometría de flujo por incorporación de Anexina V y PI. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 24 horas.**

MPENQ AFECTA LA MIGRACIÓN DE CELULAS TUMORALES MDA-MB-231

Se ha descrito que una de las dificultades en el tratamiento del cáncer de mama y la principal causa de muerte se debe al comportamiento invasivo de las células tumorales, debido a la migración que presentan, las cuales producen metástasis (Weng and Yen, 2012). Dado lo anterior, se utilizó la línea tumoral MDA-MB-231, la cual ha sido reportada como altamente invasiva (Blick et al., 2008). Para observar los cambios de migración en las células MDA-MB-231 se utilizó el ensayo de la herida. Se trataron las células con MPENQ a concentraciones de 1 y 2,5 μM , las cuales no afectan la viabilidad a 24 horas como se observa en la **Figura 18-A**.

Se observa en la **Figura 18-B**, que luego de 24 horas de exposición, el control es capaz de avanzar un $28,03 \pm 4,37\%$, con respecto al 100% del área de la herida. En cambio en las células expuestas a MPENQ 2,5 μM sólo se observa un avance de $11,30 \pm 3,90\%$, lo cual es significativo. Este resultado sugiere que MPENQ es capaz de inhibir la migración a bajas concentraciones.

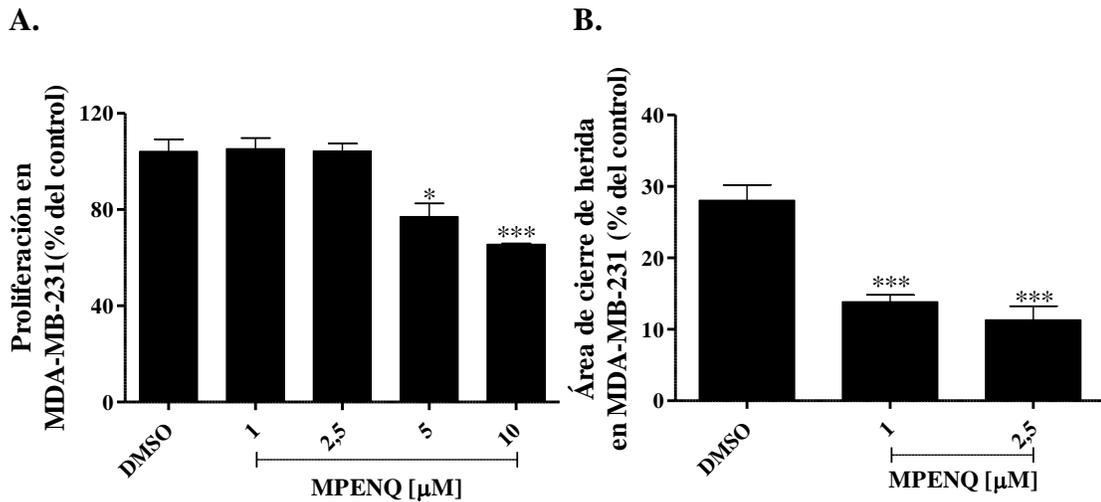


Figura 18: Efecto de MPENQ sobre la migración en células MDA-MB-231. (A) Efecto de MPENQ sobre la viabilidad en células MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes (1 a 10 μ M) de MPENQ durante 24 horas. El efecto sobre la proliferación se estimó mediante el ensayo de MTT. **(B) Efecto de MPENQ sobre la migración en células MDA-MB-231.** Las células fueron expuestas a concentraciones 1 y 2,5 μ M de MPENQ durante 24 horas. El ensayo de migración se realizó mediante el ensayo de la herida. Cada concentración está normalizada por su propio control a tiempo 0. Los resultados son expresados como promedio \pm SEM, N = 3. * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con DMSO durante 24 horas.

6. DISCUSIÓN

Las células tumorales presentan patrones metabólicos específicos, debido a su creciente necesidad de una serie de macromoléculas para sostener la alta tasa de proliferación (Ferreira et al., 2012). Para lograr sobrevivir, las células son capaces de alterar los distintos procesos metabólicos para generar precursores para las distintas reacciones bioenergéticas. Una de las características principales del cáncer es la aumentada glicólisis aeróbica, descrita por Warburg, que le confiere a las células tumorales la posibilidad de proliferar en ambientes desfavorables en el que se encuentran con baja disponibilidad de nutrientes e hipoxia (Semenza, 2009). Además presentan adicción a la glutamina, aumento de la síntesis de ácidos grasos y aumento en la vía de las pentosas (Pathania et al., 2009). Los procesos previamente mencionados se definen como reprogramación metabólica (Hanahan and Weinberg, 2011) y una interesante estrategia terapéutica sería alterar dichos procesos.

Se ha reportado que las 1,4-naftoquinonas poseen una variedad de propiedades farmacológicas, dentro de las que destaca su acción anticancerígena (Kayashima et al., 2009; Lee et al., 2007; Seshadri et al., 2011). Se ha descrito que 1,4-naftoquinona, 6-(4-metil-pent-3-enil)-1,4-naftoquinona (MPENQ, **Figura 2**), exhibe actividad citotóxica en una variedad de células tumorales (pulmón, colon, piel) con valores de IC₅₀ en el rango de 1 a 10 μ M (Miguel del Corral et al., 2002). Además se reportó que MPENQ es capaz de inhibir la respiración mitocondrial en células tumorales murinas TA3-MTX-R (Araya-Maturana et al., 2006). En el presente trabajo se examinó el mecanismo de acción a nivel mitocondrial del compuesto MPENQ sobre dos líneas representativas de cáncer de mama humano MCF7 y MDA-MB-231. Se utilizó este modelo por las características bioenergéticas que presenta cada línea, siendo las células MCF7 oxidativas y las células MDA-MB-231 altamente glicolíticas (Moreno-Sanchez et al., 2014).

Los resultados obtenidos indican que MPENQ disminuye la proliferación de manera dependiente de la concentración en células MCF7 y MDA-MB-231 (**Figura 3**) con valores de IC_{50} de $11,5 \pm 1,30$ y $17,82 \pm 2,69$ μ M respectivamente a 48 horas. Paralelamente se evaluó el efecto antiproliferativo del compuesto en células de epitelio mamario normal MCF-10A, como indicador de selectividad. Los resultados indican que MPENQ presenta un IC_{50} similar a las líneas tumorales estudiadas (**Tabla 1**). Sin embargo a 5 y 10 μ M no tiene efecto significativo sobre la proliferación en la línea normal (**Figura 4**).

Por otra parte, NQO1 corresponde a una enzima, la cual es capaz de metabolizar quinonas a hidroquinonas evitando la formación de la semiquinona que produce radicales libres y el ciclo redox (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010). Se ha observado que esta enzima tiene la capacidad de disminuir la actividad de un compuesto al metabolizarlo, detoxificando las células (Sutton et al., 2012). Sin embargo, se ha descubierto que es necesaria para la activación de compuestos como estreptonigrina (Lewis et al., 2005). Debido a que MPENQ presenta un núcleo quinónico, existe la posibilidad que esta enzima pueda afectar la actividad de dicho compuesto. Se ha reportado que la línea MCF7 sobre-expresa esta enzima (Sutton et al., 2012). Nuestros resultados indican que su acción no está mediada por NQO1, debido a que inhibiendo su actividad enzimática no hay efecto en la actividad antiproliferativa del compuesto (**Figura 5**).

Con respecto al efecto del compuesto sobre la capacidad de formación de colonias, se logra comprobar que a las concentraciones utilizadas (5 y 10 μ M) (**Figura 6**), en las cuales la viabilidad disminuye en un 20% aproximadamente (**Figura 18**), las colonias con el transcurso de los días no son capaces de recuperarse. De acuerdo a lo descrito por Bolton sobre el mecanismo de acción del núcleo quinónico (Bolton et al., 2000) que posee el compuesto MPENQ, se sugiere que éste es capaz de unirse covalentemente a biomoléculas vitales como proteínas y ácidos nucleicos, evitando así la formación de colonias en las células tumorales.

Considerando los modelos celulares utilizados, se evaluó el efecto del compuesto sobre el metabolismo celular y se comprobó que es capaz de inhibir la respiración celular. MPENQ fue capaz de disminuir de manera significativa la respiración máxima mitocondrial, lo cual sugiere que el compuesto es capaz de afectar la CTE. Si se presentan alteraciones en la CTE, se produce una disfunción mitocondrial, lo que conlleva a una disminución en la producción de ATP y la capacidad energética de la célula, aumenta la formación de anión superóxido y con ello otras especies reactivas de oxígeno, lo que finalmente promueve la liberación de factores pro-apoptótico (Scheffler, 2001).

Es importante notar la diferencia en la respuesta compensatoria que presenta cada línea celular frente a la acción de MPENQ. Una vez producida la inhibición en la cadena transportadora de electrones, MCF7 produjo una rápida respuesta glicolítica (**Figura 7-C**). Se ha reportado ampliamente que las células MDA-MB-231 presentan una actividad oxidativa disminuida y una glicolisis aumentada (Robey et al., 2008), es por ello que no se esperaba una respuesta compensatoria por efecto del compuesto (**Figura 8-C**).

MPENQ disminuye la respiración acoplada a la síntesis de ATP en las células MCF7. Consecuente con esto, el compuesto produce una disminución en los niveles intracelulares totales de ATP en las líneas tumorales (**Figura 10-A y 10-B**). Se ha observado que compuestos con capacidad de disminuir la CTE presentan similar comportamiento (Jaña et al., 2013; Pramanik et al., 2011; Urra et al., 2013). El tiempo óptimo de tratamiento para medir una caída de ATP y una mínima permeabilización producto de la acción de MPENQ se realizó mediante el ensayo de incorporación de yoduro de propidio. Así se comprobó que la naftoquinona estudiada es capaz de afectar rápidamente la permeabilidad de la membrana celular en la línea MDA-MB-231 (**Figura 10-D**). Bajo las condiciones experimentales, la caída de los niveles de ATP por acción del compuesto se debe por un efecto directo en el transporte de electrones y/o la permeabilización de la membrana. En las células MCF7 los resultados indican que la disminución se debe por malfuncionamiento de la CTE al no presentar permeabilización

de membrana. En cambio en la línea MDA-MB-231, al tiempo de exposición la membrana se permeabilizó rápidamente, lo cual sugiere que dicha línea es más sensible al compuesto afectando otras funciones mitocondriales que requieran del acoplamiento del flujo de electrones.

Con respecto a la inhibición observada que produce el compuesto, se evaluó en qué sitio de la CTE ocurre. Se ha descrito que en mamíferos, el complejo I: NADH ubiquinona:oxidoreductasa es el principal punto de entrada de los electrones a la CTE. Éste oxida NADH a NAD^+ , reduce a la ubiquinona a ubiquinol, y usa la diferencia de potencial redox para mover protones a través de la membrana interna mitocondrial. Los protones transportados contribuyen a mantener la fuerza protón motriz ($\Delta\mu$) necesaria para la síntesis de ATP y otros procesos de transporte (Hirst, 2010). Además, está ampliamente reportado que el complejo I es una de las principales fuentes de ROS (Murphy, 2009). Por su parte, el complejo II: succinato deshidrogenasa posee una actividad dual, une las vías metabólicas más importantes de la mitocondria: el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (Cecchini, 2003) y oxida el succinato a fumarato, transfiriendo los electrones a la ubiquinona para entregarlos al complejo III y posteriormente al IV, lo que corresponde a otro punto de entrada de los electrones (Ackrell, 2000). La mitocondria es reconocida como una de las mayores fuentes de ROS, debido a la incompleta reducción del oxígeno durante el flujo de electrones (Xiao et al., 2008). El complejo I y III son reconocidos como los mayores productores de especies reactivas de oxígeno (Brand, 2010). Sin embargo el impacto del complejo II en la producción de ROS ha sido subestimada durante el último tiempo. Estudios recientes han demostrado que el complejo II puede producir ROS de manera significativa cuando la CTE está inhibida (Quinlan et al., 2012; Siebels and Drose, 2013). MPENQ se presenta como un inhibidor dual del complejo I y II (**Figura 9**), lo cual no se ha sido reportado extensamente. Con respecto al complejo I se conocen diversos inhibidores y la mayoría inducen la generación de ROS, como es el caso de rotenona (Moreno-Sanchez et al., 2007). En el caso del complejo II, se ha observado que el inhibidor succinato de α -tocoferol (α -TOS), es capaz de inducir apoptosis por una rápida generación de ROS

(Kluckova et al., 2013). Por lo tanto, considerando que ambos complejos son capaces de aumentar la producción de ROS independientemente, es posible sugerir que al inhibir de manera simultánea ambos complejos, la cantidad de ROS producida será mayor.

Debido a que los niveles de ROS son elevados en células tumorales, lo que contribuye a la proliferación, crecimiento y migración, a diferencia de sus pares normales (Trachootham et al., 2006), dichas células son más susceptibles a estímulos exógenos que aumenten la cantidad de ROS, superando su capacidad antioxidante. Como se presentó anteriormente, inhibir los complejos enzimáticos mitocondriales conlleva a un aumento en la producción de ROS. Esto ocurre debido a la acumulación de electrones a lo largo de la CTE, que pueden ser capturados por el oxígeno, formando anión superóxido (Schumacker, 2006). Esto es consecuente con lo observado en ambas líneas tumorales, en las cuales los niveles de anión superóxido mitocondrial aumentan significativamente (**Figura 11**). Por lo tanto, de acuerdo a la hipótesis planteada, se observó que el ROS producido por la inhibición de los complejos I y II está estrechamente relacionada con el efecto antiproliferativo, debido a que NAC, un antioxidante común, y catalasa, una enzima detoxificante que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, fueron capaces de prevenir el efecto antiproliferativo de MPENQ en células MCF7 (**Figuras 13 y 14**). En el caso de las células MDA-MB-231 no se logró apreciar el efecto protector, puesto que por la excesiva producción de ROS, los antioxidantes utilizados no son capaces de prevenir el efecto de MPENQ.

Considerando la naturaleza detoxificante y antioxidante del glutatión, el cual es responsable de mantener el balance redox (Trachootham et al., 2006), se esperarían cambios en el contenido total celular debido a la alta producción de ROS por MPENQ. Además el compuesto produce una drástica disminución de los equivalentes reducidos de NAD(P)H a altas concentraciones de MPENQ (**Figura 12**), los cuales son necesarios para la regeneración de GSH. Debido a lo anterior se cuantificó la cantidad de GSH (**Figura 15**), pero no se presentaron cambios en ninguna de las líneas tumorales, lo cual

sugiere que la disminución de dicho tripéptido requiere mayor tiempo del que fue medido para encontrar una disminución importante o problemas en la técnica empleada, la cual al medir los tioles totales, puede no ser lo suficientemente sensible para censar estos cambios.

Se ha reportado que las naftoquinonas inducen apoptosis en células tumorales a través de del exceso de formación de ROS (Aithal et al., 2009; Simamura et al., 2006), que es capaz de activar de vías de señalización pro-apoptóticas y caspasas (Curtin et al., 2002; Higuchi, 2004). MPENQ al afectar la bioenergética de las células tumorales e inducir la formación de altas cantidades de ROS, no sólo es capaz de afectar la proliferación, sino que además, induce apoptosis en células MCF7 y MDA-MB-231 (**Figura 16 y Figura 17**).

Por otra parte, se observó el efecto del compuesto MPENQ sobre la migración. Una de las características importantes que presentan las células que migran es la formación de lamelopodios. La formación de éstos depende de la reorganización y ensamblaje del citoesqueleto, lo que permite a las células impulsarse hacia otros lugares y requiere de altas cantidades de energía (Hood and Cheresch, 2002). La mitocondria juega un rol importante en la producción de energía al sintetizar ATP por fosforilación oxidativa o glicolisis. Además contribuye a la homeostasis del calcio, necesario para la contracción y relajación del citoesqueleto (Zhao et al., 2013). Por lo tanto se evaluó si MPENQ es capaz de inhibir la migración en la línea MDA-MB-231, las cuales tienen capacidad migratoria. Se observó que el compuesto disminuye el avance de las células en concentraciones en las cuales la viabilidad no se ve afectada (**Figura 18**). Esto se debe a que el compuesto es capaz de disminuir los importantes niveles de ATP necesarios para la migración, los cuales escapan de las células MDA-MB-231 al existir permeabilización de membrana.

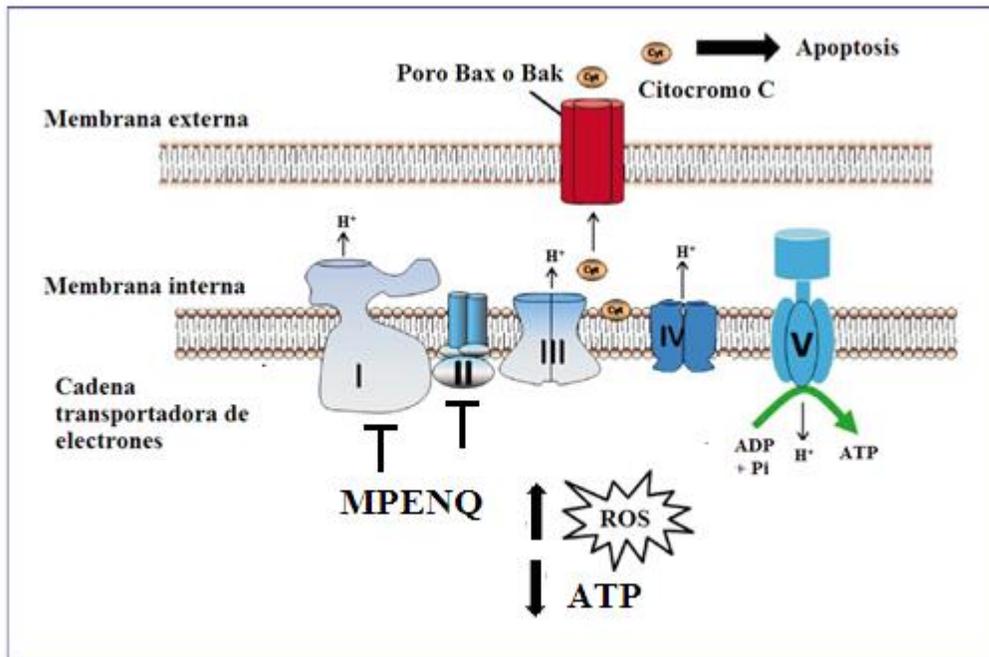


Figura 19: Efectos de MPENQ sobre la cadena transportadora de electrones

7. CONCLUSIONES

MPENQ presenta selectivamente efectos antiproliferativos en células tumorales MCF7 y MDA-MB-231 en un rango de concentración de 5 a 10 μ M.

MPENQ inhibe la respiración en células MCF7 y MDA-MB-231, afectando la máxima respiración mitocondrial

La inhibición de la respiración mitocondrial producida por MPENQ ocurre en el Complejo I (NADH deshidrogenasa) y II (Succinato deshidrogenasa).

MPENQ genera una disfunción mitocondrial en células tumorales MCF7 y MDA-MB-231 al inhibir el flujo de electrones, lo cual conlleva a una disminución de los niveles de ATP, aumento de los niveles de ROS y disminución en los niveles de NAD(P)H.

MPENQ induce muerte celular por apoptosis en células tumorales MCF7 y MDA-MB-231.

MPENQ inhibe la migración en células tumorales MDA-MB-231.

8. REFERENCIAS

Ackrell, B.A. (2000). Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Letters* 466, 1-5.

Aithal, B.K., Kumar, M.R., Rao, B.N., Udupa, N., and Rao, B.S. (2009). Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. *Cell Biological International* 33, 1039-1049.

Araya-Maturana, R., Cardona, W., Cassels, B.K., Delgado-Castro, T., Ferreira, J., Miranda, D., Pavani, M., Pessoa-Mahana, H., Soto-Delgado, J., and Weiss-Lopez, B. (2006). Effects of 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorg Med Chem* 14, 4664-4669.

Blick, T., Widodo, E., Hugo, H., Waltham, M., Lenburg, M.E., Neve, R.M., and Thompson, E.W. (2008). Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clinical & experimental metastasis* 25, 629-642.

Bolton, J., Trush, M., Penning, T., Dryhurst, G., and Monks, T. (2000). Role of Quinones in Toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 13, 136-160.

Brand, M.D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology* 45, 466-472.

Brenner, C., and Grimm, S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25, 4744-4756.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer* 11, 85-95.

Carafoli, E. (2010). The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen? *Biochimica et biophysica acta* 1797, 595-606.

Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual review of biochemistry* 72, 77-109.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer* 2, 647-656.

Curtin, J., Donovan, M., and Cotter, T. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 265, 49-72.

Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiological reviews* 59, 527-605.

Checker, R., Sharma, D., Sandur, S.K., Khanam, S., and Poduval, T.B. (2009). Anti-inflammatory effects of plumbagin are mediated by inhibition of NF-kappaB activation in lymphocytes. *International immunopharmacology* 9, 949-958.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., and Cantley, L.C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 230-233.

Da Silva, A., Buarque, C., Brito, F., Aurelian, D., Macedo, L., L., M., Hickey, R., Lopes, D., Noël, F., Murakami, Y., et al. (2002). Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of New 1,4-Naphthoquinones Structurally Related to Lapachol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 2731-2738.

Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of biochemistry and biophysics* *501*, 116-123.

Dranka, B.P., Hill, B.G., and Darley-Usmar, V.M. (2010). Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* *48*, 905-914.

Ferreira, L.M., Hebrant, A., and Dumont, J.E. (2012). Metabolic reprogramming of the tumor. *Oncogene* *31*, 3999-4011.

Fogg, V., Lanning, N., and MacKeigan, J. (2011). Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese Journal of Cancer* 2011 *30*.

Franco, R., and Cidlowski, J.A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell death and differentiation* *16*, 1303-1314.

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* *1*, 2315-2319.

Frey, C., Pavani, M., Cordano, G., Munoz, S., Rivera, E., Medina, J., Morello, A., Diego Maya, J., and Ferreira, J. (2007). Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* *146*, 520-527.

Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation* *14*, 1237-1243.

Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Rigoni, A., Vacchelli, E., Michaud, M., Zischka, H., Castedo, M., and Kroemer, G. (2010). Mitochondrial gateways to cancer. *Molecular aspects of medicine* 31, 1-20.

Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2010). The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Molecular aspects of medicine* 31, 60-74.

Gordaliza, M., Miguel del Corral, J.M., Castro, M.A., San Feliciano, A., and García-Grávalos, M.D. (1996). Synthesis and Bioactivity of New Antineoplastic Terpenylquinones *Bioorganic Medical Chemistry Letters* 6, 1859-1864.

Goulart, M., Falkowski, P., Ossowski, T., and Liwo, A. (2003). Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. *Bioelectrochemistry* 59, 85-87.

Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences* 35, 505-513.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Higuchi, Y. (2004). Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J. Cell. Mol. Med.* 8, 455-464.

Hirst, J. (2010). Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *The Biochemical journal* 425, 327-339.

Hood, J.D., and Cheresch, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature reviews. Cancer* 2, 91-100.

Huang, L., Chang, F., Lee, K., Wang, J., Tengd, C., and Kuo, S. (1998). Synthesis and Antiplatelet, Antiinflammatory, and Antiallergic Activities of Substituted 3-Chloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone and Related Compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6, 2261-2269.

Iilina, T., Semenova, E., Pronyaeva, T., Pokrovskii, A., Nechepurenko, I., Shults, E., and Andreeva, O. (2002). Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase by Aryl-Substituted Naphto- and Anthraquinones. *Biochemistry and Biophysics* 382, 56-59.

Jamshidi, M., Bartkova, J., Greco, D., Tommiska, J., Fagerholm, R., Aittomaki, K., Mattson, J., Villman, K., Vrtel, R., Lukas, J., et al. (2012). NQO1 expression correlates inversely with NFkappaB activation in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 132, 955-968.

Jaña, F., Faini, F., Lapier, M., Pavani, M., Kemmerling, U., Morello, A., Maya, J.D., Jara, J., Parra, E., and Ferreira, J. (2013). Tumor cell death induced by the inhibition of mitochondrial electron transport: the effect of 3-hydroxybakuchiol. *Toxicology and applied pharmacology* 272, 356-364.

Kayashima, T., Mori, M., Yoshida, H., Mizushina, Y., and Matsubara, K. (2009). 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. *Cancer letters* 278, 34-40.

Kluckova, K., Bezawork-Geleta, A., Rohlena, J., Dong, L., and Neuzil, J. (2013). Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochimica et biophysica acta* 1827, 552-564.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87, 99-163.

Lee, H.J., Lee, H.J., Song, G.Y., Li, G., Lee, J.H., Lu, J., and Kim, S.H. (2007). 6-(1-Oxobutyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone inhibits lewis lung cancer by antiangiogenesis and apoptosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 120, 2481-2490.

Lewis, A.M., Ough, M., Hinkhouse, M.M., Tsao, M.S., Oberley, L.W., and Cullen, J.J. (2005). Targeting NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) in pancreatic cancer. *Molecular carcinogenesis* 43, 215-224.

Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P.E., Skeen, J.E., Gottlob, K., Chandel, N.S., Thompson, C.B., Robey, R.B., and Hay, N. (2004). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular cell* 16, 819-830.

Mathupala, S.P., Ko, Y.H., and Pedersen, P.L. (2010). The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochimica et biophysica acta* 1797, 1225-1230.

Miguel del Corral, J.M., Castro, M.A., Gordaliza, M., and San Feliciano, A. (2002). Synthesis and Biological Evaluation of Cytotoxic 6(7)-Alkyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinones. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 9, 427-437.

Miguel del Corral, J.M., Gordaliza, M., Castro, M.A., and San Feliciano, A. (1998). Further antineoplastic terpenylquinones and terpenylhydroquinones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6, 31-41.

Molinari, A., Oliva, A., Reinoso, P., Miguel del Corral, J.M., and Castro, M.A. (2000). Cytotoxic–antineoplastic activity of hydroquinone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* *37*, 177-182.

Moreadith, R.W., and Fiskum, G. (1984). Isolation of mitochondria from ascites tumor cell permeabilized with digitonin. *Analytical Biochemistry* *137*, 360-367.

Moreno-Sanchez, R., Marin-Hernandez, A., Saavedra, E., Pardo, J.P., Ralph, S.J., and Rodriguez-Enriquez, S. (2014). Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. *The international journal of biochemistry & cell biology* *50*, 10-23.

Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal* *274*, 1393-1418.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* *417*, 1-13.

Neuzil, J., Dong, L.F., Ramanathapuram, L., Hahn, T., Chladova, M., Wang, X.F., Zabalova, R., Prochazka, L., Gold, M., Freeman, R., et al. (2007). Vitamin E analogues as a novel group of mitocans: anti-cancer agents that act by targeting mitochondria. *Molecular aspects of medicine* *28*, 607-645.

Nicholls, D.G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell calcium* *38*, 311-317.

Ning, Q., Liu, C., Hou, L., Meng, M., Zhang, X., Luo, M., Shao, S., Zuo, X., and Zhao, X. (2013). Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation promotes migration and invasion of breast cancer cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one* *8*, e65217.

O'Brien, P.J. (1991). Molecular Mechanism of Quinones Citotoxicity *Chem. Biol. Interactions* *80*, 1-41.

Ortega, A.D., Sanchez-Arago, M., Giner-Sanchez, D., Sanchez-Cenizo, L., Willers, I., and Cuezva, J.M. (2009). Glucose avidity of carcinomas. *Cancer letters* *276*, 125-135.

Pathania, D., Millard, M., and Neamati, N. (2009). Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. *Advanced drug delivery reviews* *61*, 1250-1275.

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

Petit, P., Gendron, M., Schrantz, N., Metivier, D., Kroemer, G., Maciorowska, Z., Sureau, F., and Koester, S. (2001). Oxidation of pyridine nucleotides during Fas- and ceramide-induced apoptosis in Jurkat cells: correlation with changes in mitochondria, glutathione depletion, intracellular acidification and caspase 3 activation. *Biochem. J.* *353*, 357-367.

Pramanik, K.C., Boreddy, S.R., and Srivastava, S.K. (2011). Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PloS one* *6*, e20151.

Preusch, P., Siegel, D., Gibson, N., and Rosst, D. (1991). A note on the inhibition of DT.diaphorase by Dicoumarol *Free radical biology & medicine* *11*, 77-80.

Putignani, L., Raffa, S., Pescosolido, R., Aimati, L., Signore, F., Torrì, M.R., and Grammatico, P. (2008). Alteration of expression levels of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) in breast cancer cell mitochondria. *Breast cancer research and treatment* *110*, 439-452.

Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., and Brand, M.D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *The Journal of biological chemistry* *287*, 27255-27264.

Robey, I., Stephen, R., Brown, K., and Baggett, B. (2008). Regulation of the Warburg Effect in Early-Passage Breast Cancer Cells. *Neoplasia* *10*, 745-756.

Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, J., and Capaldi, R. (2004). Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Research* *64*, 985-993.

Scheffler, I.E. (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* *1*, 3-31.

Schumacker, P.T. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell* *10*, 175-176.

Semenza, G.L. (2009). Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in cancer biology* *19*, 12-16.

Seshadri, P., Rajaram, A., and Rajaram, R. (2011). Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. *Free radical biology & medicine* *51*, 2090-2107.

Sheng-Tung, H., Hsien-Shou, K., Chiao-Long, H., and Yuh-Ling, L. (2002). Efficient Synthesis of 'Redox-Switched' Naphthoquinone Thiol-Crown Ethers and Their Biological Activity Evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 1947-1952.

Siebels, I., and Drose, S. (2013). Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. *Biochimica et biophysica acta* 1827, 1156-1164.

Simamura, E., Hirai, K., Shimada, H., Koyama, J., Niwa, Y., and Shimizu, S. (2006). Furanonaphthoquinones Cause Apoptosis of Cancer Cells by Inducing the Production of Reactive Oxygen Species by the Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel. *Cancer Biology & Therapy* 5, 1523-1529.

Sutton, K.M., Doucette, C.D., and Hoskin, D.W. (2012). NADPH quinone oxidoreductase 1 mediates breast cancer cell resistance to thymoquinone-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 426, 421-426.

Tandon, V.K., Chhor, R.B., Singh, R.V., Rai, S., and Yadav, D.B. (2004). Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 14, 1079-1083.

Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., Chiao, P.J., Achanta, G., Arlinghaus, R.B., Liu, J., et al. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer cell* 10, 241-252.

Urra, F.A., Martinez-Cifuentes, M., Pavani, M., Lapier, M., Jana-Prado, F., Parra, E., Maya, J.D., Pessoa-Mahana, H., Ferreira, J., and Araya-Maturana, R. (2013). 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. *Toxicology and applied pharmacology* 267, 218-227.

Wang, C., and Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual review of genetics* 43, 95-118.

Watanabe, N., and Forman, H. (2003). Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 411, 145-157.

Weng, C.J., and Yen, G.C. (2012). Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer metastasis reviews* 31, 323-351.

WHO (2014). GLOBOCAN 2012 (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).

Wu, M., Neilson, A., Swift, A.L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., et al. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 292, C125-136.

Xiao, D., Powolny, A.A., and Singh, S.V. (2008). Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 30151-30163.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 47-59.

Zhang, W., and Go, M.L. (2009). Functionalized 3-benzylidene-indolin-2-ones: inducers of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem* 17, 2077-2090.

Zhang, Y., Olson, N., Mao, F., Roth, B., and Haugland, R.P. (1992). New fluorescent probes for long-term tracing of living cells. *FASEB J* 6, 1835.

Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D.W., Abel, P.W., and Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 32, 4814-4824.