



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**“EFECTO CITOTÓXICO INDUCIDO POR CATIONES LIPOFÍLICOS  
DESLOCALIZADOS DERIVADOS DE ÁCIDOS POLIHIDROXIBENZOICOS EN  
COMBINACIÓN CON DOXICICLINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN.”**

**DENNY ALEX VIDAL CANALES**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**José Antonio Jara Sandoval**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Jorge Federico Ferreira Parker**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt Regular N° 1180296**

**Santiago - Chile**

**2021**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**“EFECTO CITOTÓXICO INDUCIDO POR CATIONES LIPOFÍLICOS  
DESLOCALIZADOS DERIVADOS DE ÁCIDOS POLIHIDROXIBENZOICOS EN  
COMBINACIÓN CON DOXICICLINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN.”**

**DENNY ALEX VIDAL CANALES**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**José Antonio Jara Sandoval**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Jorge Ferreira Parker**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt Regular N° 1180296**

**Santiago - Chile**

**2021**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Jorge Ferreira Parker y al proyecto FONDECYT regular N°1180296

Al Dr. José Jara Sandoval y al Proyecto FONDECYT Iniciación N°11180533.

Al Dr. Alfredo Molina Berríos.

A la Tesista Daniela Martínez Camus.

A la Tesista Antonia Pardo Ojeda.

Al Tesista Sebastián Yévenes Huaiquinao.

Al laboratorio de Farmacología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Al laboratorio de Bioenergética y Cáncer de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

A mi mamá María Canales, mi hermana Antonella Vidal y mi papá Eduardo Vidal.

A mis compañeros y/o amigos Carolina Belmar, Florencia Valdés, Débora Zamorano, Diego Espinosa.

A mi gran amigo Juan Díaz Mondaca.

Y finalmente a todos los que me han apoyado en estos años.

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>Resumen</b> .....	<b>9</b>
<b>II.</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>11</b>
	1. Generalidades del cáncer y epidemiología .....	11
	2. Cáncer de pulmón .....	12
	3. Tratamiento .....	14
	4. Relación entre cáncer de pulmón y periodontitis.....	16
	5. Células iniciadoras de tumores y heterogeneidad tumoral .....	18
	6. Reprogramación metabólica en células tumorales .....	21
	7. Función mitocondrial en células tumorales .....	23
	8. Compuestos antineoplásicos dirigidos a la mitocondria .....	26
	9. Cationes lipofílicos deslocalizados derivados de ácidos polihidroxi- benzoico como antineoplásicos .....	27
	10. Efectos mitocondriales de doxiciclina como nuevo fármaco antineoplásico .....	29
	11. Síntesis .....	31
<b>III.</b>	<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>32</b>
	a) Hipótesis .....	32
	b) Objetivo general .....	32
	c) Objetivos específicos .....	32
<b>IV.</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>33</b>
	Materiales	
	a. Reactivos .....	33
	b. Compuestos en estudio .....	33
	c. Líneas celulares .....	33
	Métodos	
	a. Cultivo celular normóxicos .....	34
	b. Cultivo celular hipóxicos .....	34
	c. Tripsinización de células .....	35
	d. Almacenamiento y congelamiento .....	35
	e. Ensayo de viabilidad celular con MTT .....	35
	f. Estudio de combinación de compuestos .....	36

g. Expresión de marcadores de TICs .....	38
h. Medición de contenido de ATP intracelular .....	40
i. Medición de potencial de membrana mitocondrial mediante TMRE .....	42
<b>V. Resultados .....</b>	<b>43</b>
1) Expresión de marcadores de TICs .....	43
Normoxia	
A. Selección de población y viabilidad celular con PI .....	43
B. Detección de CD44 y CD133 en cultivos de normoxia a través de citometría de flujo .....	44
Hipoxia	
A. Selección de población y viabilidad celular con PI .....	46
B. Detección de CD44 y CD133 en cultivos de hipoxia a través de citometría de flujo .....	46
2) Ensayo de viabilidad celular .....	50
a. Gálico TPP+C10 .....	51
Línea celular NCI-H727	
Línea celular NCI-H1299	
Línea celular Fibroblastos pulmonares	
b. Gentísico TPP+C10 .....	56
Línea celular NCI-H727	
Línea celular NCI-H1299	
Línea celular Fibroblastos pulmonares	
c. Doxiciclina .....	61
Línea celular NCI-H727	
Línea celular NCI-H1299	
Línea celular Fibroblastos pulmonares	
d. 2,3 diOH TPP+C10 .....	66
Línea celular NCI-H727	
Línea celular NCI-H1299	
Línea celular Fibroblastos pulmonares	
e. 2 OH TPP+C10 .....	71
Línea celular NCI-H727	

	Línea celular NCI-H1299	
	Línea celular Fibroblastos pulmonares	
3)	Medición de contenido de ATP intracelular .....	76
	Línea celular NCI-H727	
	Línea celular NCI-H1299	
4)	Medición de potencial de transmembrana mitocondrial mediante TMRE .....	82
	Línea celular NCI-H727	
	Línea celular NCI-H1299	
5)	Estudios de combinación de compuestos .....	89
	a. Combinación entre Gálico-TPP <sup>+</sup> C10 y doxiciclina .....	89
	Línea celular NCI-H727	
	Línea celular NCI-H1299	
	b. Combinación entre Gentísico-TPP <sup>+</sup> C10 y doxiciclina .....	95
	Línea celular NCI-H727	
	Línea celular NCI-H1299	
<b>VI.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>101</b>
	a. Expresión de marcadores de TICs .....	101
	b. Ensayo de viabilidad celular .....	103
	Efecto de Cationes lipofílicos deslocalizados sobre la viabilidad celular	
	Efecto de doxiciclina sobre la viabilidad celular	
	c. Medición de contenido de ATP intracelular .....	109
	d. Medición de potencial de transmembrana mitocondrial .....	111
	e. Estudios de combinación de compuestos .....	112
	Combinación entre Gálico-TPP <sup>+</sup> C10 y doxiciclina	
	Combinación entre Gentísico TPP <sup>+</sup> C10 y doxiciclina	
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>119</b>
<b>VIII.</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>121</b>

## I. RESUMEN

El cáncer de pulmón tiene la mayor mortalidad entre todas las neoplasias, siendo la segunda causa de muerte en Chile, tiene origen multifactorial, pero se asocia fuertemente a estilos de vida y hábitos, siendo el tabaquismo el principal factor de riesgo. Posee un mal pronóstico en estados avanzados y gran capacidad de generar metástasis. La periodontitis, es una enfermedad inflamatoria crónica avanzada, y se ha propuesto como factor de riesgo de cáncer de pulmón a través de cambios en la respuesta inmune, y/o diseminación de bacterias patógenas.

La hipótesis de células iniciadoras de tumores, sugiere que éstas son responsables del inicio y crecimiento tumoral, además son resistentes a tratamientos convencionales.

Las mitocondrias de células tumorales pueden ser consideradas como blanco farmacológico, debido a que exhiben un mayor potencial de transmembrana, siendo susceptibles de ser blanco de moléculas cargadas positivamente. Los cationes lipofílicos deslocalizados de trifenílfosfonio ( $TPP^+$ ) son moléculas sintetizadas a partir de los Ácidos Gálico, Gentísico, protocatéquico y el ácido 2-hidroxibenzoico, unidas a  $TPP^+$  y que pueden ser dirigidos a las mitocondrias, para causar un estrés energético y conducir las células a apoptosis. Doxyciclina es un antibiótico del grupo tetraciclina, con actividad citotóxica mediante inhibición de la biogénesis mitocondrial en células tumorales.

Se evaluó la existencia de células iniciadoras de tumores, también los efectos citotóxicos de cada una de las moléculas, los efectos de los compuestos en las mitocondrias a través de medición de ATP mitocondrial y potencial de transmembrana mitocondrial. Además, se evaluó el efecto resultante de la combinación entre derivados de polihidroxibenzoatos y doxyciclina en líneas celulares de cáncer de pulmón. Los cultivos celulares se realizaron en condiciones de hipoxia y normoxia, luego se incubaron con la combinación de respectivas moléculas durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó usando un ensayo MTT.

Los resultados muestran que las moléculas de cationes lipofílicos deslocalizados tienen un efecto citotóxico en las líneas tumorales, que es dependiente del tiempo y de la concentración. El compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 presenta una disminución del ATP y una caída en el potencial de transmembrana. Por otro lado, doxiciclina también tiene un efecto citotóxico en las líneas celulares, pero sin alteración en el contenido de ATP intracelular ni potencial de transmembrana mitocondrial.

Las combinaciones de Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 y doxiciclina / Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 y doxiciclina son prometedoras, ya que se observa el efecto de sinergia en un porcentaje considerable de combinaciones realizadas, incluso con valores inferiores a los IC<sub>50</sub> de cada compuesto por separado.

Se observó 2 tipos de efectos: aditivo y de sinergia, esta última es la más interesante, ya que la combinación de fármacos nos da un efecto citotóxico aún mayor que las combinaciones de aditividad, por lo cual los datos tienen que ser confirmados en experimentos *in vivo* y podrían representar una alternativa de tratamiento en el cáncer de pulmón.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Generalidades del Cáncer y epidemiología

El cáncer, es un conjunto de enfermedades crónicas, en el cual algunas de las células empiezan a dividirse, proliferando de forma descontrolada. Estas células anormales pueden diseminarse a tejidos circundantes. Si la propagación no se controla, puede causar la muerte (American Cancer Society, 2019).

Hoy en día el cáncer es un problema de salud pública mundial, según datos de *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), en 2020 se estimó que todos los carcinomas tuvieron una incidencia de 19.292.789 de casos nuevos en el mundo, siendo una de las principales causas de muerte con un poco más de 9,5 millones de personas alrededor del mundo (Global Cancer Observatory & International Agency for Research on Cancer, 2021).

Su prevalencia aumenta como consecuencia del crecimiento y el envejecimiento de la población; así como, un aumento de la prevalencia de factores de riesgo asociados con el crecimiento económico y la urbanización, por ejemplo, el hábito de fumar, la inactividad física, el sobrepeso y el aumento en las enfermedades inflamatorias crónicas (Jimenez de la Jara et al., 2015; Mao, Yang, He, & Krasna, 2016; Rakoff-Nahoum, 2006).

Dentro de los carcinomas más frecuentes que afectan a la población mundial destacan el cáncer de mamas con 2,26 millones personas afectadas seguido muy de cerca por el cáncer de pulmón con 2,2 millones de casos (Global Cancer Observatory & International Agency for Research on Cancer, 2021).

En hombres, la mayor incidencia es de cáncer de pulmón con 1.43 millones de casos, seguido por cáncer de próstata. Mientras que en mujeres la mayor incidencia de cáncer es el cáncer de mamas con 2,26 millones de mujeres afectadas, seguido por cáncer colorrectal y en tercera posición se ubica el cáncer de pulmón con 770 mil casos. Sin embargo, el cáncer de pulmón constituye la primera causa de muerte en hombres, y la segunda en mujeres después del cáncer de mamas con un total de más de 1,79 millones de mortalidad, siendo el cáncer con mas mortalidad en el

mundo (Global Cancer Observatory & International Agency for Research on Cancer, 2021).

En Chile, el cáncer es responsable del 23% del total de muertes anuales, constituyendo la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades del aparato circulatorio. El cáncer de pulmón presenta estadísticas peculiares, ya que la neoplasia con mayor incidencia es el cáncer de próstata con 8.100 casos al año, seguido por el cáncer colorrectal con 6.200 casos, mientras que el cáncer de pulmón presentó 3.969 casos siendo la quinta neoplasia maligna más frecuente, sin embargo, en mortalidad se repite el patrón mundial siendo la primera causa de muerte entre las neoplasias malignas con 3550 muertes en el año 2020 (International Agency for Research on Cancer, 2020) (Global Cancer Observatory, 2021).

## **2. Cáncer de Pulmón**

El cáncer de pulmón tiene la mortalidad más grande de todas las neoplasias, se caracteriza por tener un origen multifactorial y que se asocia fuertemente a los estilos de vida y hábitos de las personas.

Se han identificado muchas causas de cáncer de pulmón, incluido el tabaquismo activo, exposición al humo del cigarrillo de segunda mano (tabaquismo pasivo), uso de pipa, exposición ocupacional a sustancias químicas como el asbesto, además de la exposición a la contaminación atmosférica, la cual puede contener una serie de agentes carcinogénicos, que son generados por la combustión de combustibles fósiles (Alberg, Brock, Ford, Samet, & Spivack, 2013). A pesar de la identificación de estos factores de riesgo causales, la epidemia mundial de cáncer de pulmón es causada principalmente por un solo factor: fumar cigarrillos (Alberg et al., 2013; McErlean, 2011; Schwartz & Cote, 2016). Otros factores de riesgo incluyen enfermedades respiratorias como la tuberculosis pulmonar, la bronquitis crónica o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Brenner et al., 2001). Además, existe evidencia que existen modificaciones genéticas que predisponen a algunas personas a ser susceptibles a padecer cáncer pulmonar (Hong et al., 2015; Hu et al., 2011).

El riesgo de cáncer de pulmón es de 6 a 10 veces mayor en los fumadores que en los no fumadores, y es de 30% a 60% más alto en los no fumadores expuestos al humo de fumadores, mientras que los hombres son más afectados que las mujeres (Hong et al., 2015). Y aunque la mayoría de los casos de cáncer de pulmón se pueden atribuir a la inhalación directa del humo del tabaco, aproximadamente una cuarta parte de los casos de cáncer de pulmón en todo el mundo ocurren en personas que nunca han fumado (Brody, 2014; Couraud, Zalcmán, Milleron, Morin, & Souquet, 2012; Deweerdt, 2014).

Existen al menos 2 formas en las cuales, fumar está asociado con el cáncer de pulmón. Primero, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (compuestos cancerígenos presentes en el humo del tabaco), inducen mutaciones en el gen p53, el cual provoca una desregulación del ciclo celular y la posterior carcinogénesis. Las transversiones de Guanina a Timina dentro del gen p53 se han relacionado con mutágenos de tabaco en los cánceres de pulmón asociados con fumar. En segundo lugar, los compuestos de tipo N-nitroso son otro grupo importante de sustancias químicas que se encuentran en el humo del tabaco, varios de los cuales son potentes carcinógenos en animales, encontrándose éstos incluso en la orina de los fumadores (McErlean, 2011; Vineis et al., 2004).

En el 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la *International Association for the Study of Lung Cancer* adoptaron la misma clasificación histológica del cáncer de pulmón, la cual establece dos grandes grupos (Amorín Kajatt, 2013; De la Cruz, Tanoue, & Matthay, 2011; Evans, 2013):

- El cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) es un tumor altamente maligno derivado de células que exhiben características neuroendocrinas y representa el 15% de los casos de cáncer de pulmón. Este tipo de célula de cáncer de pulmón se divide y crece muy rápidamente y, a menudo, se disemina hacia los ganglios linfáticos u otros órganos (Waqar & Morgensztern, 2017).

Además, presenta una capacidad de respuesta inicial favorable a los tratamientos, sin embargo, las células tumorales resistentes son capaces de

causar recidiva formando rápidamente un nuevo tumor (Bernhardt & Jalal, 2016).

- El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que representa el 85% restante de los casos, se divide en 3 subtipos patológicos principales (Walker, 2008):
  - i) Adenocarcinomas, son los casos de NSCLC más frecuentes representando un 40%, generalmente están presentes en la periferia pulmonar y pueden causar metástasis de forma rápida en el hígado, las glándulas suprarrenales, los huesos o el cerebro.
  - ii) El carcinoma de células escamosas representa un 20%, generalmente se localizan más centralmente, lo que a menudo resulta en obstrucción endobronquial y hemoptisis.
  - iii) Carcinoma de células grandes constituye el 2.9% de todos los carcinomas de pulmón.

### **3. Tratamiento**

El cáncer de pulmón se clasifica por estadios según su tamaño, en el estadio I el tumor mide no más de 3 centímetros (cm), mientras que en el estadio II, el tumor mide entre 3 y 5 cm, por otro lado, en el estadio III el tumor va entre los 5 a 7 cm y en el estadio IV el tumor es mayor a 7 cm con invasión a espacios como el mediastino y posible metástasis a nodos linfáticos (American Cancer Society, 2019).

La terapia más recomendada para el NSCLC en estadios tempranos (I, II y algunos estadios III) es la cirugía, que puede ser con lobectomía o neumonectomía, dependiendo de la ubicación del tumor. El estándar de atención para el NSCLC implica la adición de quimioterapia adyuvante, es decir, un tratamiento adicional para el cáncer que se administra después del tratamiento primario, el cual, demuestra una ventaja significativa de supervivencia (Lemjabbar-Alaoui, Hassan, Yang, & Buchanan, 2015; Walker, 2008). La supervivencia a 5 años es de 68% a 92% para el estadio clínico I, y 53% a 60% para el estadio II (Hirsch et al., 2017).

En general, se debe tratar con quimioterapia adyuvante a pacientes con resección completa con NSCLC en estadio II y estadio III. Aunque también se pueden considerar candidatos de quimioterapia adyuvante a pacientes en estadio I de alto riesgo. Los regímenes basados en cisplatino pueden ser más eficaces que el carboplatino y deben considerarse estos fármacos como terapia de elección en el contexto curativo adyuvante, para pacientes completamente resecados (Lemjabbar-Alaoui et al., 2015).

El NSCLC en estadio III es una enfermedad heterogénea y varía desde tumores resecables con metástasis microscópicas, hasta ganglios linfáticos y enfermedad voluminosa no resecable que involucra múltiples ubicaciones ganglionares. El estándar de atención actual incluye un curso de radioterapia torácica de 6 semanas (60 a 66 Gy) con la administración simultánea de quimioterapia, usando cisplatino o carboplatino y un segundo medicamento por semana o cada 3 semanas, con o sin cirugía, siendo el tiempo de supervivencia promedio de más de 2 años y una supervivencia a 5 años de 15% a 20% (Evans, 2013; Hirsch et al., 2017; Walker, 2008).

Las opciones de tratamiento en estadio IV pueden incluir radioterapia externa paliativa, quimioterapia combinada, terapia dirigida, y cualquier terapia con láser o radioterapia endoscópica, según sea necesario.

Las terapias dirigidas, se definen como un tratamiento en el que se usan medicamentos u otras sustancias para identificar y combatir tipos específicos de células cancerosas, esta terapia ha mostrado un éxito temprano notable en muchas neoplasias malignas y tienen un papel importante en el tratamiento del cáncer de pulmón avanzado. Varios anticuerpos monoclonales dirigidos al receptor Programmed Death-1 (PD-1) como nivolumab, pembrolizumab o su ligando Programmed Death-ligand 1 (PD-L1) como atezolizumab, durvalumab, avelumab han llegado a la clínica, y otros están en desarrollo preclínico (Hirsch et al., 2017). Sin embargo, esta estrategia de terapia dirigida no es aplicable para todos los blancos farmacológicos identificados y presenta alto costo, por lo cual no todos los pacientes son candidatos para recibir este tratamiento (National Cancer Institute, 2020).

Por otra parte, en el SCLC, la cirugía puede tener un papel en un pequeño grupo de pacientes con tumores periféricos en estadios muy tempranos (Bernhardt & Jalal, 2016). Pese a tener un mal pronóstico, el SCLC es muy sensible a la quimioterapia, por lo que la terapia puede causar una reducción tumoral en la mayoría de los pacientes. El tratamiento estándar para pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas en estadio alto es la quimioterapia combinada entre cisplatino y etopósido (Kalemkerian, 2016; Waqar & Morgensztern, 2017). Sin embargo, los resultados de los pacientes con SCLC avanzado son malos, con una mediana de duración de supervivencia global menor a los 10 meses y una supervivencia a 5 años menor al 5%. Además, el tratamiento de primera línea para tales pacientes, se ha mantenido sin cambios durante más de tres décadas, generalmente consiste en 4 a 6 ciclos de quimioterapia con un agente a base de platino (cisplatino o carboplatino) y etopósido (Sabari, Lok, Laird, Poirier, & Rudin, 2017).

#### **4. Relación entre cáncer de Pulmón y periodontitis**

Las enfermedades orales con mayor prevalencia son las caries y la periodontitis, esta última, es una enfermedad inflamatoria avanzada de las encías causada por disbiosis bacteriana oral que afecta la respuesta inmune local y se caracteriza por la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes. Es altamente prevalente y tiene múltiples impactos negativos en la calidad de vida. Últimamente se ha establecido que esta enfermedad puede influir en el riesgo de cáncer a través de cambios en la respuesta inmune o, alternativamente, a través de la diseminación de bacterias patógenas (Hajishengallis, 2015). La periodontitis tiene gran impacto causando inflamación sistémica; los anticuerpos contra los patógenos bacterianos (contra la periodontitis) se han medido en la sangre; sin embargo, el mecanismo exacto que vincula la periodontitis al cáncer no está establecido y no se sabe en qué etapa de la enfermedad periodontal puede influir el riesgo de cáncer. Pese a esto, se ha podido determinar que la enfermedad periodontal se asoció con un aumento pequeño, pero significativo, en el riesgo general de cáncer (Michaud, Fu, Shi, & Chung, 2017; Michaud, Liu, Meyer, Giovannucci, & Joshipura, 2008). Además, que existe una relación significativa entre la enfermedad periodontal con

cáncer oral pudiendo aumentar el riesgo del cáncer en casi dos veces (Yao, Zhou, Peng, Ji, & Liu, 2014; L. Ye, Jiang, Liu, & Tao, 2016).

Las personas con enfermedad periodontal son más susceptibles a las enfermedades respiratorias, como enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), la cual constituye como un factor de riesgo para generar cáncer de pulmón. Además, se ha sugerido que bacterias orales específicas están involucradas en la carcinogénesis (Michaud et al., 2017; Zeng et al., 2016). La profundidad al sondaje del saco periodontal, así como el índice de gravedad de la enfermedad periodontal, es decir a mayor severidad, se asocia con un riesgo de desarrollar cáncer de pulmón mayor al doble, incluso después de ajustar el estado del tabaquismo y las cajetillas/año de fumadores (Chrysanthakopoulos, 2016; Michaud et al., 2018).

Se ha descrito que la periodontitis aumenta los niveles de marcadores inflamatorios sistémicos como Proteína C Reactiva (PCR), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleuquinas (IL) producto del microambiente proinflamatorio que se genera mediante el reclutamiento de células inmunes infiltrantes (Morales, Bravo, Baeza, Werlinger, & Gamonal, 2016). Algunos de los mediadores inflamatorios, (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10), participan tanto en el inicio como en la progresión del cáncer (Landskron, De la Fuente, Thuwajit, Thuwajit, & Hermoso, 2014). La inflamación favorece muchos aspectos de las neoplasias malignas, incluida la proliferación y supervivencia de las células malignas, la angiogénesis, la metástasis tumoral y la respuesta tumoral a los fármacos (Gomes, Teixeira, Coelho, Araújo, & Medeiros, 2014).

Otro posible mecanismo descrito en la literatura, es la aspiración de patógenos orales, como *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en los pulmones, lo que conduce a bronquitis y otras infecciones respiratorias. También las citoquinas que se originan en los tejidos periodontales pueden alterar el epitelio respiratorio y promover infecciones patógenas. La enfermedad periodontal en sí es una enfermedad inflamatoria crónica y la estrecha proximidad anatómica entre la cavidad oral y los pulmones puede ser otro mecanismo potencial detrás de la asociación de la enfermedad periodontal y el cáncer de pulmón (Zeng et al., 2016). Sin embargo, la evidencia actual solo proporciona la idea de una asociación de

enfermedad periodontal y cáncer de pulmón. Los mecanismos carcinogénicos precisos siguen siendo desconocidos.

Por otra parte, es sabido que el cigarro y su humo es un factor de riesgo común entre periodontitis, cáncer de pulmón y cáncer oral. En un mundo en donde al año 2015 un 20,2% de la población mundial consume cigarrillos, las relaciones entre estas enfermedades se establecen fuertemente (WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000–2025, 2018).

Finalmente, los tumores metastásicos de pulmón en cavidad oral son lesiones poco frecuentes que bordean el 1% de todas las neoplasias malignas orales, de ellas, la gran mayoría de las lesiones se localizan en mandíbula (80-90%) (Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial. et al., 2001). Basta con realizar una pequeña búsqueda bibliográfica para ver que se reportan múltiples casos en los cuales se produce metástasis en la región oral a partir de cáncer primario de pulmón, pero con un nivel de evidencia bajo (Donoff, Albert, Olson, & Guralnick, 1976; Irani, 2017; Ito, Onizawa, & Satoh, 2017; Kamat, Shetye, Akkara, & Dhupar, 2014; Misir, Mercan, & Günhan, 2013; Moss, 1961; Raja Lakshmi, Sudhakara Rao, Bhavana, & Sathish, 2014; Rajinikanth, Prakash, Swathi, & Reddy, 2015; Tanaka et al., 2002; Vieira, Aarestrup, Carvalho Da Fonseca, & Dias, 2001; Nuyen & Tang, 2016).

## **5. Células Inicadoras de Tumores y heterogeneidad tumoral**

A pesar de los varios avances en los últimos años en el tratamiento del cáncer de pulmón, las tasas de supervivencia a 5 años siguen siendo extremadamente pobres, debido al desarrollo de resistencia y eventual recidiva. La resistencia a las terapias citotóxicas presenta un desafío clínico significativo en el tratamiento de esta enfermedad. La hipótesis de las Células Inicadoras de Tumores (TICs) o "*Cancer Stem Cells*" (CSC) sugiere que los tumores están dispuestos en una estructura jerárquica, con la presencia de un pequeño subconjunto de células madre que son responsables del inicio y crecimiento tumoral. Esta población de TICs tiene una serie de propiedades clave, como la capacidad de dividirse, diferenciarse en múltiples linajes y autorrenovarse, además de tener una mayor resistencia intrínseca a las

terapias (Gazdar, Bunn, & Minna, 2017; Lopez-Ayllon et al., 2014; MacDonagh et al., 2016).

La heterogeneidad celular es una característica de muchos tumores sólidos y la hipótesis de TICs sugiere que esta heterogeneidad dentro de un tumor se debe a una dinámica celular jerárquica y la presencia de una pequeña subpoblación de células que muestran las propiedades de las células madre somáticas normales. Estas TICs son multipotentes y tienen dos características clave de las células madre: las habilidades para autorrenovarse y diferenciarse, propiedades necesarias para la iniciación y progresión del tumor (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001).

Las TICs pueden dividirse asimétricamente, lo que les permite autoperpetuarse simultáneamente y dar lugar a un tumor heterogéneo, con una subpoblación de TICs mantenida de manera constante (Tower, 2012).

En la actualidad, se cree que la resistencia terapéutica de las TIC se debe a varias características propias de esta subpoblación, tales como (Sleeman & Steeg, 2010; Yan et al., 2016):

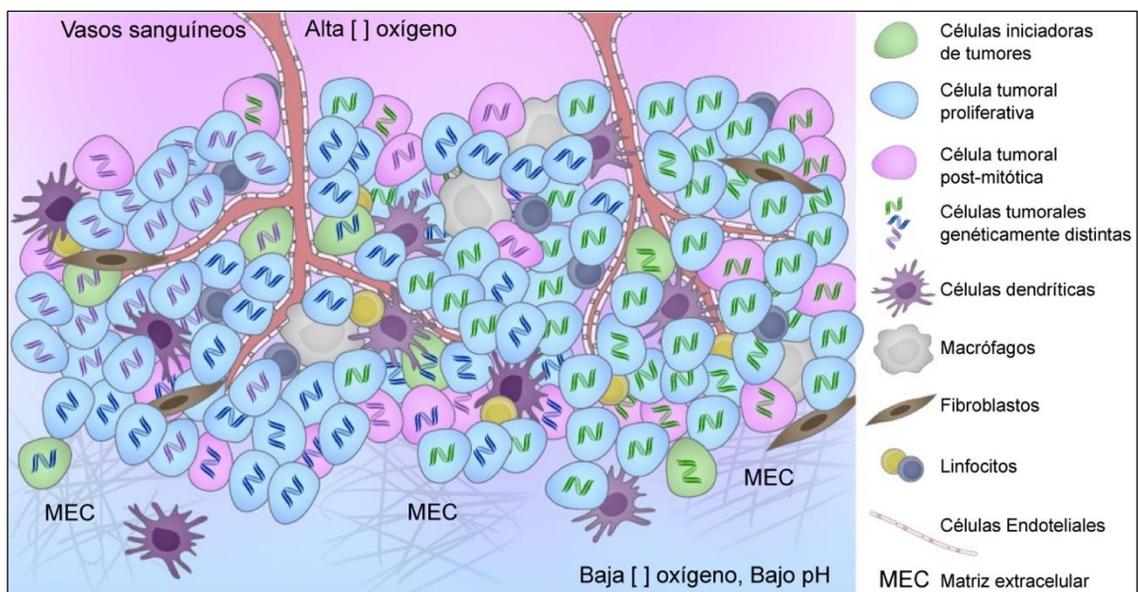
- Expresión de altos niveles de proteínas transportadoras (eflujo del fármaco), como ABCG2 (BCRP) y la glicoproteína P (ABCB1), que pueden provocar el eflujo de fármacos antineoplásicos.
- Resistencia a la apoptosis, ya que expresan niveles aumentados de proteínas antiapoptóticas/pro-supervivencia como Bcl-2, Bcl-xL, proteína inhibidora de apoptosis (IAP) o FLIP.
- Mayor capacidad de reparación del ADN debido al aumento de la activación del punto de control del daño del ADN, lo que contribuye a su resistencia a tratamientos como algunos antineoplásicos clásicos y la radioterapia.
- La capacidad de permanecer relativamente inactivas, en estado de latencia, lo que las hace resistentes a los agentes de quimioterapia específicos del ciclo celular.
- La baja expresión de ciertos antígenos específicos de tumor que se expresan por células diferenciadas; por lo tanto, las terapias inmunológicas que se

dirigen a las células cancerosas a través de estos antígenos no afectarán las TICs.

- La capacidad de inducir angiogénesis y, por consiguiente, ayudar a promover el crecimiento tumoral, además de migrar y causar metástasis.

Es por esto que la eliminación de las TICs pulmonares es de suma importancia en el momento de la intervención terapéutica para prevenir su expansión y la posterior recurrencia tumoral, recidiva y metástasis (National Cancer Institute, 2017).

El tumor se encuentra inmerso en un microambiente local, el cual es capaz de potenciar la heterogeneidad intratumoral al influir en los fenotipos de diversas células cancerosas y no cancerosas. Esta extensa variación intercelular, se encuentra compuesta por células tumorales, células no tumorales, células endoteliales, macrófagos, fibroblastos, linfocitos y matriz extra celular, lo que explica la gran variedad de mecanismos de resistencia a los medicamentos que se pueden presentar. Entre ellos encontramos vasos sanguíneos anormales que resulta en un suministro deficiente de la terapia sistémica, efectores inmunológicos y en la concentración de oxígeno; matriz extracelular densa que resulta en la dificultad del suministro de una terapia sistémica; o una señalización de supervivencia inducida por citoquinas inflamatorias o moléculas (*Figura 1*) (Rybinski, B. y Yun, K. 2016).



**Figura 1.** Esquema de heterogeneidad tumoral. Se encuentran representadas células tumorales con diferencias genéticas, células normales, y células del sistema inmune dentro del microclima que

*incluye perfusión de vasos sanguíneos, matriz extracelular y otros factores. (Imagen adaptada de Rybinski & Yun, 2016)*

## **6. Reprogramación metabólica en células tumorales**

Las células tumorales (CT) tienen distintos requerimientos metabólicos comparado con células normales. Pues una subpoblación de CT producen un porcentaje muy elevado del Adenosín Trifosfato (ATP) a través de la glicolisis en desmedro de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), pese a la existencia de niveles normales de oxígeno, esto se conoce como “Efecto Warburg”, caracterizado por un aumento en la captación y consumo de glucosa, una disminución en la fosforilación oxidativa, y un aumento en la producción de lactato (Remedios, Cutiño, Pérez, 2016; Hsu & Sabatini, 2008).

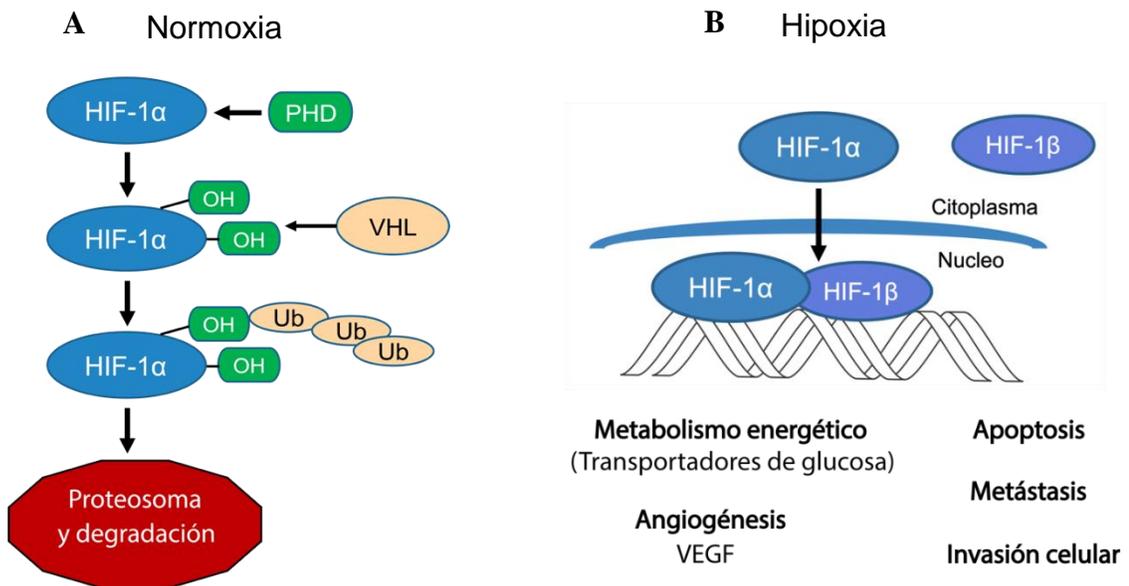
La producción de ATP por la vía glucolítica pareciera representar una desventaja para una célula en crecimiento, ya que por esta vía solo se forman 2 moles de ATP por mol de glucosa, en comparación con los 36 moles de ATP generados a través del ciclo del ácido cítrico, sin embargo, la vía glucolítica es capaz de producir energía a un ritmo mucho más rápido que la fosforilación oxidativa (Gillies, Robey, & Gatenby, 2008; Vazquez, Liu, Zhou, & Oltvai, 2010). Además, este cambio metabólico proporciona a las CT elementos necesarios como precursores de una variedad de rutas biosintéticas destinados a la producción de lípidos, aminoácidos y nucleótidos requeridos para la exacerbada proliferación celular (Heiden, Cantley, & Thompson, 2009; Korshunov, Kondakova, & Shashova, 2019).

Producto del “efecto Warburg”, las CT tienen que eliminar constantemente el lactato hacia el exterior de la célula a través de los transportadores generando un microambiente ácido, el cual es tóxico para las células normales y favorece la invasión de células tumorales (Gatenby & Gawlinski, 2003; Halestrap & Meredith, 2004; Mathupala, Colen, Parajuli, & Sloan, 2007).

A medida que el tumor inicial se expande más allá de los límites de difusión de suministro de la red capilar, las células tumorales entran en estado de baja concentración de oxígeno llamado hipoxia (concentración de oxígeno de 5 – 1%) o anoxia (concentración de oxígeno menor a 1%). Esto genera la estabilización del

factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) que inicia y conlleva a una reprogramación transcripcional completa del metabolismo que ofrece múltiples soluciones al estrés hipóxico. Por una parte, se exagera la glicolisis por medio de un aumento en la expresión de enzimas glucolíticas y por otra, se aumentan los transportadores de glucosa y los inhibidores del metabolismo mitocondrial, pues esta es la estrategia óptima para la generación de ATP cuando una célula está limitada en el uso la cadena de transporte de electrones (Hsu & Sabatini, 2008; Koppenol, Bounds, & Dang, 2011; Semenza, 2010).

Además, HIF-1 estimula la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos) regulando varios factores, incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Sin embargo, los vasos sanguíneos formados para el microambiente tumoral pueden estar desorganizados, y no entregar sangre de manera efectiva, por lo tanto, no alivian completamente la hipoxia (*Figura 2*) (Hsu & Sabatini, 2008).

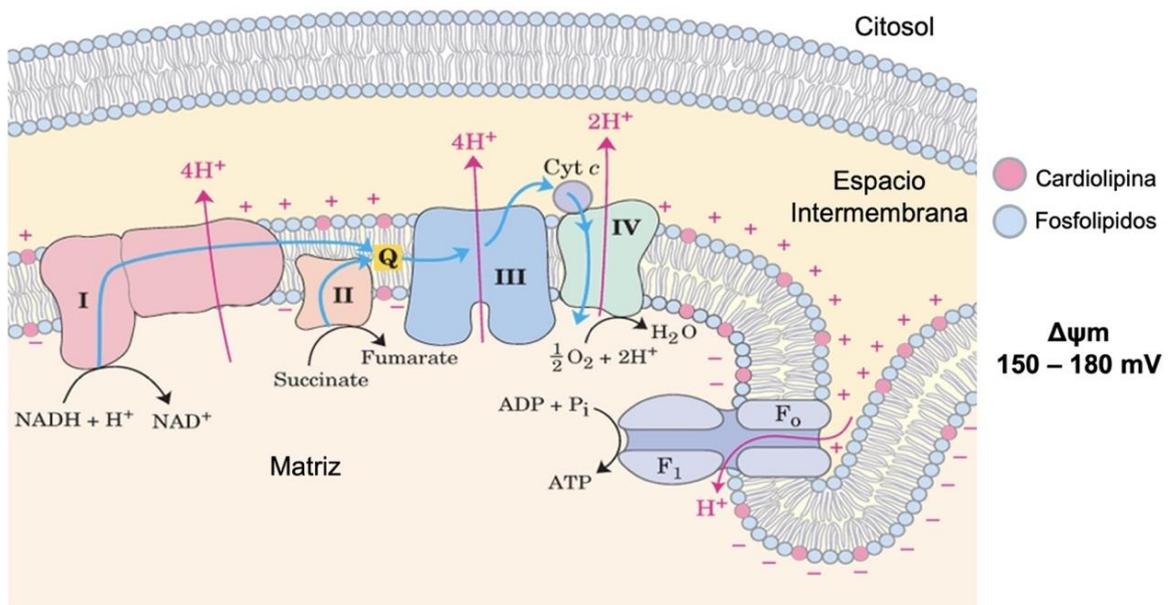


**Figura 2. A)** En condiciones de oxígeno (normoxia), la proteína HIF-1α se hidroxila y se une a una proteína denominada VHL, esta proteína es necesaria para unir la ubiquitina y así, el complejo ubiquitina-HIF1α es reconocido por el proteosoma y degradado. **B)** En condiciones de hipoxia, la acumulación de HIF-1a en el citoplasma provoca su translocación hacia el núcleo en donde se une a HIF-1b, estimulando a la célula a cambiar el metabolismo energético, estimular angiogénesis, migración celular y metástasis, para su supervivencia.

## 7. Función mitocondrial en células tumorales

Las mitocondrias son organelos que están inherentemente presentes en la mayoría de las células eucariotas. Llevan a cabo múltiples funciones vitales en una célula, incluida la conversión de energía, la síntesis de metabolitos, la regulación del estado redox celular, la producción de especies reactivas de oxígeno, el inicio de la apoptosis y el almacenamiento de  $\text{Ca}^{+2}$  celular (Boukalova, Rohlenova, Rohlena, & Neuzil, 2018).

Las CT presentan una disminución en el número de sus mitocondrias, como también varias modificaciones en la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial de las CT, dado por el aumento de fosfolípidos como cardiolipina (que aumentan la densidad de cargas negativas en la membrana) y colesterol (que puede disminuir la difusión pasiva de  $\text{H}^+$  y otros iones), lo que provoca consecuentemente una menor permeabilidad de  $\text{H}^+$  y se traduce en una diferencia de potencial de transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) mayor, alcanzando valores de 150 – 180 mV, encontrándose cargada negativamente en la cara interna de la membrana mitocondrial interna. La magnitud de esta carga es mayor que cualquier otro organelo, incluso el doble que las membranas de células excitables (Figura 3) (Chen, 1988; Moreno-Sánchez, Rodríguez-Enríquez, Marín-Hernández, & Saavedra, 2007; Yan et al., 2016).



**Figura 3.** Representación de la cadena transportadora de electrones, en donde la parte interna de la membrana mitocondrial interna se encuentra cargada negativamente y el espacio intermembrana se encuentra con carga positiva. Esta diferencia de potenciales eléctricos varía entre 150 a 180 mV. Imagen adaptada de *Principios de bioquímica, Lehninger, 6ta edición, 2014, página 705.*

Además de las funciones metabólicas que posee la mitocondria, también juega un papel muy relevante en la muerte celular, ya que es capaz de mediar la vía intrínseca de la apoptosis, generando la permeabilización de su membrana mitocondrial liberando factores apoptogénicos como el citocromo C, el factor inductor de la apoptosis (AIF), ATP y Smac/Diablo (Fulda, 2010). Esto conlleva a la activación de la caspasa-9 lo que produce la consecuente activación de la caspasa-3 que es quien gatilla el proceso apoptótico y la muerte celular (García García, 2005; Pazo Cid, R.A., 2012).

Algunos estudios han demostrado que, inhibidores de la cadena transportadora de electrones o inductores del desacoplamiento del sistema de generación del potencial de transmembrana mitocondrial conducen a una pérdida de este potencial, presentando un incremento de la permeabilidad de la membrana interna, la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la pérdida de la capacidad de almacenaje de calcio, impidiendo la homeostasis, induciendo estrés energético y desencadenando en la activación de factores pro-apoptóticos (Cao et al., 2011).

En varios aspectos mitocondriales, las TICs presentan similitudes y diferencias en comparación con las células tumorales diferenciadas, estas últimas son netamente glucolíticas en desmedro de la OXPHOS, mientras que las TICs muestran una flexibilidad metabólica especial. Es decir, en presencia de oxígeno, las TICs pueden cambiar entre glucólisis y OXPHOS para mantener la homeostasis y promover el crecimiento tumoral (Atashzar et al., 2020). También muestran diferentes regulaciones de estado redox, que incluyen niveles aumentados de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), complejos mitocondriales y potencial de membrana mitocondrial. La expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en las TICs también difiere de las de las células cancerosas comunes, dotando a estas células de mayor resistencia al inicio de la apoptosis. Morfológicamente, las

mitocondrias en las TICs se sitúan más cerca de los núcleos, mostrando un patrón perinuclear, mientras que las células cancerosas diferenciadas muestran una distribución mitocondrial más homogénea. Los números de copias de ADN mitocondrial también muestran diferencias entre las TIC y las células cancerosas en general (Yan et al., 2016).

En consecuencia, se ha sugerido una serie de características mitocondriales como objetivos plausibles para la eliminación de células tumorales, como la inhibición de la cadena transportadora de electrones, la neutralización de proteínas antiapoptóticas, la inducción de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la modulación de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. Por lo tanto, las mitocondrias representan un blanco prometedor para la terapia contra el cáncer (Yan et al., 2016).

Las mitocondrias de las TICs pueden poseer ciertas características que son similares a células madre normales. Al respecto en un estudio, aislaron las TICs de la línea celular de cáncer de pulmón A549 y descubrieron que diferían en sus características mitocondriales de sus contrapartes de células tumorales más diferenciadas (Células Tumorales no Iniciadoras), las cuales son, distribución mitocondrial perinuclear, un menor número de ADNmt y un mayor potencial de membrana mitocondrial, menor consumo de oxígeno y glucosa, y menores concentraciones de ROS y ATP intracelulares (X. Q. Ye, Li, et al., 2011). Otro estudio sugiere que se puede usar una  $\Delta\Psi_m$  más alta de TIC para discriminar esta población celular de la mayoría de las células de cáncer de pulmón más diferenciadas que presentan  $\Delta\Psi_m$  menor (X. Q. Ye, Wang, et al., 2011).

En el año 2015 se estudiaron las TICs pancreáticas utilizando un modelo inducible de ratón con cánceres pancreáticos y se reveló que su potencial de membrana mitocondrial era mayor en comparación con la mayor parte del tumor. Además, la caracterización metabólica profunda de estas células tumorigénicas reveló su dependencia de la respiración mitocondrial versus (vs.) la glucólisis ya que dichas células fueron sensibles a los inhibidores de Fosforilación Oxidativa y sucumbieron al estrés metabólico y la apoptosis (Viale, Corti, & Draetta, 2015).

Una forma de alterar la función mitocondrial es intervenir con el gradiente electroquímico y también afectar la biogénesis de la mitocondria, estrategias que se discutirán a continuación en los siguientes puntos.

### **8. Compuestos antineoplásicos dirigidos a la mitocondria**

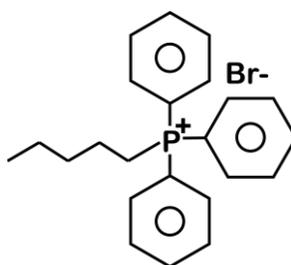
Considerando las características de las mitocondrias de células tumorales, se reconoce como un blanco farmacológico interesante para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos selectivamente hacia este organelo (Gogvadze, Orrenius, & Zhivotovsky, 2008). En esta dirección, las intervenciones farmacológicas realizadas hasta ahora, han utilizado un grupo heterogéneo de compuestos conocidos como “mitocans” (Palabra derivada de mitocondria y cáncer) siendo su característica más relevante la de ejercer propiedades antitumorales basadas en su capacidad para inducir apoptosis en células malignas, produciendo una disfunción mitocondrial generalmente de forma selectiva, generando una mínima toxicidad hacia las células y tejidos normales (Ralph & Neuzil, 2009).

La mitocondria mantiene un gradiente electroquímico dado por la diferencia de concentración de protones ( $H^+$ ) entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial, el cual es clave para la síntesis de ATP, dichos protones están separados por la membrana mitocondrial interna la cual es impermeable a ellos. Esta característica otorga una carga negativa al lado interno de la membrana interna mitocondrial, lo que permite que cationes que presenten la capacidad de atravesar membranas se puedan acumular. Este potencial de transmembrana, se ha determinado que es entre 2 a 6 veces superior a cualquier otro organelo. Por ello, es que ha sido utilizado para dirigir selectivamente compuestos catiónicos a la mitocondria, pues la *Ley de Nernst* predice que por cada 60 mV de diferencia de voltaje en el potencial de membrana, la acumulación de compuestos aumenta en cerca de 10 veces (Neuzil, Dong, Rohlena, Truksa, & Ralph, 2013; Ross et al., 2005).

Con esta estrategia se han desarrollado cationes lipofílicos y péptidos dirigidos a las mitocondrias que se han usado como moléculas bioactivas, que se dirigen hacia las mitocondrias. Esto conlleva a una concentración más alta del compuesto dentro de

las mitocondrias, lo que incrementa su potencia y permite que se use menor concentración del compuesto. También permite minimizar el metabolismo extra mitocondrial que podría llevar a la inactivación del fármaco, a su excreción o a desarrollar efectos secundarios. Esta estrategia de entrega del fármaco también capacita a moléculas que usualmente son pobremente captadas por las mitocondrias para que se dirijan a las mitocondrias; dicha estrategia se puede lograr cambiando la hidrofobicidad de la molécula (Luna-Ortiz P, 2014).

Se ha comprobado que las sales de trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>) mantienen este mismo patrón, ya que son captadas rápidamente por las mitocondrias impulsado por el gran potencial de membrana y la carga negativa que presenta la matriz mitocondrial, la que atrae fuertemente a los cationes. Las moléculas cargadas, generalmente son incapaces de atravesar membranas sin la existencia de un transportador proteico, debido a la gran energía de activación que requiere remover las moléculas de agua asociadas a estas moléculas. Sin embargo, la distribución de la carga a través de una larga porción lipofílica presente en el catión deslocalizado de trifenilfosfonio se traduce en energías significativamente menores facilitando su paso a través de membranas lipídicas. Por esta razón, el ion TPP<sup>+</sup> ha sido utilizado como una porción molecular capaz de dirigir a un farmacóforo selectivamente hacia la mitocondria (Murphy, 2008).



**Figura 4.** Esquema de trifenilfosfonio, su estructura lipídica le permite atravesar membranas fácilmente y debido a su carga positiva, es capaz de dirigirse selectivamente a la mitocondria.

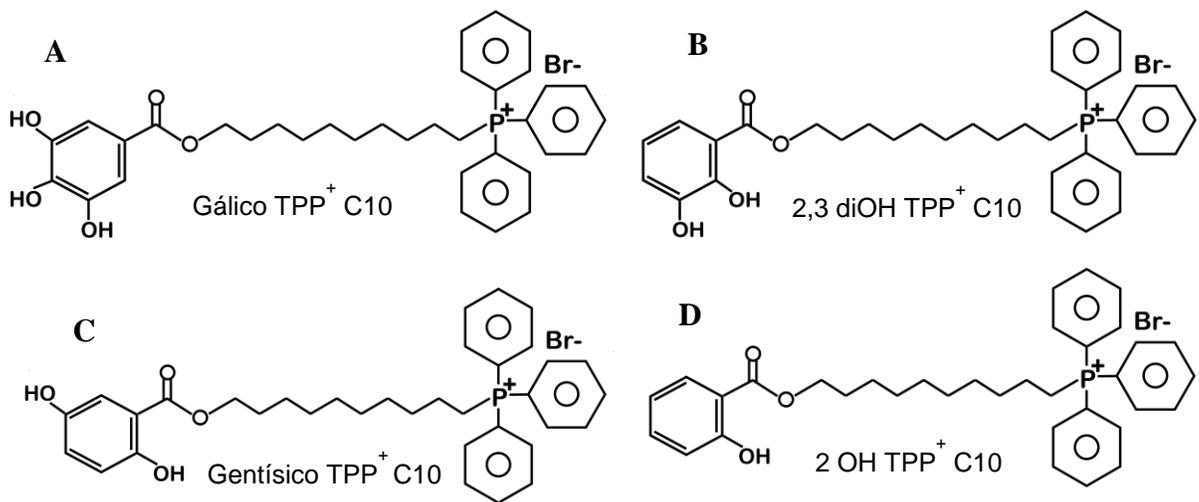
## 9. Cationes lipofílicos deslocalizados derivados de ácidos polihidroxi-benzoico como antineoplásicos

En la búsqueda de nuevas moléculas para tratamiento del cáncer, nuevas investigaciones se centran en compuestos bioactivos extraídos de plantas o derivados semisintéticos a partir de compuestos naturales. Los flavonoides han

recibido gran atención debido a su presencia común en una variedad de plantas; entre estos compuestos se encuentra el ácido gálico (GA), que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como verduras, frutas y productos alimenticios como el chocolate, té y vino (Choubey S, Goyal S, Varughese LR, 2018). El ácido gálico (ácido 3,4,5- trihidroxibenzoico) se puede obtener a través de hidrólisis ácida de los taninos hidrolizables. Este compuesto destaca por sus propiedades antitumorales y también por presentar un cierto grado de selectividad en su citotoxicidad al comparar la actividad sobre células tumorales y no tumorales. Además, estos compuestos poseen potentes propiedades terapéuticas, incluyendo propiedades antitumorales, antivirales, antimicrobianas, antioxidantes, entre otras (Locatelli, Filippin-Monteiro, & Creczynski-Pasa, 2013; You, Moon, Han, & Park, 2010).

Se ha descrito, que para potenciar la actividad del ácido gálico y sus derivados es necesario asociarlo a una molécula de trifenilfosfonio mediante una cadena alquílica de diez carbonos para que la mayor diferencia de potencial eléctrico de transmembrana mitocondrial de las células cancerosas guíe selectivamente la molécula a la mitocondria causando muerte celular (Jara et al., 2014). Se ha demostrado en estudios previos que, derivados del ácido gálico, unidos a una molécula de trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>) presentan mayor citotoxicidad y selectividad ya que exhiben un menor IC<sub>50</sub> para las células tumorales y un índice de selectividad considerablemente mayor en comparación con las células normales (Jara et al., 2014).

Por otra parte, se ha sintetizado una nueva serie cationes lipofílicos de derivados del ácido benzoico con distintas sustituciones en su anillo aromático que tienen como grupo farmacóforo moléculas como el ácido genticónico (2,5 diOH benzoico), el ácido protocatéquico (2,3 diOH benzoico) y el ácido 2-hidroxibenzoico, todos metabolitos del ácido gálico y que podrían presentar mayor efectividad o selectividad frente a células tumorales (*Figura 5*) (Catalán, Castro-Castillo, Gajardo-de la Fuente, et al. 2020).



**Figura 5.** Esquemas de cationes lipófilos deslocalizados. **A)** Molécula de ácido gálico unida a trifenilfosfonio. **B)** Molécula de ácido protocatéuico unida a trifenilfosfonio. **C)** Molécula de ácido gentísico unida a trifenilfosfonio. **D)** Molécula de ácido 2-hidroxibenzoico unida a trifenilfosfonio.

## 10. Efectos mitocondriales de doxiciclina como un nuevo fármaco antineoplásico.

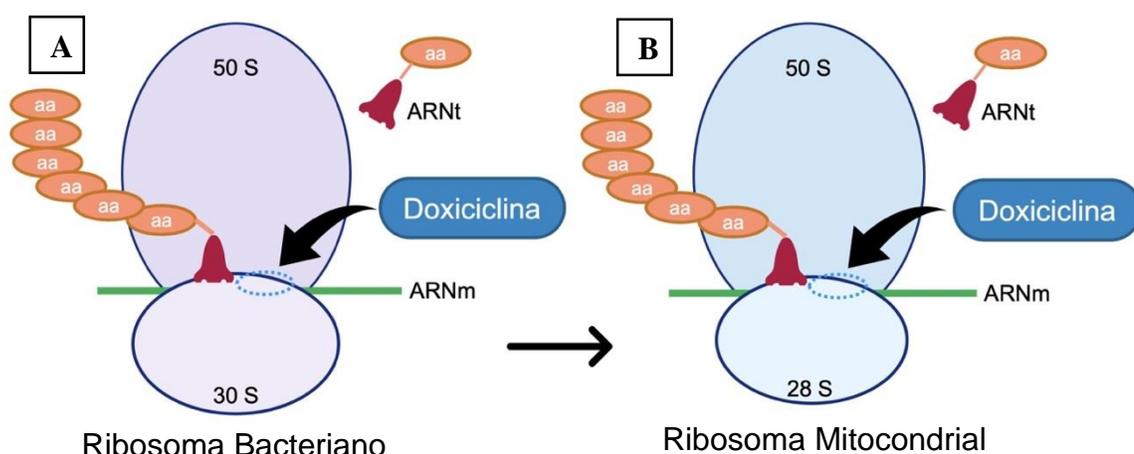
Debido a la resistencia intrínseca y adquirida del cáncer sobre los medicamentos se recomienda terapias de multiobjetivo (*multitarget*), esto se puede lograr mediante la combinación de dos compuestos con distinto mecanismo de acción para eliminar las células tumorales (Xie L, Bourne PE, 2015). La utilización de fármacos aprobados en clínica y descubrir nuevas propiedades antitumorales, representa una ventaja respecto a nuevas moléculas, ya que se encuentra descrito sus perfiles farmacológicos como dosis recomendadas, dosis tóxicas, contraindicaciones, y reacciones adversas, es por esto que doxiciclina se alza como una opción de tratamiento antineoplásico (Markowska A, Kaysiewicz J, Markowska J, et al., 2019).

Este conocido antibiótico de la familia de las tetraciclinas, previene el crecimiento y propagación de las bacterias Gram positivas (+) y Gram negativas (-), es decir, es un bacteriostático. Inhibe la síntesis proteica bacteriana por unión a la subunidad ribosomal 30S, evitando la unión del aminoacil-ARNt al ribosoma en la célula bacteriana (*Figura 6*). Además, inhibe la síntesis de proteínas mitocondriales, por otra parte, la doxiciclina tiene un efecto inhibitor sobre la actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMP); de acuerdo con esto, tiene la potencialidad

de ser utilizado como antineoplásico y también como agente antiinflamatorio (Ali, Alfarouk, Reshkin, & Ibrahim, 2017).

La doxiciclina actúa como ionóforo, uniéndose a algunos cationes metálicos divalentes, principalmente  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  y dando como resultado la formación de complejos solubles en lípidos que se transportan fácilmente a través de las membranas hidrófobas (Ali et al., 2017).

El ribosoma bacteriano 30S es homólogo al ribosoma mitocondrial 28S en células de mamíferos, lo que lleva a efectos secundarios manejables del tratamiento con doxiciclina, al inhibir la biogénesis mitocondrial en células de mamíferos (Zhang, Xu, Zhang, & Vlashi, 2017). Se ha descubierto que la doxiciclina puede inhibir la viabilidad y la proliferación de las células de cáncer de mama y células madre de cáncer de mama, planteándose como mecanismo la inhibición de la biogénesis mitocondrial afectando la subunidad 28S de los ribosomas, causando una pérdida de masa mitocondrial (*Figura 6*) (Lin et al., 2018; Peredo-Silva et al., 2017; Zhang et al., 2017). Estudios han demostrado que las TIC pulmonares dependen más de la fosforilación oxidativa en comparación con su progenie diferenciada, por lo que utilizar como blanco la mitocondria es una opción a considerar (X. Q. Ye, Li, et al., 2011). Además, los efectos secundarios reconocidos del medicamento aprobado por la FDA son menores y generalmente bien tolerados.



**Figura 6. A)** Esquema del mecanismo de acción de doxiciclina como antibiótico, esta molécula se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la unión del aminoacil-ARNt (ARN de transferencia más un aminoácido) al resto de la cadena polipeptídica deteniendo la síntesis de proteínas. **B)** Mecanismo de acción de doxiciclina en un ribosoma mitocondrial, la molécula se une

*a la subunidad 28S del ribosoma mitocondrial (que es análogo de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano) y también impide la unión del aminoacil-ARNt a la cadena de polipéptidos, de esta forma afecta la biogénesis mitocondrial.*

## **11. Síntesis**

El cáncer de pulmón tiene la mortalidad más grande de todas las neoplasias constituyendo la segunda causa de muerte en el mundo y en Chile. El cáncer de pulmón se clasifica como carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células no pequeñas.

Los tratamientos convencionales son radioterapia, quimioterapia y cirugía, pero las tasas de supervivencia a 5 años siguen siendo extremadamente pobres, debido al desarrollo de resistencia y eventual recaída. La hipótesis de células iniciadoras de tumores, sugiere que son responsables del inicio y crecimiento tumoral, además son resistentes a los tratamientos convencionales. Por lo cual, es necesario desarrollar nuevas terapias que nos permitan eliminar eficazmente las CT resistentes.

La mitocondria es un potencial blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer, ya que exhibe un mayor potencial transmembrana en las CT, por lo que es susceptible a ser blanco de moléculas cargadas positivamente como los cationes lipofílicos deslocalizados de trifenilfosfonio, que son moléculas sintetizadas a partir de ácido gálico, ácido gentísico, ácido protocatéquico y el ácido 2-hidroxibenzoico unidas a TPP<sup>+</sup>.

Doxiciclina es un antibiótico del grupo tetraciclina, recientemente se ha estudiado su uso antineoplásico produciendo la inhibición de la biogénesis mitocondrial en CT, por lo cual se abre una opción a nuevos tratamientos para la eliminación de CT resistentes a quimioterapias clásicas.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **a) Hipótesis**

“Los cationes lipofílicos deslocalizados del tipo ácido polihidroxi-benzoicos en combinación con doxiciclina presentan actividad citotóxica selectiva en células tumorales hipóxicas de cáncer de pulmón, respecto a células normales, ejerciendo estrés energético a través de la inducción de disfunción mitocondrial”.

#### **b) Objetivo General**

Evaluar la actividad citotóxica, la selectividad y el efecto mitocondrial de los Cationes Lipofílicos Deslocalizados (DLCs) y doxiciclina, por separado y en combinación, en células de cáncer pulmonar sometidos a hipoxia y fibroblastos pulmonares.

#### **c) Objetivos Específicos**

- 1) Caracterizar en cultivos hipóxicos y normóxicos la presencia de células iniciadoras de tumores presentes en líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón.
- 2) Determinar la potencia y selectividad de los compuestos (DLCs y doxiciclina) frente a líneas tumorales, comparándolos con células normales tipo fibroblastos.
- 3) Determinar si existe sinergia, efecto aditivo o antagonismo en la combinación de doxiciclina con DLCs sobre líneas tumorales derivadas de cáncer de pulmón.
- 4) Evaluar el efecto de los compuestos en el funcionamiento mitocondrial de las células tumorales de cáncer de pulmón.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### • MATERIALES

#### a. Reactivos

Medio de cultivo “Roswell Park Memorial Institute” RPMI 1640 (código R6504 Sigma-Aldrich®), medio de cultivo “Eagle`s Minimal Essential Medium” MEM (código M0643 Sigma-Aldrich®), Anfotericina B (código #03-028-1B, Biological Industries®), Suero fetal Bovino (FBS del inglés Fetal Bovine Serum, código #04-127-1A Biological Industries®), Penicilina-Estreptomicina (código #03-031-1B Biological Industries®), Bicarbonato de sodio (código #S5761 Sigma-Aldrich®), Dimetil Sulfóxido o DMSO (código #276855 Sigma-Aldrich®), PBS al 10X ( tampón fosfato salino pH 7,4) (código #16505 Merck®), Tripsina-EDTA 0,25% (código #03-050-1B Biological Industries®), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio o MTT (código #M6494 Thermo Fisher Scientific®), azul de tripán 0,4% (código #25-900-CI Corning®), Doxiciclina (código D9891 Sigma-Aldrich®), Kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, anti CD44 (código #88151, Cell Signaling Technology), anti CD133 (Código #ab253269, Abcam®), TMRM (Código #ab275547, Abcam®), Albúmina Fraction V (BSA, código #A1391 PanReac®).

#### b. Compuestos en Estudio

Los compuestos estudiados en esta tesis, derivados de ácidos polihidroxi-benzoicos, fueron sintetizados y caracterizados en la Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas de la Universidad de Chile por el Dr. Vicente Castro (Catalán, et al. 2020). Se utilizaron los compuestos catiónicos Gálico TPP<sup>+</sup>C10, Gentísico TPP<sup>+</sup>C10, 2,3 diOH TPP<sup>+</sup>C10 y 2 OH TPP<sup>+</sup>C10.

Mientras que doxiciclina (doxi) se adquirió a través de Sigma-Aldrich®. Todas las soluciones stock y disoluciones pertinentes fueron preparadas en DMSO.

#### c. Líneas Celulares

Los ensayos se realizaron con las siguientes líneas celulares:

- NCI-H727, línea tumoral de bronquio pulmonar. American Type Culture Collection.
- NCI-H1299, línea tumoral de metástasis pulmonar en nodo linfático. American Type Culture Collection.
- Fibroblastos Pulmonares, línea celular normal de pulmón. Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

- **MÉTODOS**

- a. **Cultivo Celular normóxicos**

El manejo del cultivo celular de ambas líneas tumorales, fue realizado en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar. Estas células se cultivaron en placas T25 con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS), 2% de penicilina/estreptomicina y 1% de Anfotericina B, en una atmósfera de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 21% de Oxígeno.

La línea celular de fibroblastos pulmonares también fue cultivada en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar. Estas células se cultivaron en placas Petri o T75 con medio MEM, suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de Anfotericina B, en una atmósfera de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 21% de Oxígeno.

- b. **Cultivo Celular hipóxicos**

Se utilizaron las líneas tumorales cultivadas en normoxia, estas células se cultivaron en placas T25 con medio RPMI-1640, suplementado con 10% de FBS, 2% de penicilina/estreptomicina y 1% de anfotericina B. Las placas que se someten a hipoxia, se dispusieron dentro de una cámara hipóxica, a la cual se le agrega gas de nitrógeno (N<sub>2</sub>) por un tiempo de 14 segundos a un flujo de 30 L/min, este gas desplaza el oxígeno presente dentro de la cámara, dejando una concentración de 5% de Oxígeno, dicha concentración fue medida con un medidor de oxígeno, la cual se mantiene por 24 hrs, para posteriormente experimentar con las células. La cámara de hipoxia se encuentra en una atmósfera de 37°C.

### c. Tripsinización de células

Las placas de células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x estéril, se descartó el sobrenadante, luego se agregó 1 mL de Tripsina-EDTA 0,25% y se esperó el tiempo necesario para que las células se despeguen. La tripsina fue inactivada agregando medio de cultivo suplementado 10% con suero en el mismo volumen que se ocupó de tripsina, luego se centrifugó a 3500 revoluciones por minuto (rpm) en un tubo cónico de 2 mL por 5 minutos y se obtuvo un precipitado de células para realizar los experimentos.

### d. Almacenamiento y Congelamiento

Las líneas celulares fueron congeladas, según las necesidades de la investigación, en sus respectivos medios suplementados con DMSO 5% V/V a -80 °C en viales de criopreservación.

### e. Ensayo de viabilidad celular con MTT

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

Para la realización de este ensayo se utilizaron las 3 líneas celulares, las cuales se sembraron 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron por 24 horas (h) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células luego se trataron con concentraciones crecientes de los 5 compuestos en estudio por separado en tiempos de 24, 48 y 72 h y por triplicado de cada concentración.

DLCs	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[ ]	0 $\mu$ M	0.01 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M

**Tabla 1.** Concentraciones finales de los compuestos cationes lipofílicos deslocalizados en cada pocillo

Doxi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[ ]	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	200 $\mu$ M	300 $\mu$ M	400 $\mu$ M

**Tabla 2.** Concentraciones finales del compuesto doxiciclina en cada pocillo

Una vez transcurrido el tiempo de cada ensayo, el medio que contenía los compuestos se descartó y se lavó con PBS estéril 1x dos veces para eliminar posibles trazas de los compuestos, para posteriormente colocar la dilución de MTT la cual se esperó de 2 a 4 h. Luego se descartó el sobrenadante y se solubilizaron los cristales con DMSO. Finalmente, la placa fue leída espectrofotométricamente en un lector de microplacas a una longitud de onda de  $\lambda = 570$  nm y se calcularon los porcentajes de viabilidad celular a través de planillas de Microsoft Excel®. Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular, los resultados se analizaron mediante el software GraphPad Prism 9 y se expresan como IC<sub>50</sub>, obtenidos de la curva sigmoidea dosis-respuesta con pendiente variable.

Mientras que, para los cultivos hipóxicos, se utilizaron solo las líneas tumorales, las cuales se someten a un golpe de hipoxia de 24 h al 5% de Oxígeno, para posteriormente seguir con el protocolo del ensayo de viabilidad celular con MTT anteriormente descrito.

#### **f. Estudios de combinación de compuestos**

Obtenidos los resultados de IC<sub>50</sub> (concentración capaz de inhibir en un 50% la viabilidad) de los fármacos en estudio, se analizó el efecto que tiene la combinación de éstos sobre las 2 líneas tumorales (NCI-H727 y NCI-H1299). Para esto, a partir de los gráficos obtenidos en el ensayo de viabilidad celular con MTT de los compuestos **a)** Gálico TPP<sup>+</sup> C10, **b)** Gentísico TPP<sup>+</sup> C10 y **c)** Doxiciclina, se determinó las concentraciones máxima y mínima en las que se encontraban las pendientes de las curvas sigmoideas. Luego, se realizaron disoluciones seriadas entre esas concentraciones obteniendo un nuevo rango de concentraciones.

<b>Gálico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>[ ]</b>	1 $\mu$ M	1,9 $\mu$ M	3,62 $\mu$ M	6,9 $\mu$ M	13,1 $\mu$ M	25 $\mu$ M

<b>Gentísico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>[ ]</b>	1 $\mu$ M	1,58 $\mu$ M	2,51 $\mu$ M	3,98 $\mu$ M	6,31 $\mu$ M	10 $\mu$ M

<b>Doxiciclina</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>[ ]</b>	5 $\mu$ M	7,92 $\mu$ M	12,6 $\mu$ M	19,9 $\mu$ M	31,5 $\mu$ M	50 $\mu$ M

**Tabla 3.** Concentraciones determinadas a partir de las pendientes de las curvas de los compuestos Gálico TPP<sup>+</sup> C10, Gentísico TPP<sup>+</sup> C10 y doxiciclina.

Se sembraron 20.000 células (de normoxia y de hipoxia) por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se agregó un compuesto en sentido horizontal y otro compuesto en sentido perpendicular, ambas en orden creciente para formar la combinación y se dejan incubar por 72 h. Una vez transcurrido el tiempo del ensayo, el medio que contenía los compuestos combinados se descartó y se lavó con PBS estéril 1x dos veces para eliminar posibles trazas de los compuestos, para posteriormente colocar la dilución de MTT la cual se debía esperar 4 h. Luego se descartaba el sobrenadante y se solubilizaron los cristales con DMSO. La placa se lee a través de espectrofotometría en un lector de microplacas a una  $\lambda$  =570 nm, y se calcularon los porcentajes de viabilidad celular a través de planillas de Microsoft Excel®. Las planillas posteriormente fueron analizadas en el programa Combeneft 2.021 determinando si en los compuestos combinados existe antagonismo o sinergia entre Gálico TPP<sup>+</sup> C10 – doxiciclina y Gentísico TPP<sup>+</sup> C10 - doxiciclina.

Gálico-TPP<sup>+</sup> C10

		Gálico-TPP <sup>+</sup> C10						
		0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1,9 $\mu$ M	3,62 $\mu$ M	6,9 $\mu$ M	13,1 $\mu$ M	25 $\mu$ M
Doxiciclina	A							
	0 $\mu$ M	0 $\mu$ M DMSO	1 C10	1,9 C10	3,62 C10	6,9 C10	13,1 C10	25 C10
	5 $\mu$ M	5 Doxi	5 Doxi + 1 C10	5 Doxi + 1,9 C10	5 Doxi + 3,62 C10	5 Doxi + 6,9 C10	5 Doxi + 13,1 C10	5 Doxi + 25 C10
	7,92 $\mu$ M	7,92 Doxi	7,92 Doxi + 1 C10	7,92 Doxi + 1,9 C10	7,92 Doxi + 3,62 C10	7,92 Doxi + 6,9 C10	7,92 Doxi + 13,1 C10	7,92 Doxi + 25 C10
	12,6 $\mu$ M	12,6 Doxi	12,6 Doxi + 1 C10	12,6 Doxi + 1,9 C10	12,6 Doxi + 3,62 C10	12,6 Doxi + 6,9 C10	12,6 Doxi + 13,1 C10	12,6 Doxi + 25 C10
	19,9 $\mu$ M	19,9 Doxi	19,9 Doxi + 1 C10	19,9 Doxi + 1,9 C10	19,9 Doxi + 3,62 C10	19,9 Doxi + 6,9 C10	19,9 Doxi + 13,1 C10	19,9 Doxi + 25 C10
	31,5 $\mu$ M	31,5 Doxi	31,5 Doxi + 1 C10	31,5 Doxi + 1,9 C10	31,5 Doxi + 3,62 C10	31,5 Doxi + 6,9 C10	31,5 Doxi + 13,1 C10	31,5 Doxi + 25 C10
50 $\mu$ M	50 Doxi	50 Doxi + 1 C10	50 Doxi + 1,9 C10	50 Doxi + 3,62 C10	50 Doxi + 6,9 C10	50 Doxi + 13,1 C10	50 Doxi + 25 C10	

Gentísico-TPP<sup>+</sup> C10

		Gentísico-TPP <sup>+</sup> C10						
		0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1,58 $\mu$ M	2,51 $\mu$ M	3,98 $\mu$ M	6,31 $\mu$ M	10 $\mu$ M
Doxiciclina	B							
	0 $\mu$ M	0 $\mu$ M DMSO	1 Gent	1,58 Gent	2,51 Gent	3,98 Gent	6,31 Gent	10 Gent
	5 $\mu$ M	5 Doxi	5 Doxi + 1 Gent	5 Doxi + 1,58 Gent	5 Doxi + 2,51 Gent	5 Doxi + 3,98 Gent	5 Doxi + 6,31 Gent	5 Doxi + 10 Gent
	7,92 $\mu$ M	7,92 Doxi	7,92 Doxi + 1 Gent	7,92 Doxi + 1,58 Gent	7,92 Doxi + 2,51 Gent	7,92 Doxi + 3,98 Gent	7,92 Doxi + 6,31 Gent	7,92 Doxi + 10 Gent
	12,6 $\mu$ M	12,6 Doxi	12,6 Doxi + 1 Gent	12,6 Doxi + 1,58 Gent	12,6 Doxi + 2,51 Gent	12,6 Doxi + 3,98 Gent	12,6 Doxi + 6,31 Gent	12,6 Doxi + 10 Gent
	19,9 $\mu$ M	19,9 Doxi	19,9 Doxi + 1 Gent	19,9 Doxi + 1,58 Gent	19,9 Doxi + 2,51 Gent	19,9 Doxi + 3,98 Gent	19,9 Doxi + 6,31 Gent	19,9 Doxi + 10 Gent
	31,5 $\mu$ M	31,5 Doxi	31,5 Doxi + 1 Gent	31,5 Doxi + 1,58 Gent	31,5 Doxi + 2,51 Gent	31,5 Doxi + 3,98 Gent	31,5 Doxi + 6,31 Gent	31,5 Doxi + 10 Gent
50 $\mu$ M	50 Doxi	50 Doxi + 1 Gent	50 Doxi + 1,58 Gent	50 Doxi + 2,51 Gent	50 Doxi + 3,98 Gent	50 Doxi + 6,31 Gent	50 Doxi + 10 Gent	

**Tabla 4.** Modelo de combinaciones. **A)** Matriz de combinación de concentraciones finales crecientes para compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 (fila) y doxiciclina (columna). **B)** Matriz de combinación de concentraciones finales crecientes para compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 (fila) y doxiciclina (columna).

**g. Expresión de marcadores de TICs**

Se realizó citometría de flujo para detectar los marcadores de células iniciadoras de tumores CD44, CD133 en la línea NCI-H1299 (Leon, MacDonagh, Finn, Cuffe, &

Barr, 2016; Maiuthed, Chantarawong, & Chanvorachote, 2018). El procedimiento se describe a continuación:

### 1) Obtención de muestras

El ensayo se realizó en cultivos convencionales, separando los cultivos de normoxia con los cultivos de hipoxia y fueron sembradas 250.000 células/mL en cada pocillo en placas de 24 pocillos, las cuales se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Transcurrido el tiempo, cada pocillo fue lavado 3 veces con PBS 1X en un volumen de 500 µL, posteriormente se les agregó 300 µL de tripsina siguiendo el protocolo de tripsinización. Se recolectó el contenido de 2 pocillos en un tubo cónico de 1,5 mL, para posteriormente centrifugar a una velocidad de 3500 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, para luego resuspender y lavar con PBS 1X no estéril en un volumen de 500 µL y centrifugar a 3500 rpm por 5 min, este proceso se repitió 3 veces. Finalmente se eliminó el sobrenadante de PBS 1x y se conservaron los precipitados de células para ser tratados.

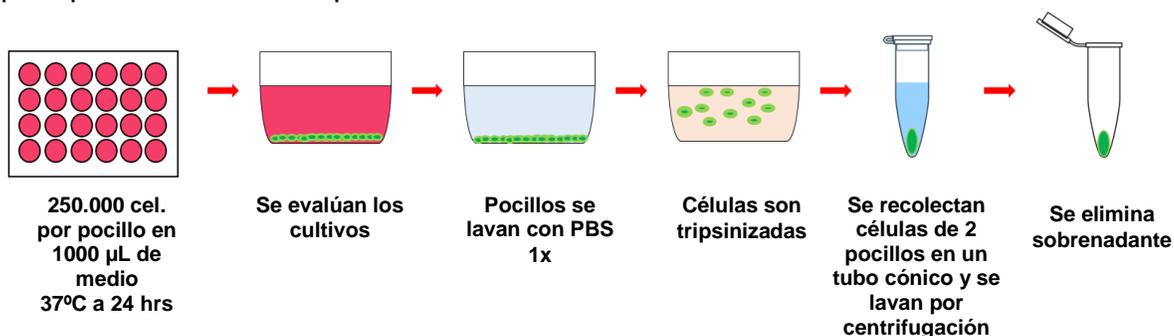


Figura 7. Obtención de muestras para citometría de flujo.

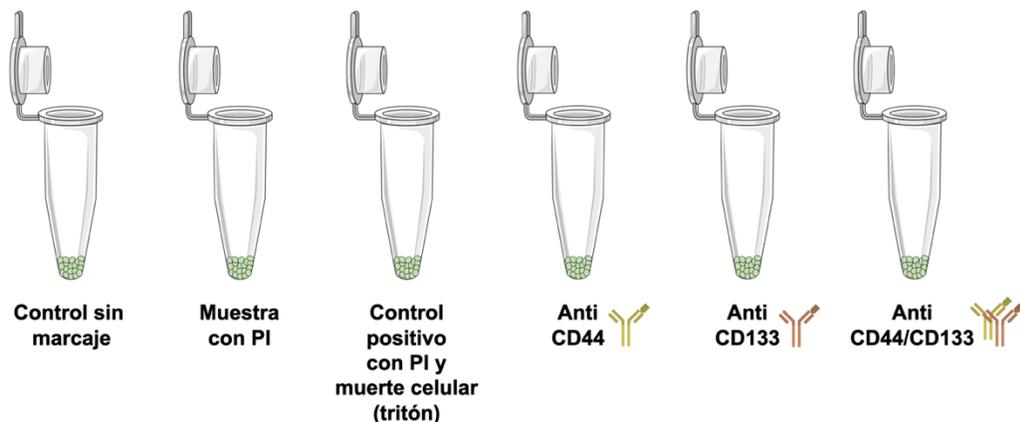
### 2) Selección de células viables con Ioduro de Propidio (PI)

Este ensayo tenía como objetivo seleccionar adecuadamente la población a analizar en los ensayos posteriores, descartando las células muertas. Las muestras fueron marcadas en el siguiente orden: Control sin marca, Muestra con PI, Control positivo (muerte celular con tritón X-100). Cada precipitado se resuspendió en 100 µL de BSA al 0,5% y se incubó con 1 µL de PI o con 1 µL PI+5 µL de Tritón 100x (según correspondía) durante 15 min a temperatura ambiente antes de leer en el citómetro.

### 3) Expresión de CD44 y CD133

Las células precipitadas se marcaron en el siguiente orden: Control sin marcaje, anti CD44, anti CD133 y anti CD44-CD133 + PI. Las células fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de anticuerpo de interés diluido en buffer de BSA al 0,5% en PBS 1X e incubadas en hielo y oscuridad durante 30 minutos para CD44 en una disolución de 1:2000 de BSA al 0,5%, mientras que CD133 fue incubado en hielo y oscuridad por 1 hora en una dilución 1:100 de BSA al 0,5%. Las muestras fueron traspasadas a tubos de citómetro y analizadas en un citómetro de flujo donde se cuantificaron 10.000 eventos. En resumen, los precipitados de células fueron ordenados del 1 al 6 para recibir los siguientes marcajes:

- 1) Población celular sin marcaje
- 2) Población celular con marcaje de Ioduro de Propidio (control negativo)
- 3) Población celular con marcaje de Ioduro de Propidio + Tritón 100x (control positivo)
- 4) Población celular con marcaje de CD44 (Phycoerythrin o PE)
- 5) Población celular con marcaje de CD133 (Allophycocyanin o APC)
- 6) Población celular con marcaje de CD44/CD133 y PI (PE, APC y PI) se incubó con 1  $\mu$ L de PI en 100  $\mu$ L de BSA 0,5% por 15 minutos antes de analizar.



**Figura 8.** Representación grafica de los marcajes utilizados.

## h. Medición de contenido de ATP intracelular

Los niveles de ATP se midieron con el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability (Kit de ATP), según las especificaciones indicadas por el fabricante, con las siguientes consideraciones:

Se sembraron 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (tanto células de normoxia como células de hipoxia) y se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se agregaron los compuestos **a) Gálico TPP+ C10**, **b) Gentísico TPP+ C10** y **c) Doxiciclina** en concentraciones de ½ de IC<sub>50</sub>, el IC<sub>50</sub> y 2 veces el IC<sub>50</sub> que fueron determinados a partir del análisis de las curvas sigmoideas de cada compuesto. (Tabla 5) También se utilizaron controles negativos con DMSO y controles positivos con CCCP 10 µM y oligomicina 1 µM.

Se esperó por un tiempo de 4 h, para posteriormente lavar con PBS 1x no estéril. Luego, la medición de ATP se realizó agregando a las células 20 µL de PBS 1X no estéril más 20 µL de Buffer del kit de ATP. Se agitó por 2 minutos a 125 rpm para luego transferir 30 µL de cada pocillo a una placa opaca y finalmente se midió la concentración de ATP en un espectrofluorímetro lector de microplacas (Synergy HT™). Los resultados fueron analizados en planillas de Microsoft Excel® y el software GraphPad Prism 9.

**A** Línea NCI-H727

		½ IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	2x IC <sub>50</sub>
Gálico-TPP+C10	Normoxia	2,23 µM	4,47 µM	8,94 µM
	Hipoxia	2,02 µM	4,04 µM	8,08 µM
Gentísico-TPP+C10	Normoxia	0,87 µM	1,75 µM	3,5 µM
	Hipoxia	1,26 µM	2,52 µM	5,04 µM
Doxiciclina	Normoxia	7,21 µM	14,42 µM	28,84 µM
	Hipoxia	7,11 µM	14,22 µM	28,44 µM

**B** Línea NCI-H1299

		½ IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	2x IC <sub>50</sub>
Gálico-TPP+C10	Normoxia	2,4 µM	4,8 µM	9,6 µM
	Hipoxia	2,51 µM	5,02 µM	10,04 µM
Gentísico-TPP+C10	Normoxia	1,32 µM	2,65 µM	5,3 µM
	Hipoxia	2 µM	4,01 µM	8,02 µM
Doxiciclina	Normoxia	3,58 µM	7,16 µM	14,32 µM
	Hipoxia	7,73 µM	15,47 µM	30,94 µM

**Tabla 5.** Concentraciones con las cuales se trabajó para los experimentos de medición de ATP y medición de potencia de transmembrana mitocondrial, en base a los IC<sub>50</sub> de los compuestos Gálico-TPP+C10, Gentísico-TPP+C10 y doxíciclina a las 72 hrs. **A)** Línea celular NCI-H727. **B)** Línea celular NCI-H1299.

**i. Medición de potencial de transmembrana mitocondrial mediante TMRE.**

Los cambios generados en el potencial de transmembrana mitocondrial por la acción de los cationes lipofílicos deslocalizados y doxíciclina fueron determinados por la sonda fluorescente tetrametilrodamina metil éster (TMRE). TMRE es una sonda catiónica fluorescente de color rojo-anaranjado que penetra específicamente en las mitocondrias de las células porque presentan una diferencia de potencial de transmembrana. De esta forma se puede detectar si existe una disminución en el potencial de transmembrana mitocondrial producto de los compuestos en estudio.

Se incubaron 250.000 células/pocillo de las líneas tumorales en placas de 24 pocillos por 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS 1x no estéril en un volumen de 500 µL. Luego en 495 µL de PBS 1x, se agregaron 5 µL de los compuestos en estudio en concentraciones ½ de IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> y 2xIC<sub>50</sub> y se incubaron por 15 minutos a 37°C. Posteriormente se agregó la sonda TMRE en un volumen de 1µL a concentración de 100 µM por cada pocillo y se incubaron por 15 minutos más a 37°C.

Se retiró el PBS 1x con el compuesto y sonda TMRE de los pocillos y las células fueron lavadas con PBS no estéril para eliminar trazas de compuesto y sonda, luego se tripsinizaron con 300 µL de tripsina, se inactiva la tripsina, se recolectaron las células en tubos cónicos de 2 mL y se centrifugaron por 5 minutos a 3.500 rpm, luego se retiró el sobrenadante y los *pellets* fueron resuspendidos en 100 µL de PBS 1x y traspasados a tubos de citometría manteniéndolos a 4°C para ser analizados mediante citometría de flujo.

## V. RESULTADOS

### 1) Expresión de marcadores de TICs

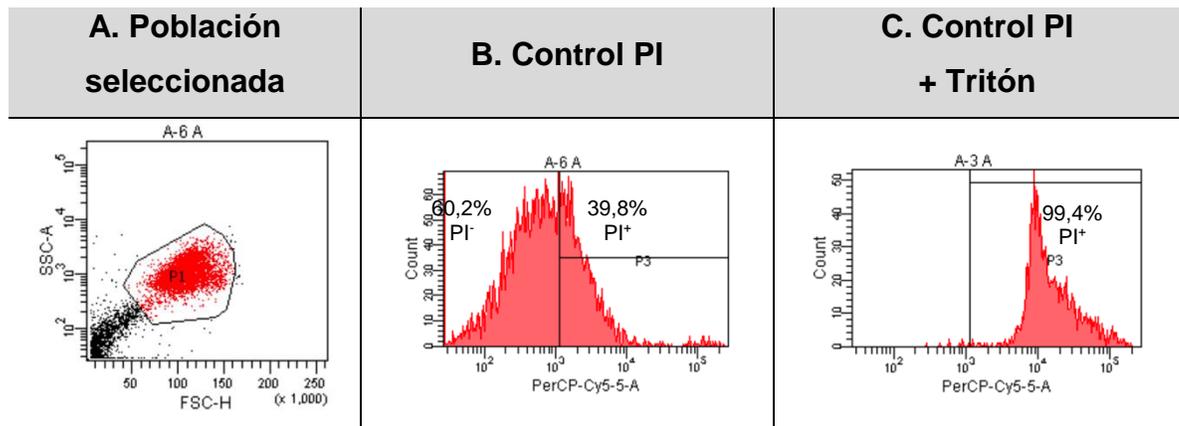
La expresión de marcadores de TICs fue realizada en la línea celular NCI-H1299 en condiciones de normoxia e hipoxia. El experimento se realizó mediante citometría de flujo y los resultados fueron divididos por cultivos de normoxia e hipoxia y expresados en porcentajes con los marcadores CD44 y CD133.

#### Línea celular NCI-H1299

##### Normoxia

#### A. Selección de población y viabilidad celular con PI

Se seleccionó la población que según tamaño y granulosidad correspondía a células NCI-H1299 (*Figura 9, A*). Adicionalmente, se identificó mediante Ioduro de Propidio (PI, PerCP-Cy5-5-A) las células muertas al interior de las poblaciones de interés y se identificaron porcentajes de células vivas y muertas (*Figura 9, B*). Además, paralelamente se estableció un control positivo con PI y Tritón. (*Figura 9, C*).



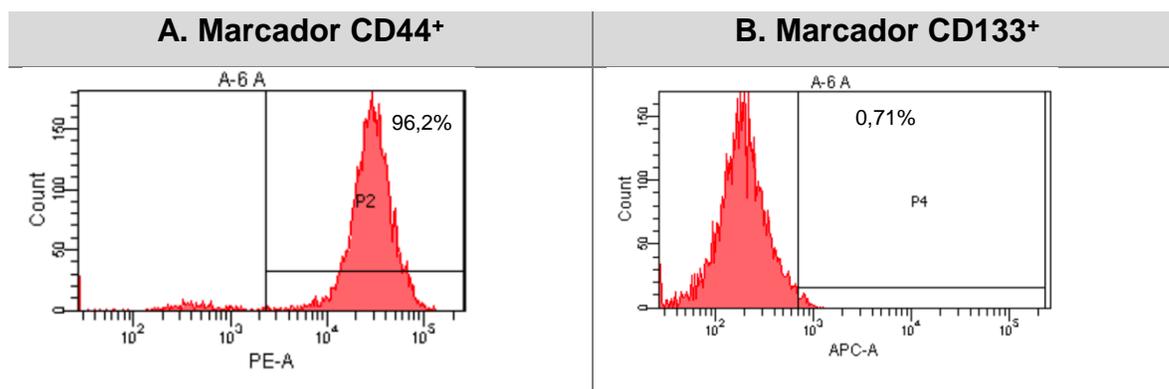
**Figura 9.** Evaluación de viabilidad celular mediante citometría de flujo con Ioduro de Propidio (PI) en línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia. **A)** Poblaciones celulares de NCI-H1299 seleccionada. **B)** Histograma población de NCI-H1299 PI<sup>-</sup> vs. PI<sup>+</sup>. **C)** Histograma de control positivo (+) de PI+Tritón.

En la *Figura 9 B*, las células PI<sup>-</sup> representan a células vivas y alcanzan un promedio de 60,2%. Mientras que en la *Figura 9 C*, representa el control positivo con Tritón,

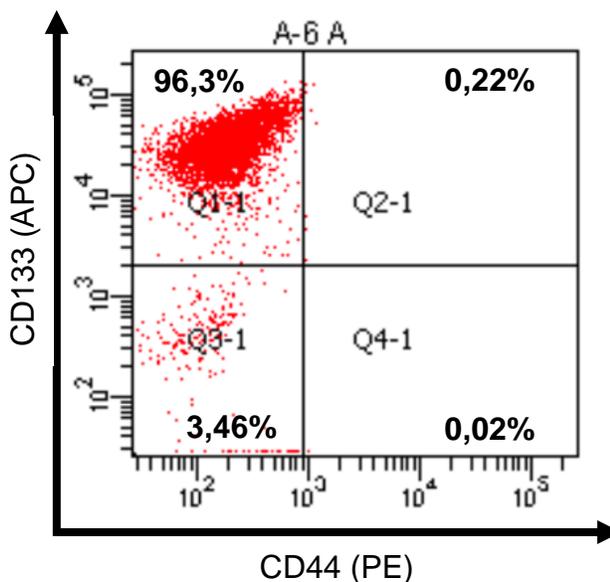
donde existió muerte celular representado por el marcador PI<sup>+</sup> que alcanzan un 99,4%.

### B. Detección de CD44 y CD133 en cultivos de normoxia de NCI-H1299 a través de citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se determinó la fluorescencia positiva para los marcadores CD44 (Fluorocromo ficoeritrina, PE) y CD133 (Fluorocromo Allophycocyanin, APC) de normoxia de la línea NCI-H1299 con el objetivo de identificar poblaciones de TICs. Las poblaciones se seleccionaron según lo descrito anteriormente. Los histogramas de CD44 y CD133 se muestran en la *Figura 10* y los Dot Plots del doble marcaje entre CD44 y CD133 se encuentran en la *Figura 11*.



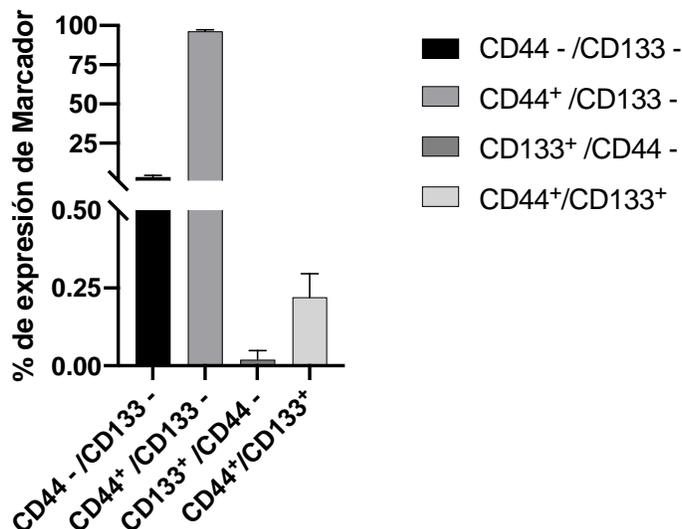
**Figura 10.** Histogramas de la intensidad de fluorescencia de marcadores celulares CD44 y CD133 en línea celular NCI-H1299 en cultivo de normoxia mediante citometría de flujo. **A)** Expresión del marcador CD44. **B)** Expresión del marcador CD133.



**Figura 11.** Detección de CD44 y CD133 en línea celular NCI-H1299 en cultivo de normoxia realizado a través de citometría de flujo. N=3, los porcentajes corresponden a unidades de fluorescencia relativa.

En la *Figura 12*, se observa una alta expresión del marcador CD44 en cultivos de normoxia con un promedio de 96,3% (población CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>), por otro lado, el marcador CD133 tuvo una baja expresión con un promedio de 0,02% (población CD133<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup>). En la combinación de ambos marcadores se obtuvo una expresión de 0,22% (población CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>). El eje Y del grafico fue dividido para representar de mejor forma los porcentajes obtenidos por la población CD133<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>.

**Expresión de marcadores celulares. NCI H1299  
Normoxia**

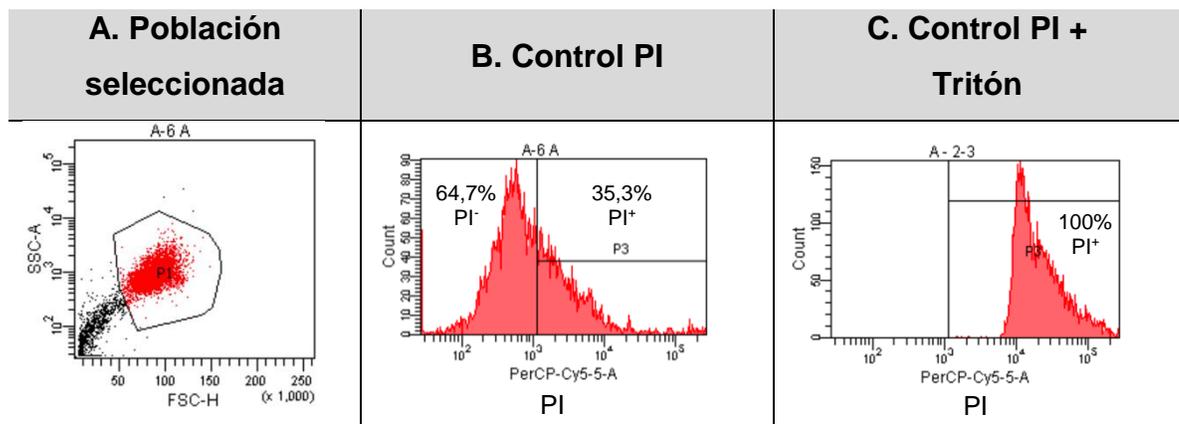


**Figura 12.** Expresión de marcadores celulares CD44 y CD133 en línea celular NCI-H1299 en cultivo de normoxia mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio y la DS del % de expresión. N=3

## Hipoxia

### A. Selección de población y viabilidad celular con PI

Se seleccionó la población que según tamaño y granulosidad correspondía a células NCI-H1299 (*Figura 13, A*). Adicionalmente, se identificó mediante Ioduro de Propidio (PI, PerCP-Cy5-5-A) las células muertas al interior de las poblaciones de interés y se identificaron porcentajes de células vivas y muertas (*Figura 13, B*). Además, paralelamente se estableció un control positivo con PI y Tritón. (*Figura 13, C*).



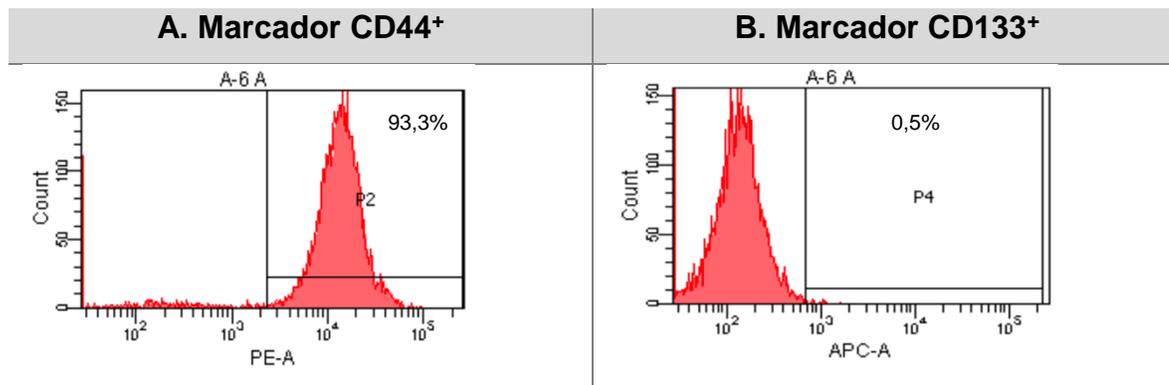
**Figura 13.** Evaluación de viabilidad celular mediante citometría de flujo con Ioduro de Propidio (PI) en línea celular NCI-H1299 en cultivos de hipoxia. **A)** Poblaciones celulares de NCI-H1299 seleccionada. **B)** Histograma población de NCI-H1299 PI<sup>-</sup> vs. PI<sup>+</sup>. **C)** Histograma de control positivo (+) de PI+Tritón. N=3.

En la *Figura 13 B*, las células PI<sup>-</sup> representan a células vivas y alcanzan un promedio de 64,7%. La *Figura 13 C*, representa el control positivo con Tritón, donde existió muerte celular representado por el marcador PI<sup>+</sup> que alcanzan un 100%.

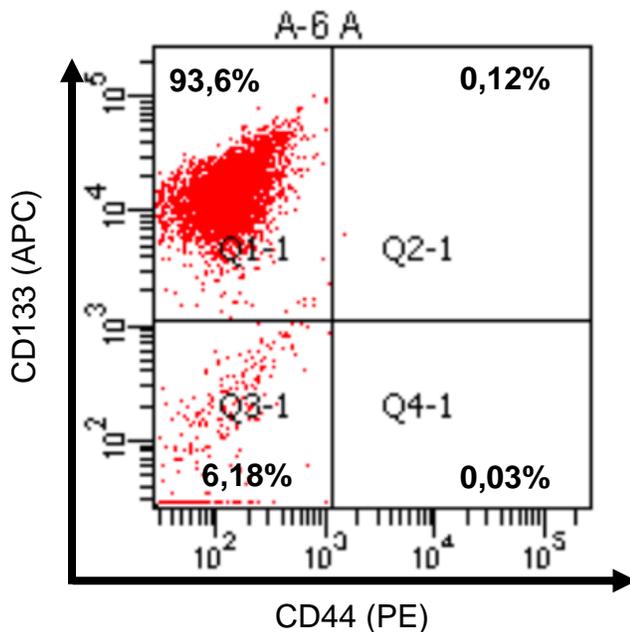
### B. Detección de CD44 y CD133 en cultivos de hipoxia de NCI-H1299 a través de citometría de flujo

Una vez que fueron seleccionadas las células viables, se procedió a determinar si las células expresaban los marcadores CD44 (Fluorocromo ficoeritrina, PE) y CD133 (Fluorocromo Allophycocyanin, APC) lo que nos indicaría si en nuestro modelo bajo condiciones de hipoxia se expresan estos marcadores en la línea celular NCI-H1299. Los histogramas de CD44 y CD133 se muestran en la *Figura 14*

y los Dot Plots del doble marcaje entre CD44 y CD133 se encuentran en la *Figura 15*.

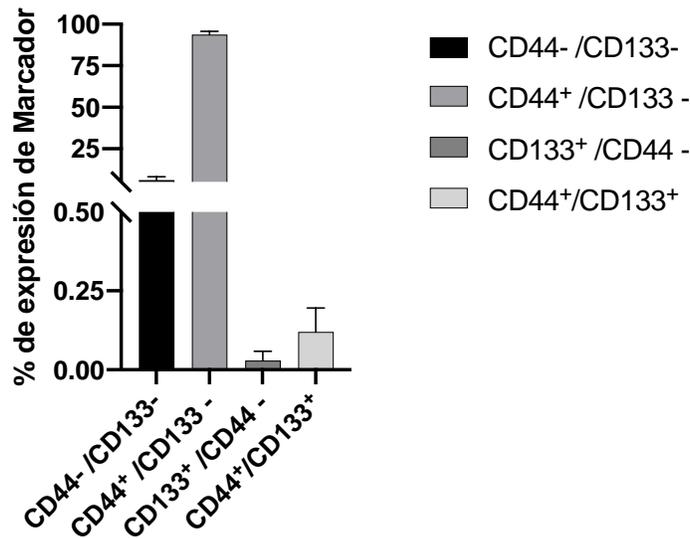


**Figura 14.** Histogramas de la intensidad de fluorescencia de marcadores celulares CD44 y CD133 en línea celular NCI-H1299 en cultivo de hipoxia mediante citometría de flujo. **A)** Expresión del marcador CD44. **B)** Expresión del marcador CD133. N=3.



**Figura 15.** Detección de CD44 y CD133 en línea celular NCI-H1299 en cultivo de normoxia realizado a través de citometría de flujo. N=3, los porcentajes corresponden a unidades de fluorescencia relativa.

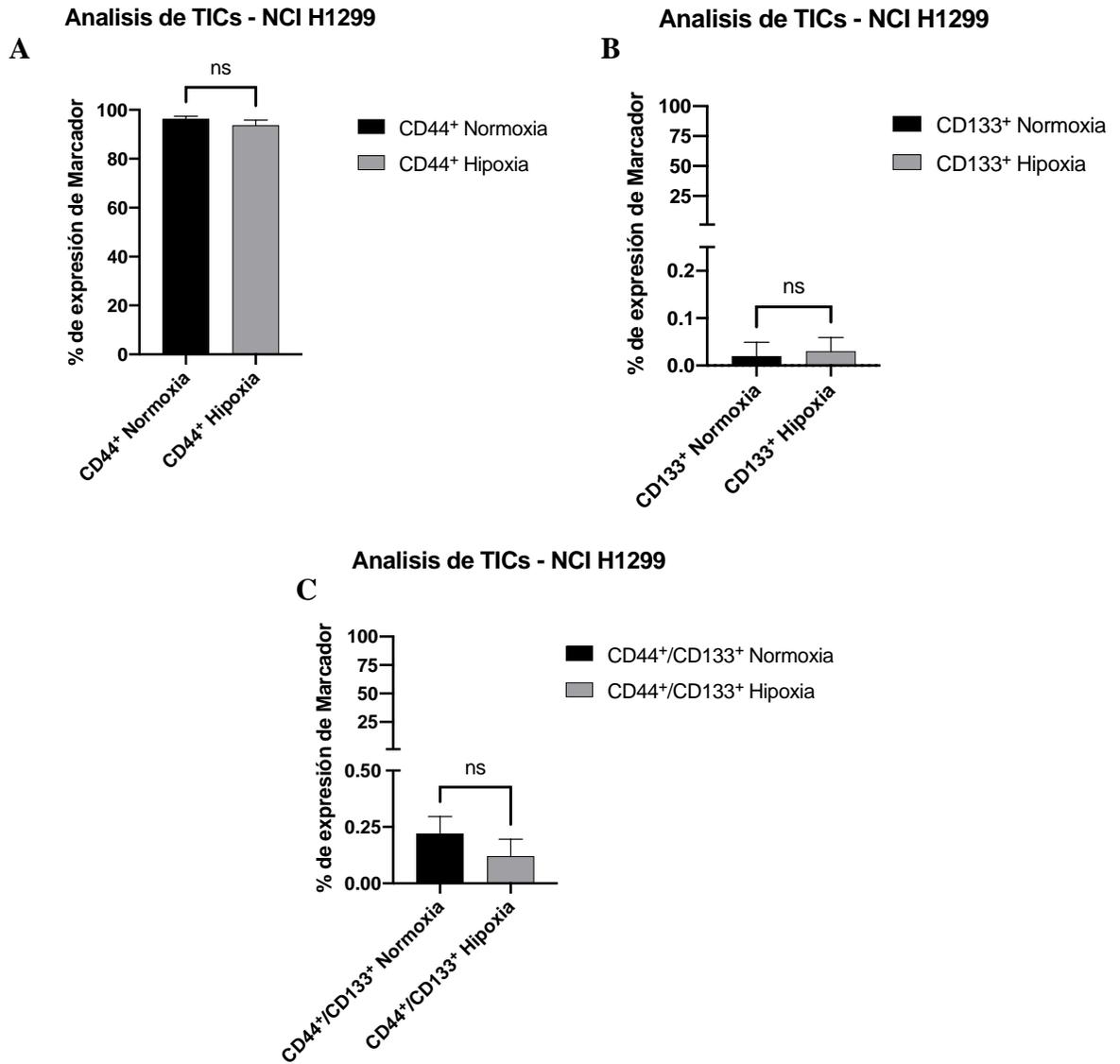
## Expresión de marcadores celulares. NCI H1299 Hipoxia



**Figura 16.** Expresión de marcadores celulares CD44 y CD133 en línea celular NCI-H1299 en cultivo de hipoxia mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio y la DS del % de expresión, N=3.

En la *Figura 16*, se observa una alta expresión del marcador CD44 en cultivos de hipoxia con un promedio de 93,6% (Población CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>). El marcador CD133 tuvo una baja expresión con un promedio de 0,03% (Población CD133<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup>). Mientras que en la combinación de ambos marcadores se obtuvo una expresión de 0,12% (Población CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>).

En la *Figura 17*, se observa la comparación de datos obtenidos en cultivos de normoxia vs. hipoxia, en la cual se obtienen valores similares en las distintas poblaciones de marcadores de TICs. En cuanto al análisis estadístico (T-test) no existieron diferencias estadísticamente significativas. En la *Figura 17 B y C*, el eje Y fue dividido para representar el pequeño porcentaje obtenido por el marcador CD133<sup>+</sup> y la combinación de marcadores CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>.



**Figura 17.** Comparación de expresión de marcadores celulares entre normoxia e hipoxia en línea celular NCI-H1299. **A)** Representación grafica de CD44+. **B)** Representación grafica de CD133+. **C)** Representación grafica de CD44+/CD133+.

## 2) Ensayo de viabilidad celular

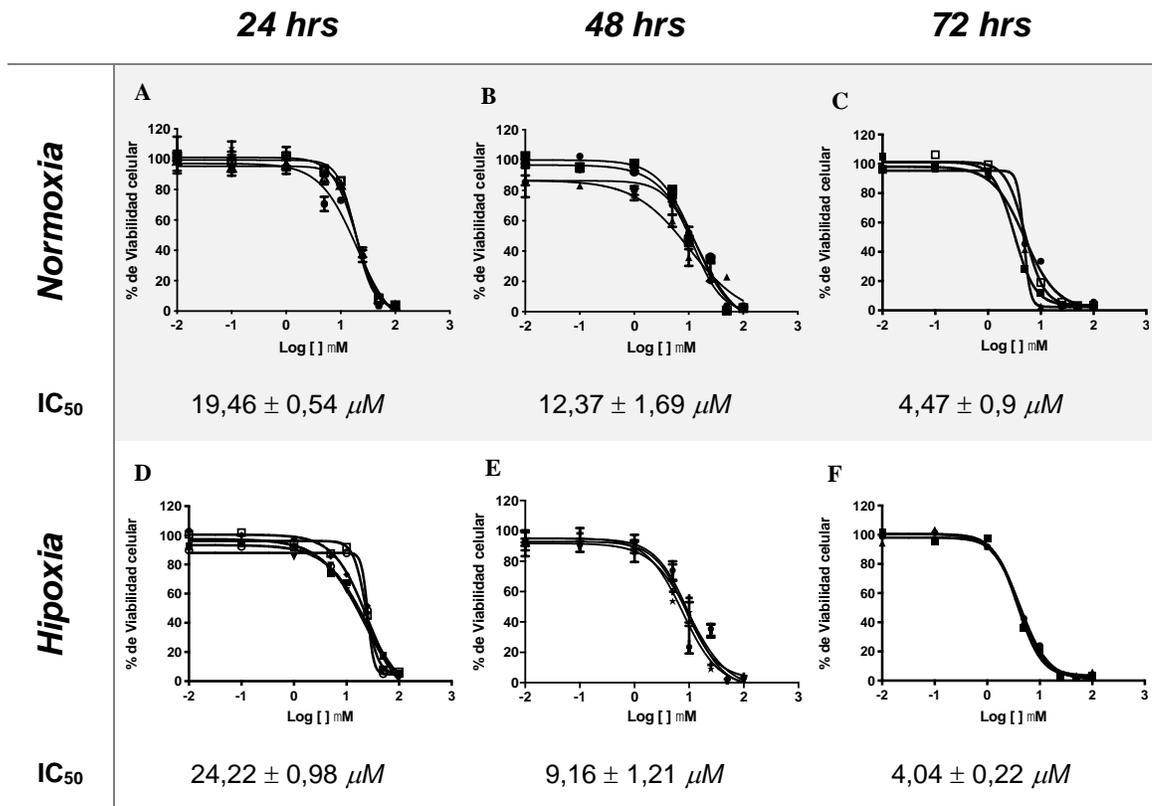
La concentración capaz de inhibir en un 50%, también llamada  $IC_{50}$ , es una medida de la potencia de una sustancia para inhibir un proceso biológico o bioquímico específico. Para un fármaco, el  $IC_{50}$  representa la concentración de un fármaco que se requiere para una inhibición del 50% de un proceso biológico. (Aykul, S., Martinez-Hackert, E., 2016). Experimentalmente, esto se puede determinar construyendo una curva dosis-respuesta y examinando el efecto de diferentes concentraciones del compuesto sobre la actividad celular. Es uno de los parámetros más importantes para comparar la potencia de un fármaco con respecto a un tipo similar de fármacos. (Bag, A., Ghorai, P. K., 2016)

Para determinar el efecto citotóxico de los compuestos en estudio, se realizó un análisis de viabilidad celular mediante MTT en cultivos de normoxia e hipoxia con las líneas celulares NCI-H727 y NCI-H1299, y cultivos de normoxia con la línea celular de fibroblastos pulmonares. Los resultados fueron divididos por compuestos y subdivididos por línea celular, además se encuentran expresados en curvas sigmoideas donde el eje X del gráfico corresponde al logaritmo de la concentración en micro molar ( $\mu M$ ) y el eje Y corresponde al porcentaje de viabilidad celular.

## a. Gálico TPP<sup>+</sup> C10

### Línea celular NCI – H727

Las células fueron sensibles al compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10, causando citotoxicidad en todos los tiempos experimentados en ambos cultivos. Al aumentar la concentración del compuesto, este tiene un efecto citotóxico mayor, llegando a un 0% de viabilidad celular (concentración 100  $\mu$ M) representado en las curvas sigmoideas de la *Figura 18*.

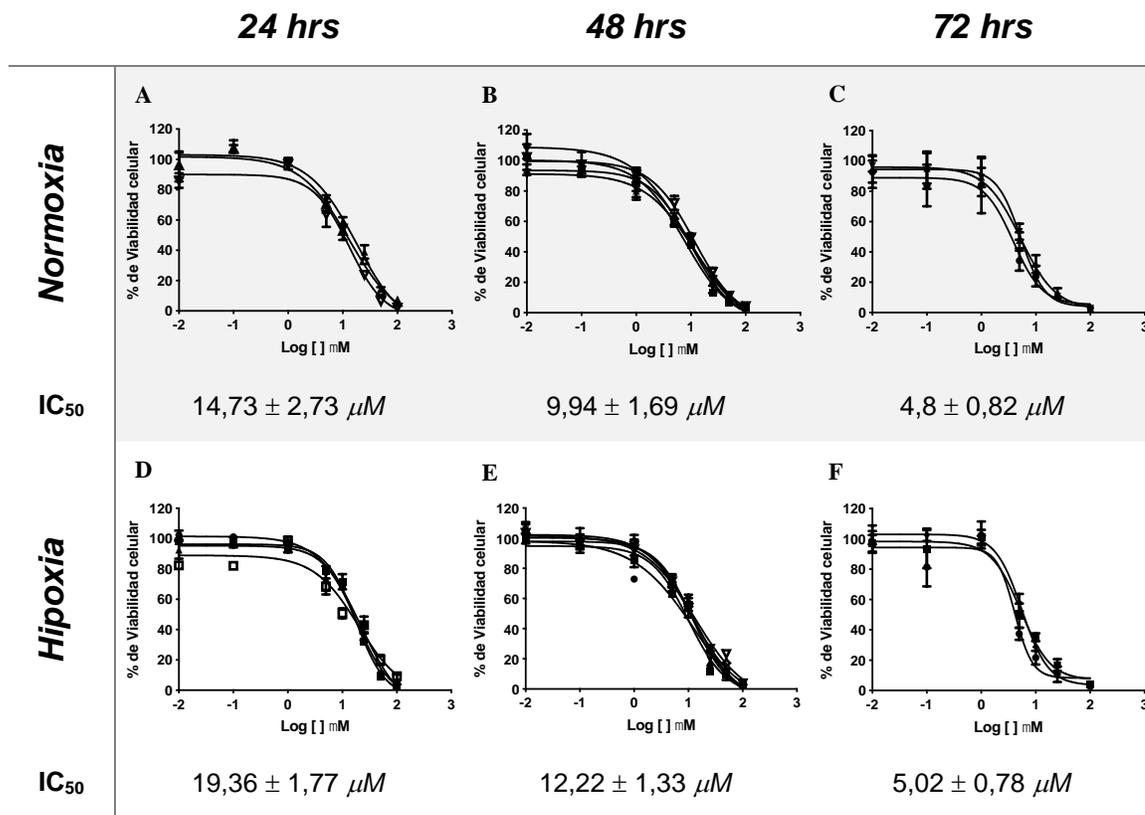


**Figura. 18.** Efecto citotóxico de Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H727 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (**A y D**), a 48 hrs (**B y E**) y 72 hrs (**C y F**). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub>  $\pm$  SD.

### Línea celular NCI – H1299

Al igual que las células anteriores, el compuesto también tiene un efecto citotóxico dependiente de la concentración sobre esta línea celular llegando a un 0% de viabilidad celular con la máxima concentración utilizada (100  $\mu$ M), además en la

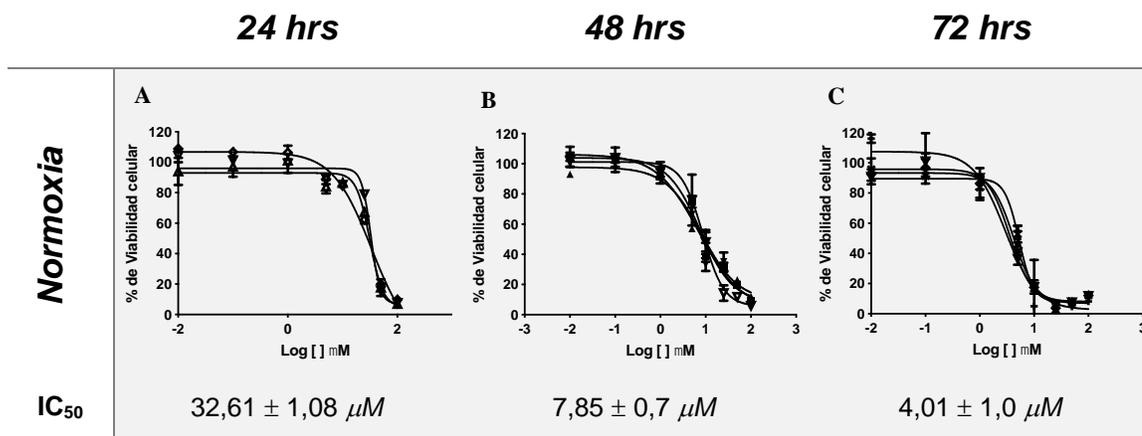
Figura 19 se observa que disminuye el IC<sub>50</sub> a medida que aumenta el tiempo de acción del compuesto.



**Figura. 19.** Efecto citotóxico de Gálico-TPP+C10 sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H1299 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto Gálico-TPP+C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (**A y D**), a 48 hrs (**B y E**) y 72 hrs (**C y F**). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub> ± SD.

## Línea celular Fibroblastos Pulmonares

Nuestra línea celular de control también fue sensible al efecto de Gálico-TPP<sup>+</sup>C10, ya que hubo disminución de la viabilidad celular, la cual fue dependiente de la concentración y el tiempo (Figura 20).



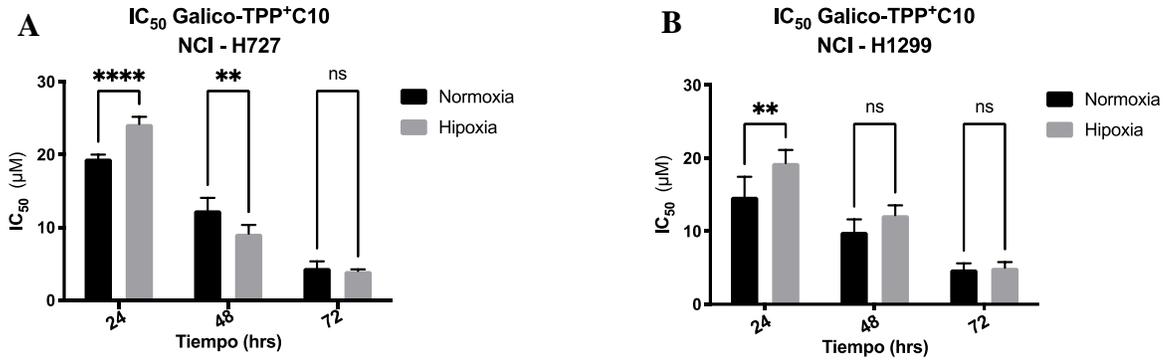
**Figura. 20.** Efecto citotóxico de Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 sobre cultivos monocapa en línea celular de fibroblastos pulmonares en condiciones de normoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (A), a 48 hrs (B) y 72 hrs (C). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub> ± SD.

A continuación, en la tabla 8 se muestra un resumen de los valores obtenidos:

	NCI H - 727		NCI H - 1299		Fibroblastos
	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia
	IC <sub>50</sub> [μM]				
24 hrs	19,46 ± 0,54	24,22 ± 0,98	14,73 ± 2,73	19,36 ± 1,77	32,61 ± 1,08
48 hrs	12,37 ± 1,69	9,16 ± 1,21	9,94 ± 1,69	12,22 ± 1,33	7,85 ± 0,70
72 hrs	4,47 ± 0,90	4,04 ± 0,22	4,80 ± 0,82	5,02 ± 0,78	4,01 ± 1,00

**Tabla 6.** Promedio de IC<sub>50</sub> a 24, 48 y 72 hrs en línea celulares NCI-H727, NCI-H1299 y Fibroblastos pulmonares para el compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10.

Se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías en los promedios de IC<sub>50</sub> de las líneas celulares NCI-H727 y NCI-H1299 (Figura 21).

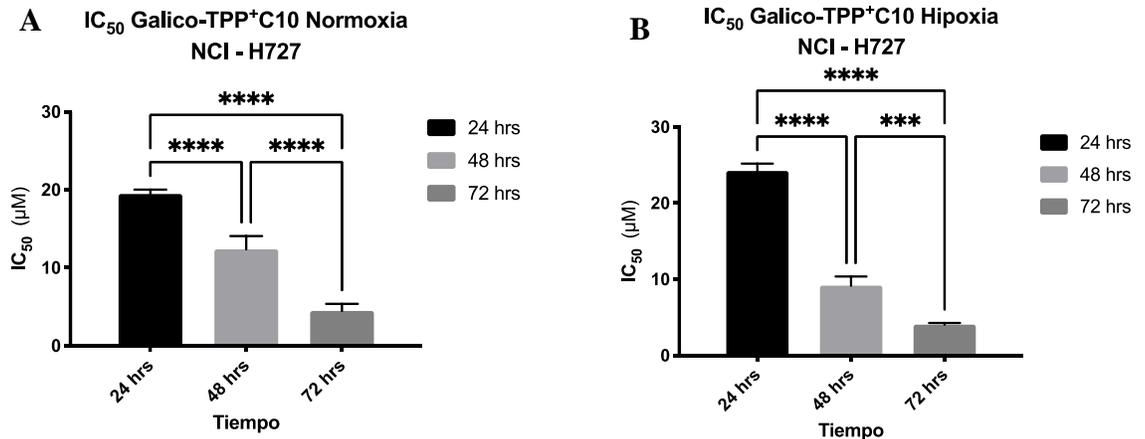


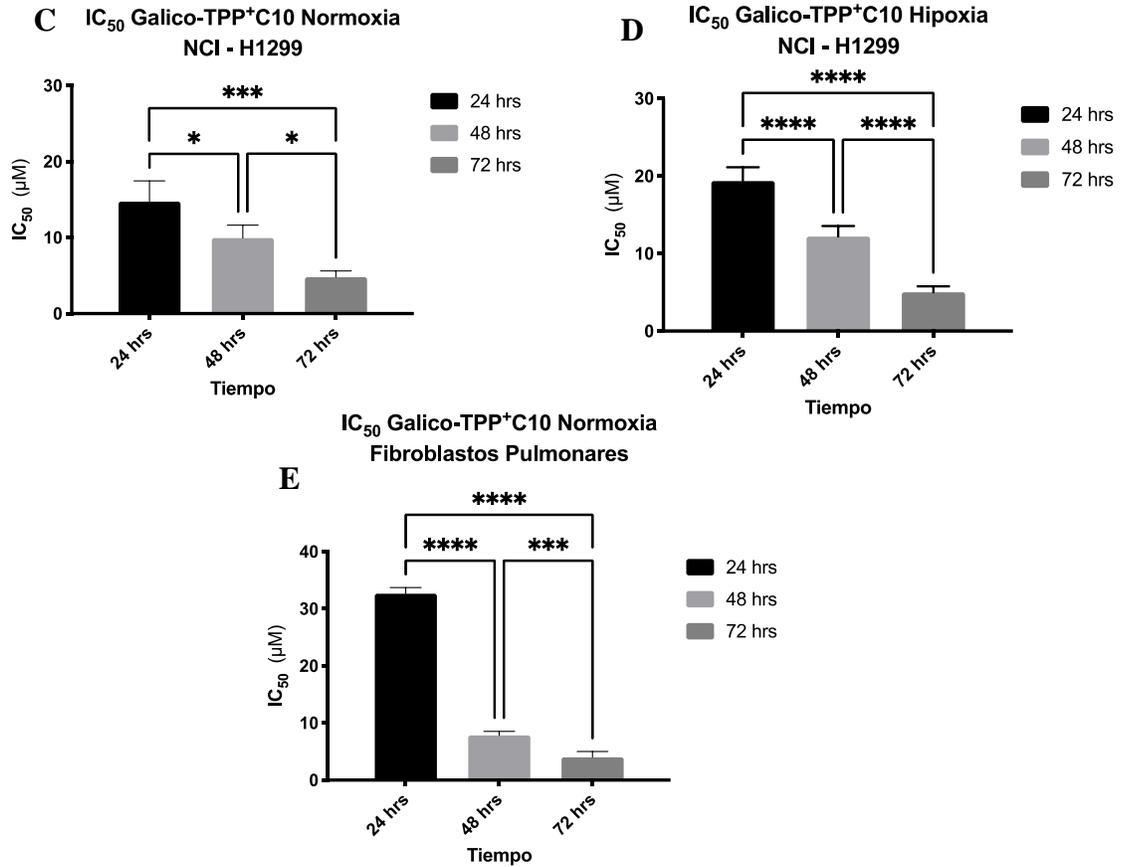
**Figura 21.** Comparación de  $IC_{50}$  entre normoxia e hipoxia por tiempo con compuesto Gálico-TPP+C10. **A)** Línea celular NCI-H727. **B)** Línea celular NCI-H1299.

De acuerdo al análisis estadístico representado en la *Figura 21*, a las 24 h de incubación del compuesto, el  $IC_{50}$  fue mayor en condiciones de hipoxia en ambas líneas celulares tumorales ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Al comparar los promedios de  $IC_{50}$  obtenidos, en la *Figura 22 A, B, C y D* se observa que a medida que aumenta el tiempo de incubación, la concentración necesaria para inhibir en un 50% la viabilidad celular, disminuye de manera significativa, en las líneas celulares NCI-H727 y NCI-H1299 en condiciones de normoxia e hipoxia ( $IC_{50} 24 h > IC_{50} 48 h > IC_{50} 72 h$ ) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

En la *Figura 22 E*, también existió diferencia estadísticamente significativa de los  $IC_{50}$  entre los tiempos 24, 48 y 72 h en la línea celular de fibroblastos pulmonares en normoxia ( $IC_{50} 24 h > IC_{50} 48 h > IC_{50} 72 h$ ) ( $p < 0,05$ , ANOVA).



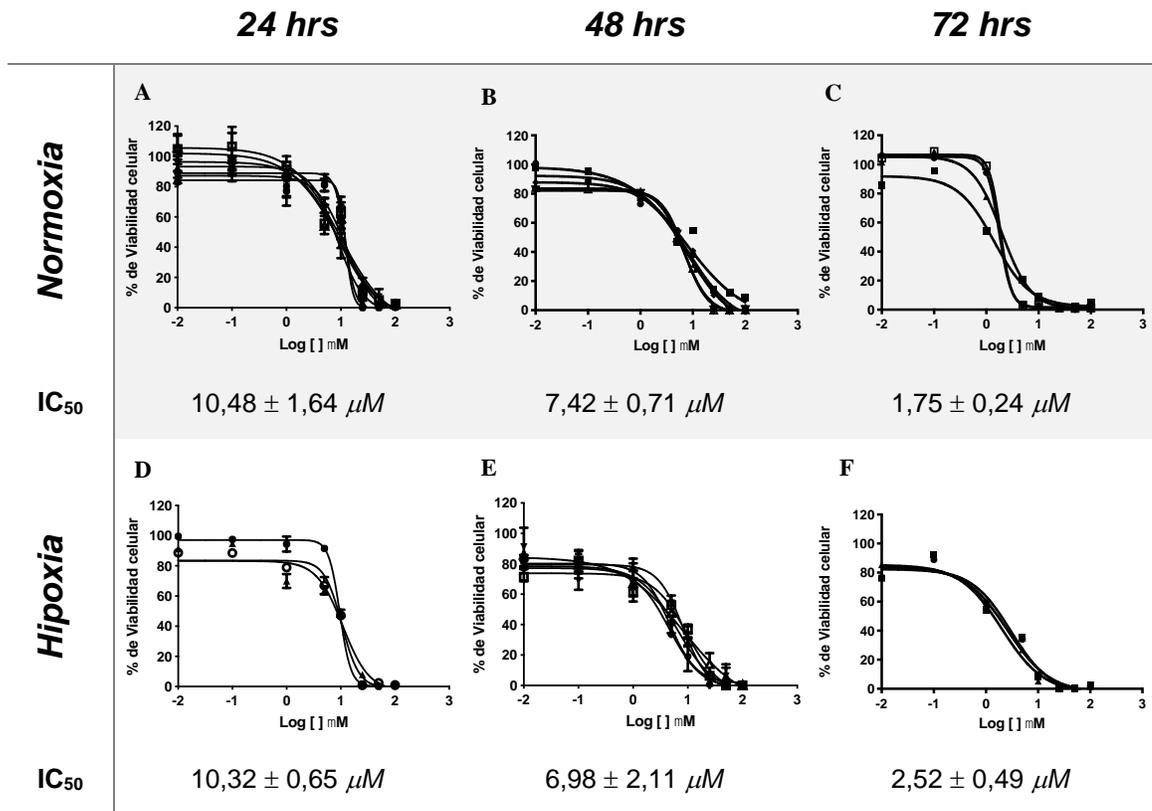


**Figura 22.** Comparación de  $IC_{50}$  entre tiempos de 24, 48 y 72 h con compuesto Gálico-TPP+C10 en líneas celulares NCI-H727, NCI-H1299 y fibroblastos pulmonares. **A)** y **B)** Línea celular NCI-H727 en cultivo de normoxia e hipoxia respectivamente. **C)** y **D)** Línea celular NCI-H1299 en cultivo de normoxia e hipoxia respectivamente. **E)** Línea celular de fibroblastos pulmonares en cultivo de normoxia.

## b. Gentísico TPP<sup>+</sup> C10

### Línea celular NCI – H727

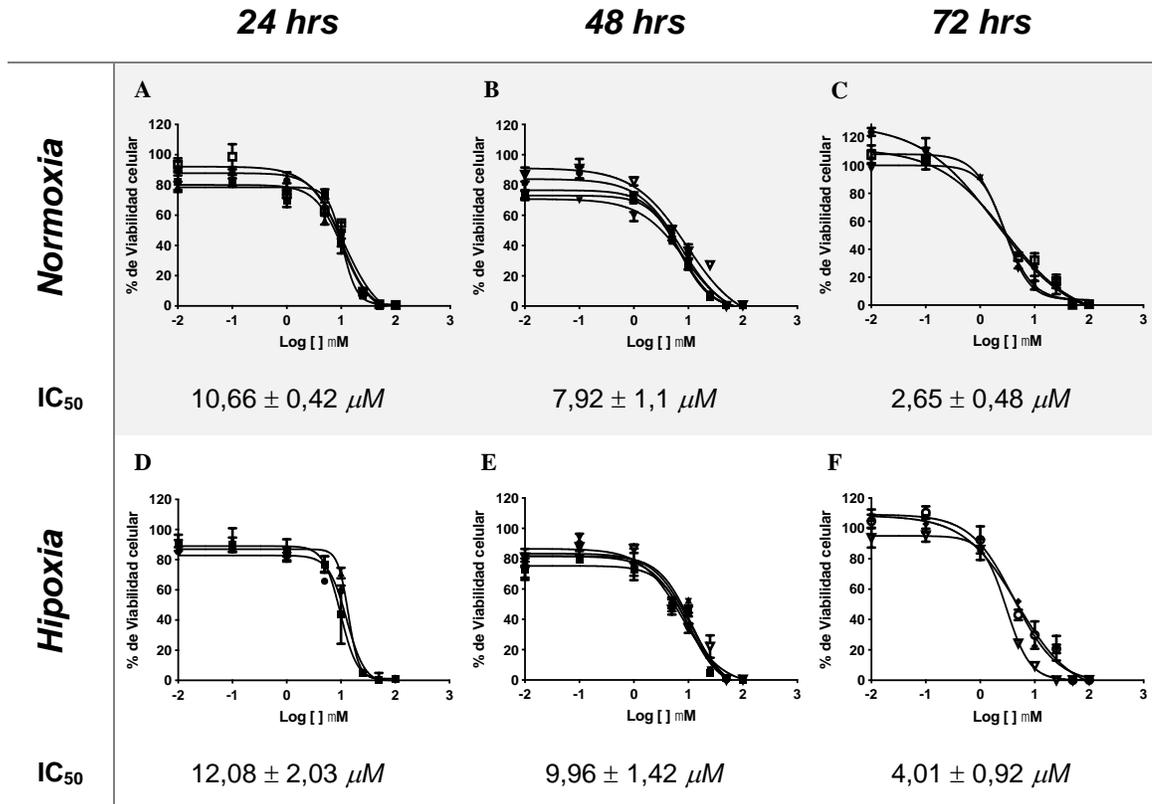
En las curvas sigmoideas de la *Figura 23*, se observa una disminución de la viabilidad celular que es dependiente de la concentración y el tiempo al cual actúa el compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 en condiciones de normoxia e hipoxia, lo que nos indica un efecto citotóxico de este compuesto. Además, la viabilidad celular llegó a un 0% con la máxima concentración utilizada (100  $\mu$ M).



**Figura. 23.** Efecto citotóxico de Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H727 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (A y D), a 48 hrs (B y E) y 72 hrs (C y F). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub> ± SD.

## Línea celular NCI – H1299

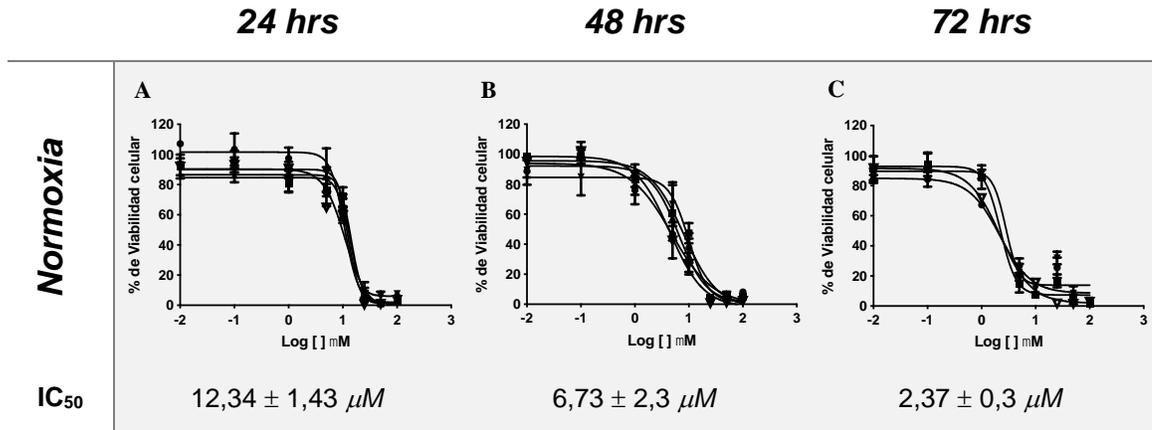
Al igual que la línea celular anterior, el compuesto tiene el mismo comportamiento citotóxico que es dependiente de la concentración llegando a un 0% de viabilidad celular con la máxima concentración utilizada ( $100\mu\text{M}$ ), además en la *Figura 24* se observa que disminuye el  $\text{IC}_{50}$  a medida que aumenta el tiempo de acción del compuesto.



**Figura. 24.** Efecto citotóxico de Gentisico-TPP<sup>+</sup>C10 sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H1299 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto Gentisico-TPP<sup>+</sup>C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (**A y D**), a 48 hrs (**B y E**) y 72 hrs (**C y F**). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del  $\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ .

## Línea celular Fibroblastos Pulmonares

Nuestra línea celular de control también fue sensible al efecto de Gentísico-TPP+C10, ya que hubo disminución de la viabilidad celular, la cual fue dependiente de la concentración y el tiempo (*Figura 25*).



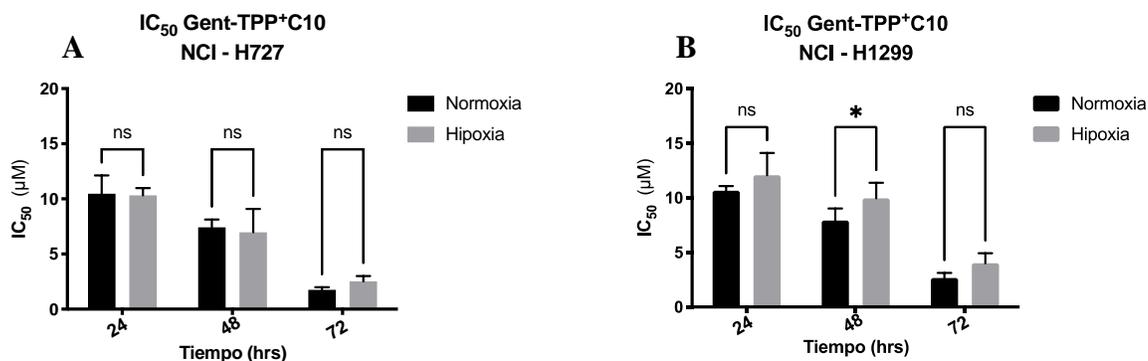
**Figura. 25.** Efecto citotóxico de Gentísico-TPP+C10 sobre cultivos monocapa en línea celular fibroblastos pulmonares en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto Gentísico-TPP+C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (A), a 48 hrs (B) y 72 hrs (C). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del  $IC_{50} \pm SD$ .

A continuación, en la tabla 9 se muestra un resumen de los valores obtenidos:

	NCI H - 727		NCI H - 1299		Fibroblastos
	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia
	IC <sub>50</sub> [μM]				
24 hrs	10,48 ± 1,64	10,32 ± 0,65	10,66 ± 0,42	12,08 ± 2,03	12,34 ± 1,43
48 hrs	7,42 ± 0,71	6,98 ± 2,11	7,92 ± 1,10	9,96 ± 1,42	6,73 ± 2,30
72 hrs	1,75 ± 0,24	2,52 ± 0,49	2,65 ± 0,48	4,01 ± 0,92	2,37 ± 0,30

**Tabla 7.** Promedio de  $IC_{50}$  a 24, 48 y 72 hrs en líneas celulares NCI-H727, NCI-H1299 y Fibroblastos pulmonares para el compuesto Gentísico-TPP+C10.

En el análisis estadístico representado en la *Figura 26*, a las 48 h de incubación del compuesto, el IC<sub>50</sub> fue mayor en condiciones de hipoxia en la línea celular NCI-H1299 ( $p < 0,05$ , ANOVA).

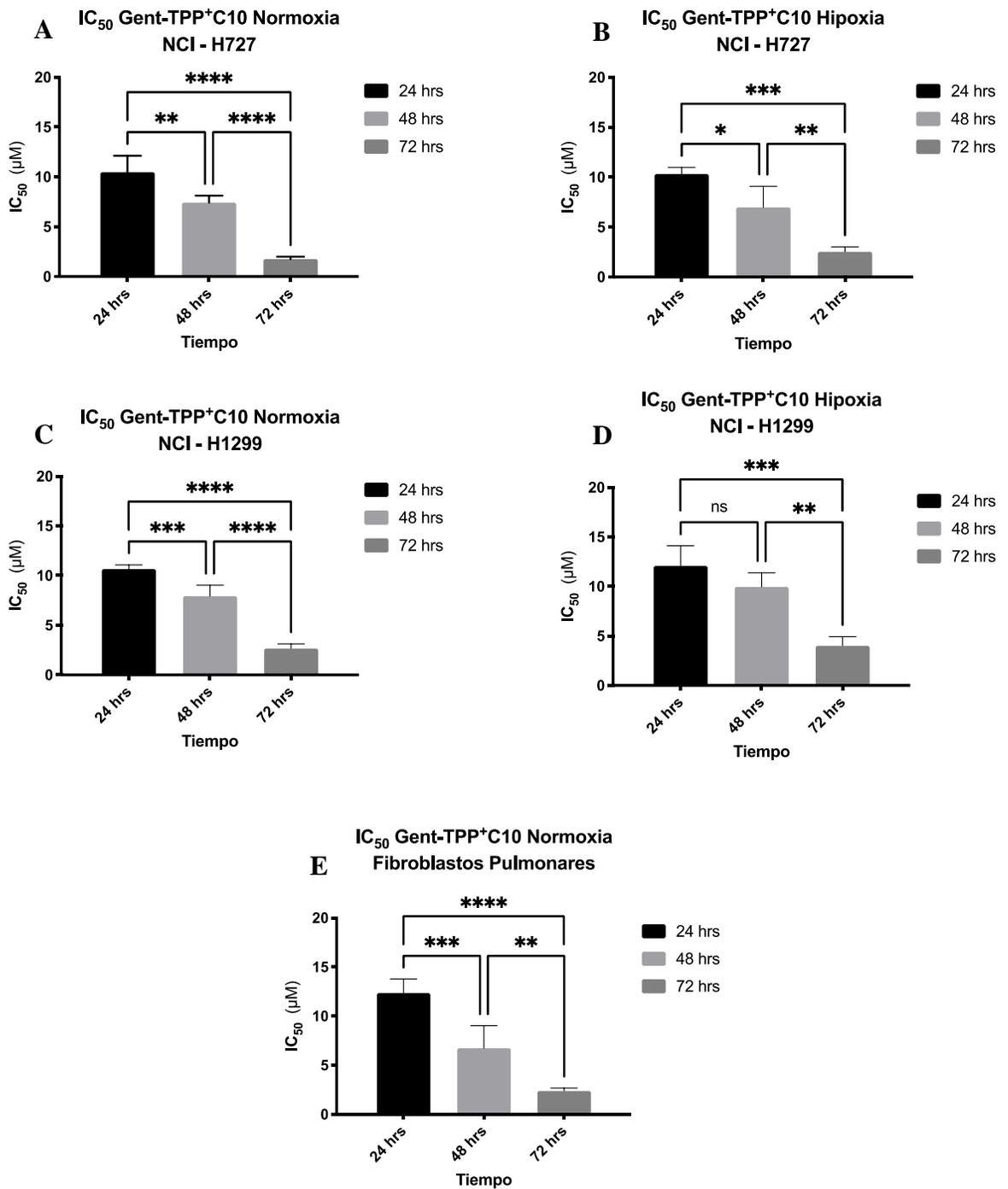


**Figura 26.** Comparación de IC<sub>50</sub> entre normoxia e hipoxia con compuesto Gentísico-TPP+C10. **A)** Línea celular NCI-H727. **B)** Línea celular NCI-H1299.

Al comparar los IC<sub>50</sub> promedios obtenidos para cada línea celular y tiempo, se puede observar que existen diferencias significativas en la línea celular NCI-H727 en cultivo de normoxia e hipoxia en 24 vs. 48 h; 24 vs. 72 h y 48 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) (*Figura 27 A y B*) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

En la *Figura 27 C y D*, que representa la línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia e hipoxia respectivamente: se observan diferencias estadísticamente significativas en 24 vs. 48 h; 24 vs. 72 h y 48 vs. 72 h en cultivos de normoxia (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h), mientras que en cultivos de hipoxia se observan diferencias estadísticamente significativas en 48 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) y 24 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 72 h) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

En los fibroblastos pulmonares se observan diferencias estadísticamente significativas en la comparación de 24 vs. 48 h; 24 vs. 72 h y 48 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) (*Figura 27 E*) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

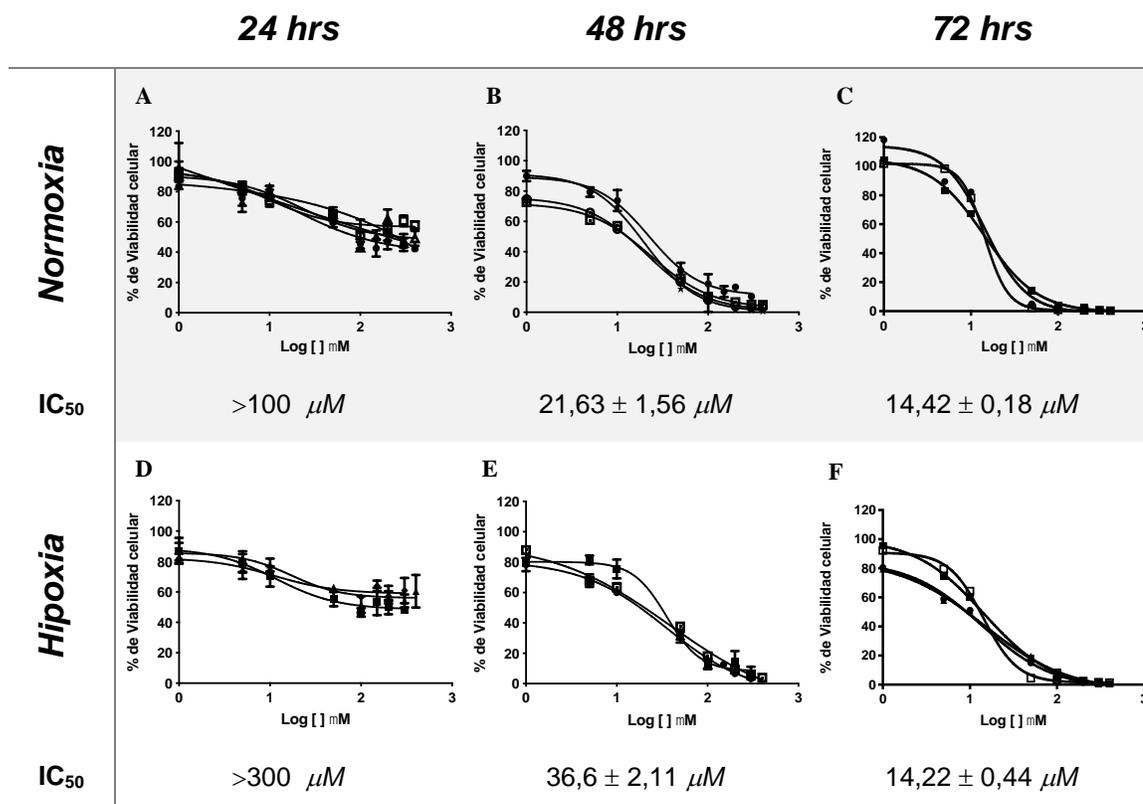


**Figura 27.** Comparación de  $IC_{50}$  entre tiempos de 24, 48 y 72 h con compuesto Gentísico-TPP+C10 en líneas celulares NCI-H727, NCI-H1299 y fibroblastos pulmonares. **A)** y **B)** Línea celular NCI-H727 en cultivo de normoxia e hipoxia respectivamente. **C)** y **D)** Línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia e hipoxia respectivamente. **E)** La línea celular de fibroblastos pulmonares en cultivo de normoxia.

### c. Doxiciclina

#### Línea celular NCI – H727

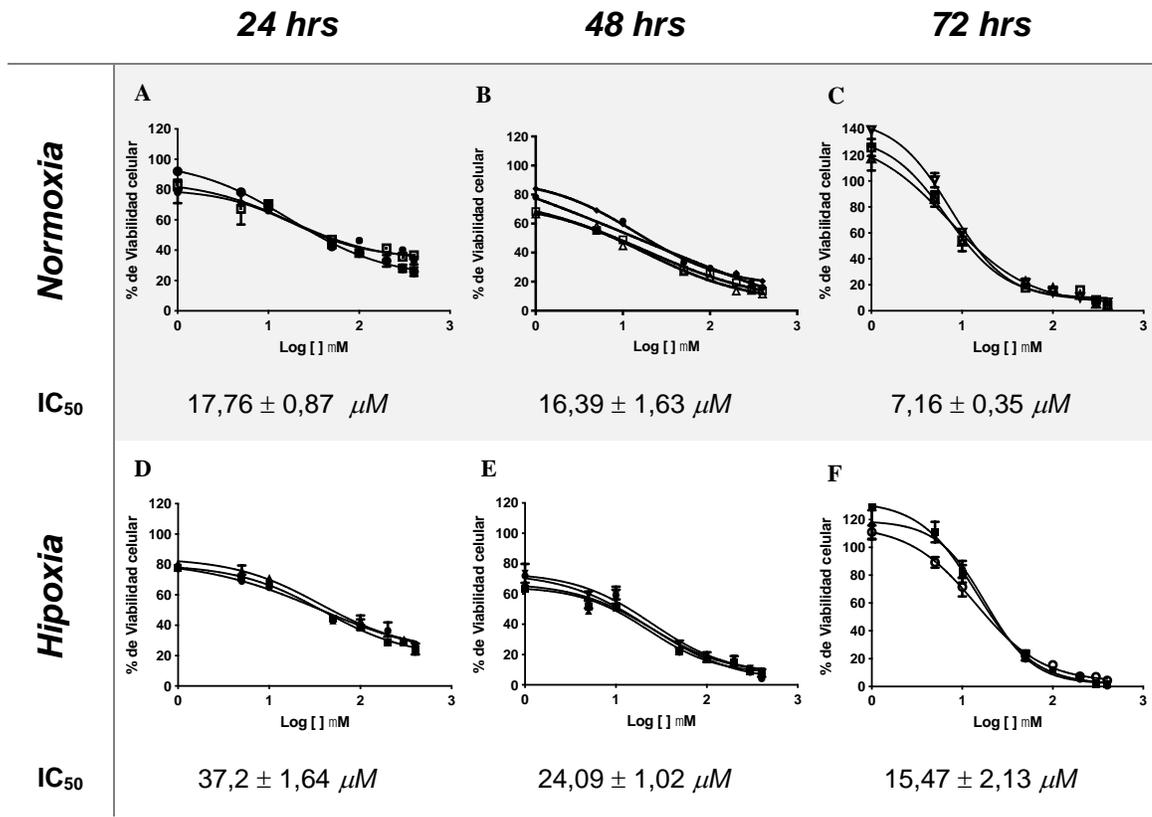
Como se puede observar en las curvas dosis respuesta obtenidas para cada condición evaluada (*Figura 28*), existe un efecto citotóxico dependiente de la concentración de doxiciclina en esta línea celular. Además, se puede observar que, a las 72 h de incubación, el fármaco es capaz de inhibir la viabilidad a valores cercanos al 100% con la concentración más alta ensayada ( $400\mu\text{M}$ ).



**Figura. 28.** Efecto citotóxico de doxiciclina sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H727 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto doxiciclina sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (**A y D**), a 48 hrs (**B y E**) y 72 hrs (**C y F**). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del  $\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ .

## Línea celular NCI – H1299

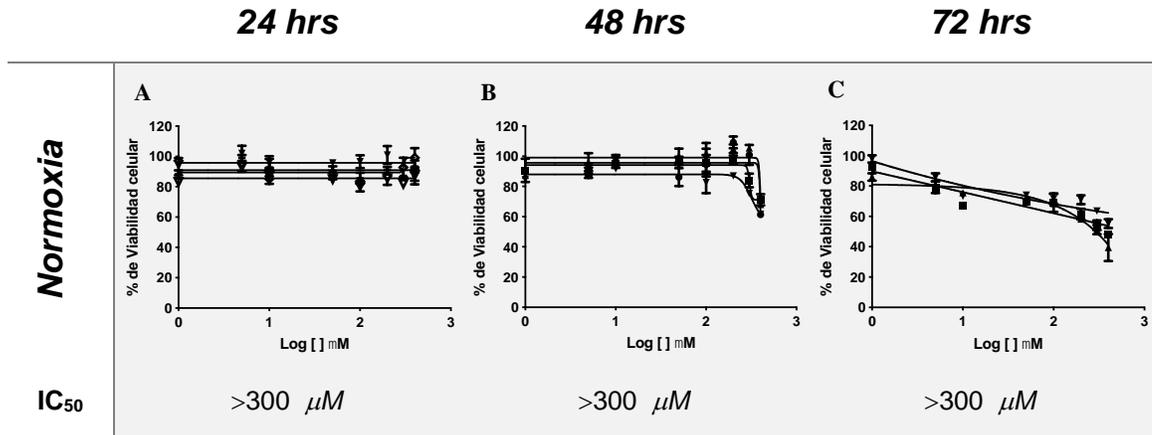
Al igual que la línea celular anterior, doxiciclina tiene el mismo comportamiento citotóxico dependiente de la concentración y del tiempo. Además, en la *Figura 29* se observa que disminuye el IC<sub>50</sub> a medida que aumenta el tiempo de acción del compuesto.



**Figura. 29.** Efecto citotóxico de doxiciclina sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H1299 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto doxiciclina sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (A y D), a 48 hrs (B y E) y 72 hrs (C y F). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub> ± SD.

## Línea celular Fibroblastos Pulmonares

Interesantemente, para el cultivo de fibroblastos, no fue posible obtener un IC<sub>50</sub> incluso a la concentración más alta ensayada, independientemente del tiempo de incubación (>400  $\mu$ M, *Figura 30*) en tiempos de 24 y 48 h, mientras que a 72 h existió un efecto citotóxico leve, llegando a un porcentaje de viabilidad celular de alrededor de un 50% con la máxima concentración utilizada (400  $\mu$ M).



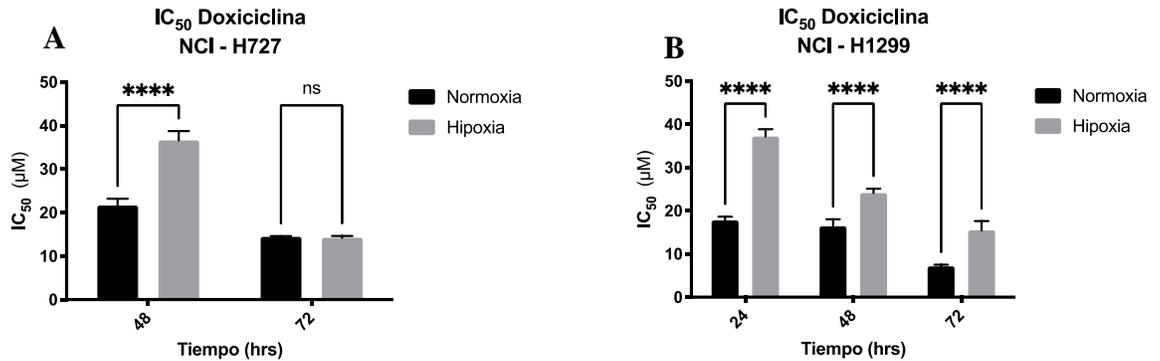
**Figura. 30.** Efecto citotóxico de doxiciclina sobre cultivos monocapa en línea celular de fibroblastos pulmonares en condiciones de normoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto doxiciclina sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (A), a 48 hrs (B) y 72 hrs (C). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub>  $\pm$  SD.

A continuación, en la tabla 10 se muestra un resumen de los valores obtenidos:

	NCI H - 727		NCI H - 1299		Fibroblastos
	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia
	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]				
24 hrs	>100	>300	17,76 $\pm$ 0,87	37,20 $\pm$ 1,64	>300
48 hrs	21,63 $\pm$ 1,56	36,60 $\pm$ 2,11	16,39 $\pm$ 1,63	24,09 $\pm$ 1,02	>300
72 hrs	14,42 $\pm$ 0,18	14,22 $\pm$ 0,44	7,16 $\pm$ 0,35	15,47 $\pm$ 2,13	>300

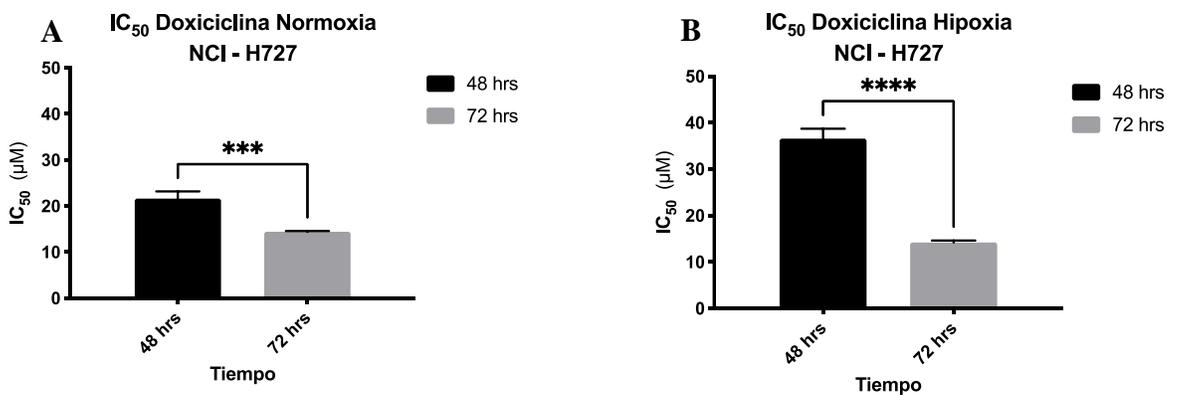
**Tabla 8.** Promedio de IC<sub>50</sub> a 24, 48 y 72 hrs en línea celulares NCI-H727, NCI-H1299 y Fibroblastos pulmonares para el compuesto doxiciclina.

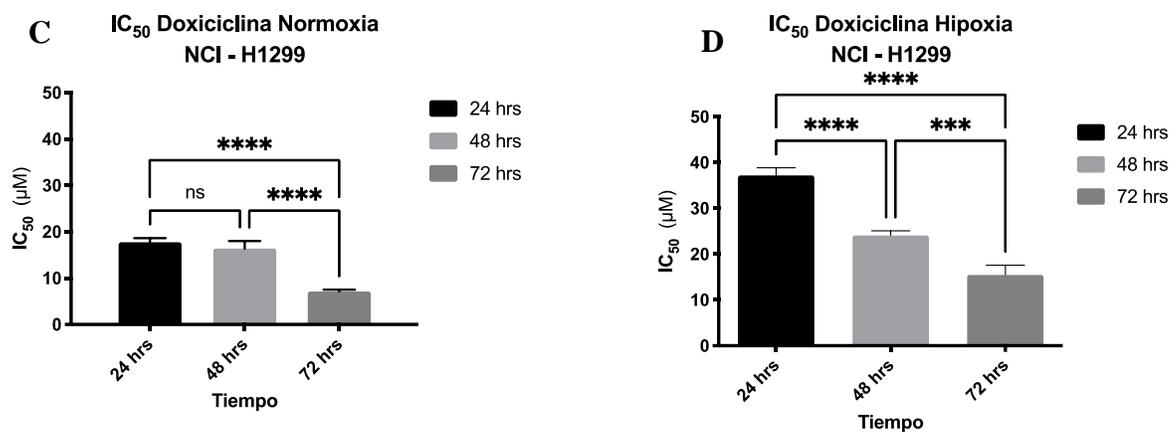
En el análisis estadístico representado en la *Figura 31 A*, a las 48 h de incubación del compuesto, el IC<sub>50</sub> fue mayor en condiciones de hipoxia en la línea celular NCI-H727 ( $p < 0,05$ , T-test). Mientras que en la línea celular NCI-H1299 (*Figura 31 B*) el IC<sub>50</sub> fue mayor en hipoxia a las 24, 48 y 72 h ( $p < 0,05$ , ANOVA).



**Figura 31.** Comparación de IC<sub>50</sub> entre normoxia e hipoxia con compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10. **A)** Línea celular NCI-H727. **B)** Línea celular NCI-H1299.

Al comparar los IC<sub>50</sub> promedios obtenidos para cada línea celular y tiempo, se puede observar que existen diferencias significativas en la línea celular NCI-H727 en cultivo de normoxia e hipoxia en 48 vs. 72 h siendo el IC<sub>50</sub> de 48 h mayor que el de 72 h (*Figura 32 A y B*) ( $p < 0,05$ , T-test). Mientras que en la *Figura 32 C*, la línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia se observan diferencias estadísticamente significativas en 24 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 72 h) y 48 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h), por otro lado, en la *Figura 32 D* en cultivos de hipoxia se observan diferencias estadísticamente significativas en 24 vs. 48 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h); 48 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) y 24 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 72 h) ( $p < 0,05$ , ANOVA).



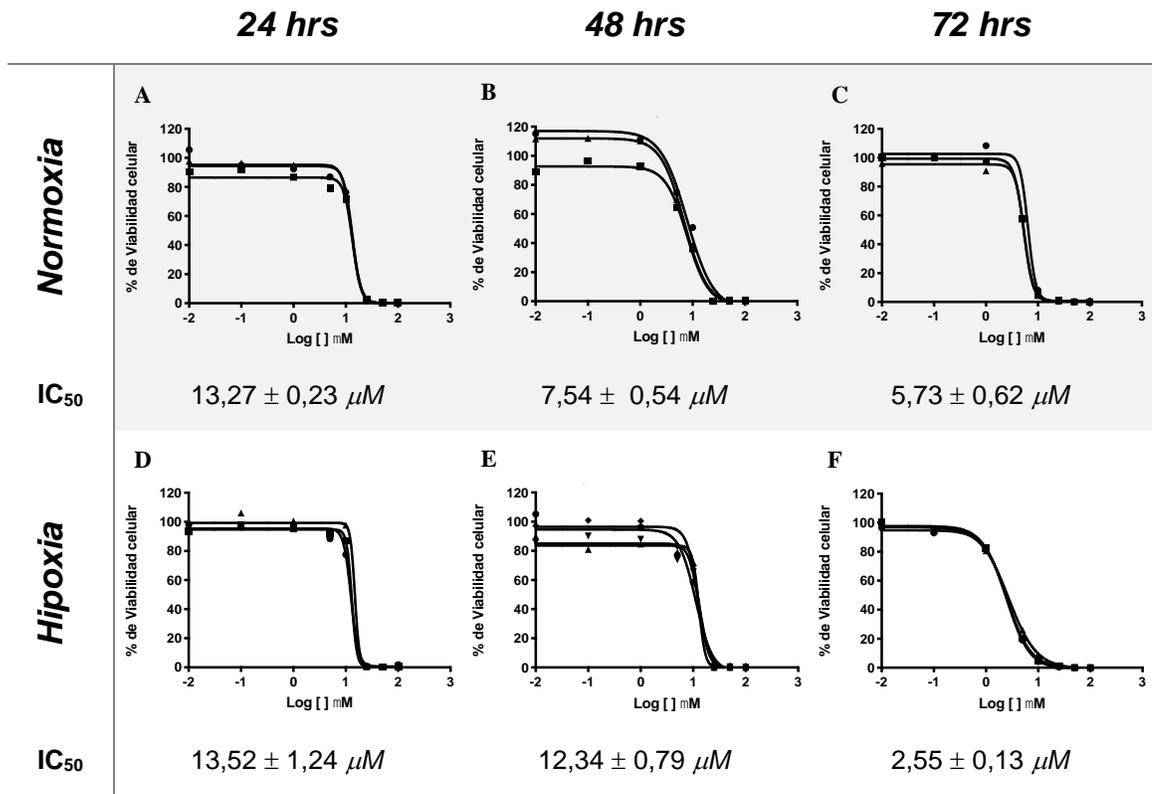


**Figura 32.** Comparación de IC<sub>50</sub> entre tiempos de 24, 48 y 72 h con compuesto doxyciclina en líneas celulares NCI-H727 y NCI-H1299. **A)** y **B)** Línea celular NCI-H727 en cultivo de normoxia e hipoxia respectivamente. **C)** y **D)** Línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia e hipoxia respectivamente.

#### d. 2,3 diOH TPP<sup>+</sup> C10

#### Línea celular NCI – H727

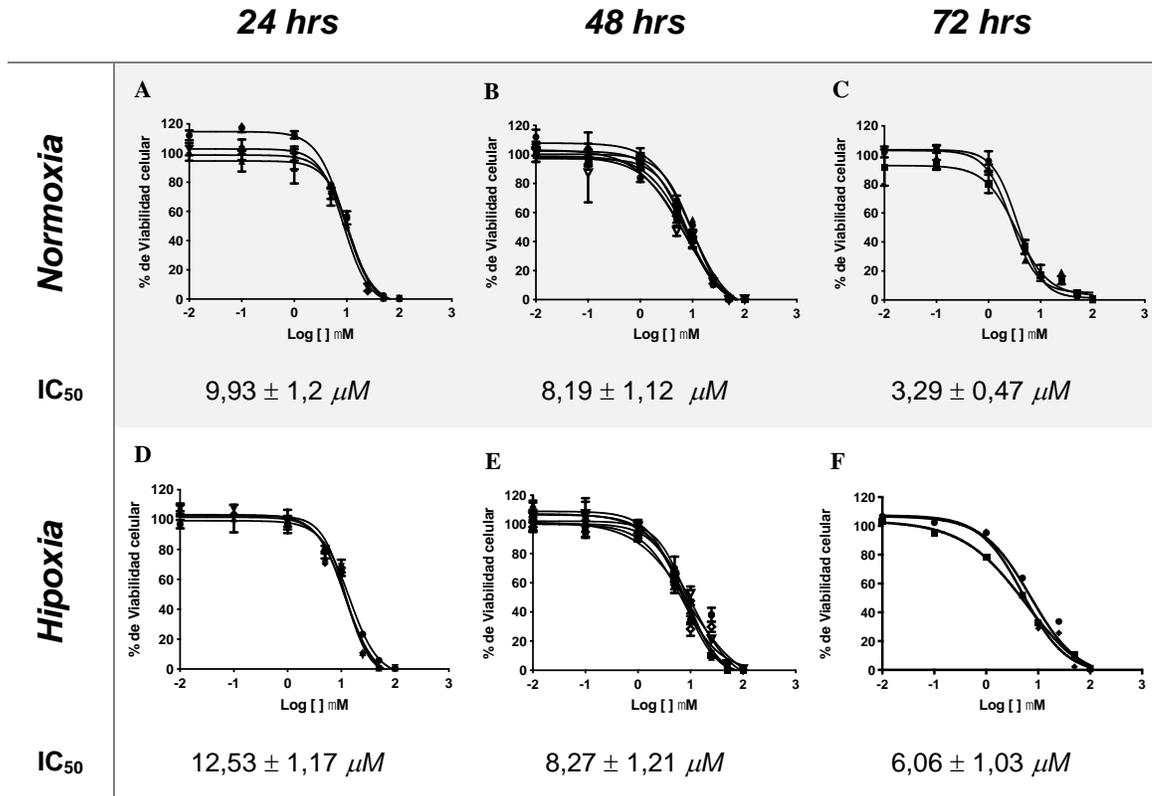
En las curvas sigmoideas de la *Figura 33*, se observa una disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo y de la concentración ensayada en condiciones de normoxia e hipoxia, lo que indica un efecto citotóxico del compuesto 2,3 diOH TPP<sup>+</sup>C10. Además, la viabilidad celular llegó a un 0% con la máxima concentración ensayada (100  $\mu$ M) (*Figura 33*).



**Figura. 33.** Efecto citotóxico de 2,3 diOH-TPP<sup>+</sup>C10 sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H727 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto 2,3 diOH-TPP<sup>+</sup>C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (**A y D**), a 48 hrs (**B y E**) y 72 hrs (**C y F**). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub> ± SD.

## Línea celular NCI – H1299

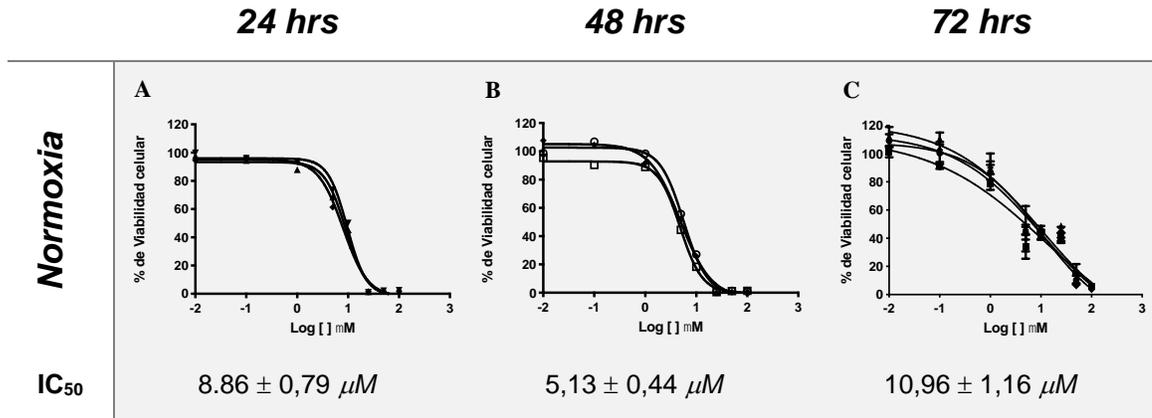
Así como sucedió con la línea celular anterior, el compuesto 2,3 diOH TPP+C10 tiene un efecto citotóxico sobre esta línea celular representado por la disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo y de la concentración a la cual fue ensayado el compuesto. Se observa una viabilidad celular del 0% con la máxima concentración utilizada (100 $\mu$ M) (Figura 34).



**Figura. 34.** Efecto citotóxico de 2,3 diOH-TPP+C10 sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H1299 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto 2,3 diOH-TPP+C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (A y D), a 48 hrs (B y E) y 72 hrs (C y F). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub> ± SD.

## Línea celular Fibroblastos Pulmonares

Nuestra línea celular de control también fue sensible al efecto citotóxico de 2,3 diOH TPP<sup>+</sup>C10, ya que hubo disminución de la viabilidad celular, la cual fue dependiente de la concentración y el tiempo (*Figura 35*).



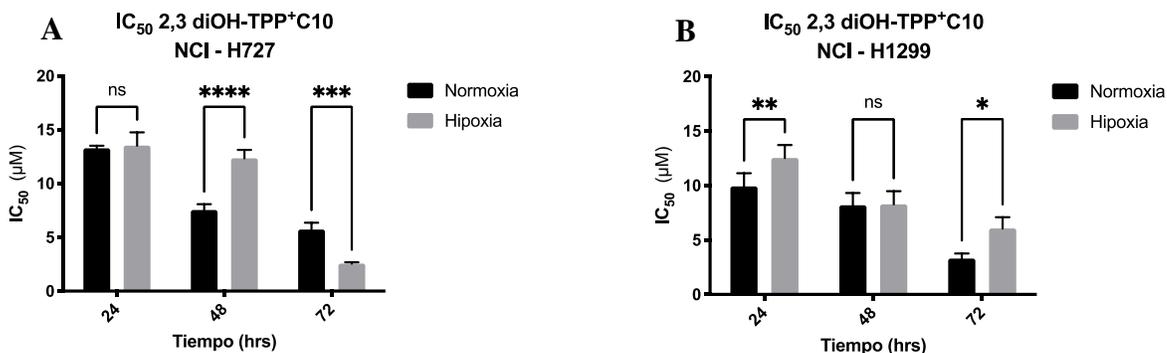
**Figura 35.** Efecto citotóxico de 2,3 diOH-TPP<sup>+</sup>C10 sobre cultivos monocapa en línea celular de fibroblastos pulmonares en condiciones de normoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto 2,3 diOH-TPP<sup>+</sup>C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (**A**), a 48 hrs (**B**) y 72 hrs (**C**). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del  $IC_{50} \pm SD$ .

A continuación, en la tabla 11 se muestra un resumen de los valores obtenidos:

	NCI H - 727		NCI H - 1299		Fibroblastos
	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia
	IC <sub>50</sub> [μM]				
24 hrs	13,27 ± 0,23	13,52 ± 1,24	9,93 ± 1,20	12,53 ± 1,17	8,86 ± 0,79
48 hrs	7,54 ± 0,54	12,34 ± 0,79	8,19 ± 1,12	8,27 ± 1,21	5,13 ± 0,44
72 hrs	5,73 ± 0,62	2,55 ± 0,13	3,29 ± 0,47	6,06 ± 1,03	10,96 ± 1,16

**Tabla 9.** Promedio de  $IC_{50}$  a 24, 48 y 72 hrs en línea celulares NCI-H727, NCI-H1299 y Fibroblastos pulmonares para el compuesto 2,3 diOH-TPP<sup>+</sup>C10.

En el análisis estadístico que se realizó representado en la *Figura 36*, a las 48 h de incubación del compuesto, el IC<sub>50</sub> fue mayor en condiciones de hipoxia en la línea celular NCI-H727 ( $p < 0,05$ , ANOVA). Mientras que en la línea celular NCI-H1299 a las 24 y 72 h el IC<sub>50</sub> fue mayor en condiciones de hipoxia ( $p < 0,05$ , ANOVA).

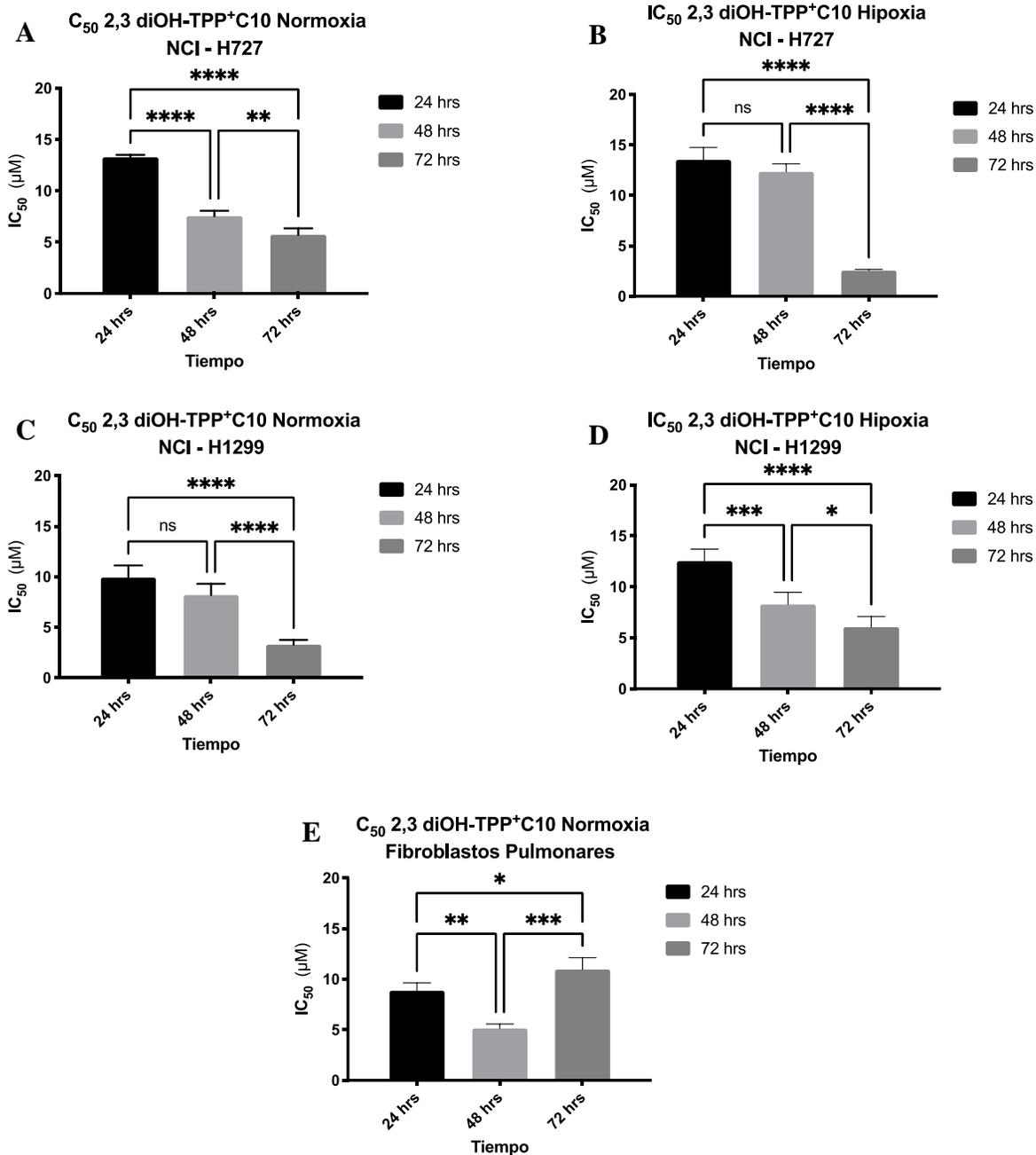


**Figura 36.** Comparación de IC<sub>50</sub> entre normoxia e hipoxia con compuesto 2,3 diOH-TPP+C10. **A)** Línea celular NCI-H727. **B)** Línea celular NCI-H1299.

En la *Figura 37 A y B*, que representa la línea celular NCI-H727 en cultivos de normoxia e hipoxia respectivamente, se observan diferencias estadísticamente significativas en 24 vs. 48 h; 24 vs. 72 h y 48 vs. 72 h en cultivos de normoxia (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h), mientras que en cultivos de hipoxia se observan diferencias estadísticamente significativas en 48 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) y 24 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 72 h) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

En tanto en el análisis estadístico de la línea celular NCI-H1299 representado en la *Figura 37 C y D* se observan diferencias estadísticamente significativas en los IC<sub>50</sub> de 24 h vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 72 h) y 48 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) en cultivos de normoxia, mientras que en cultivos de hipoxia se observan diferencias estadísticamente significativas en 24 vs. 48 horas, 48 vs. 72 horas y 24 vs. 72 horas (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Mientras que en nuestra línea celular de control representado en la *Figura 37 E*, se observan diferencias estadísticamente significativas en los IC<sub>50</sub> al comparar 24 vs. 48 h, 48 vs. 72 h y 24 vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 72 h > IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

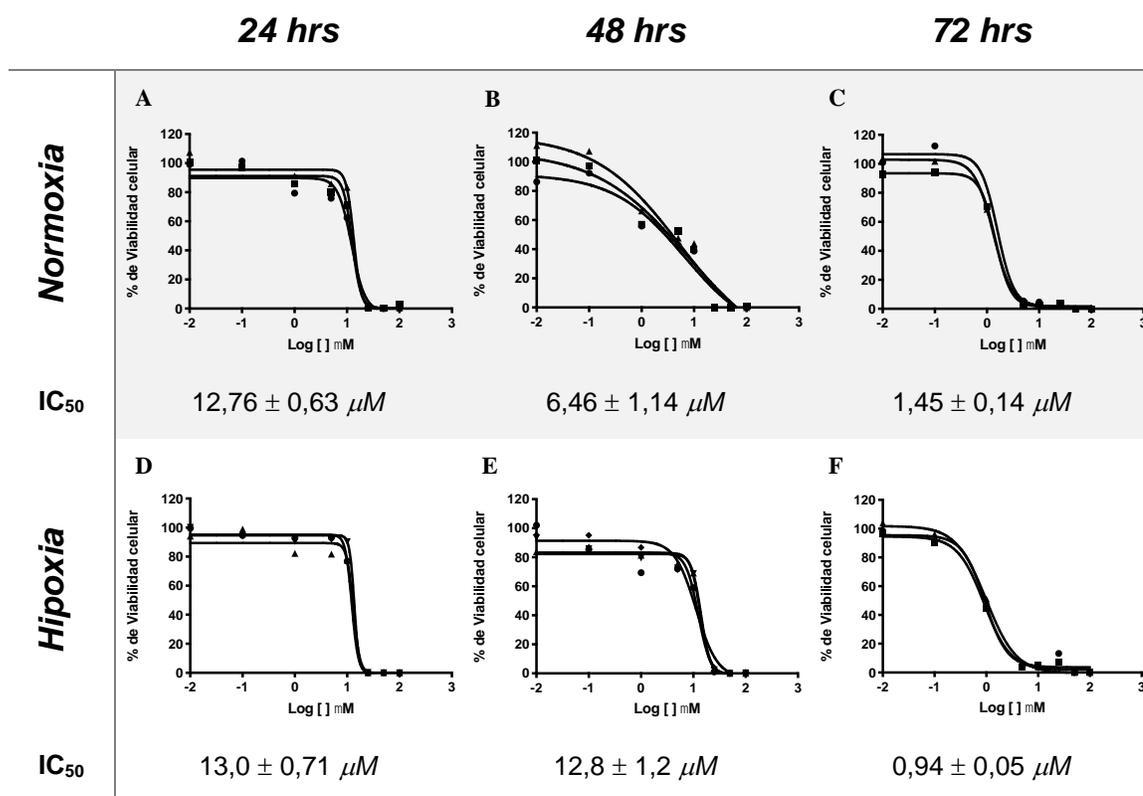


**Figura 37.** Comparación de  $IC_{50}$  entre tiempos de 24, 48 y 72 h con compuesto 2,3 diOH-TPP+C10 en líneas celulares NCI-H727, NCI-H1299 y fibroblastos pulmonares. **A)** y **B)** Línea celular NCI-H727 en cultivo de normoxia e hipoxia respectivamente. **C)** y **D)** Línea celular NCI-H1299 en cultivo de normoxia e hipoxia respectivamente. **E)** Fibroblastos pulmonares en cultivo de normoxia.

## e. 2 OH TPP<sup>+</sup> C10

### Línea celular NCI – H727

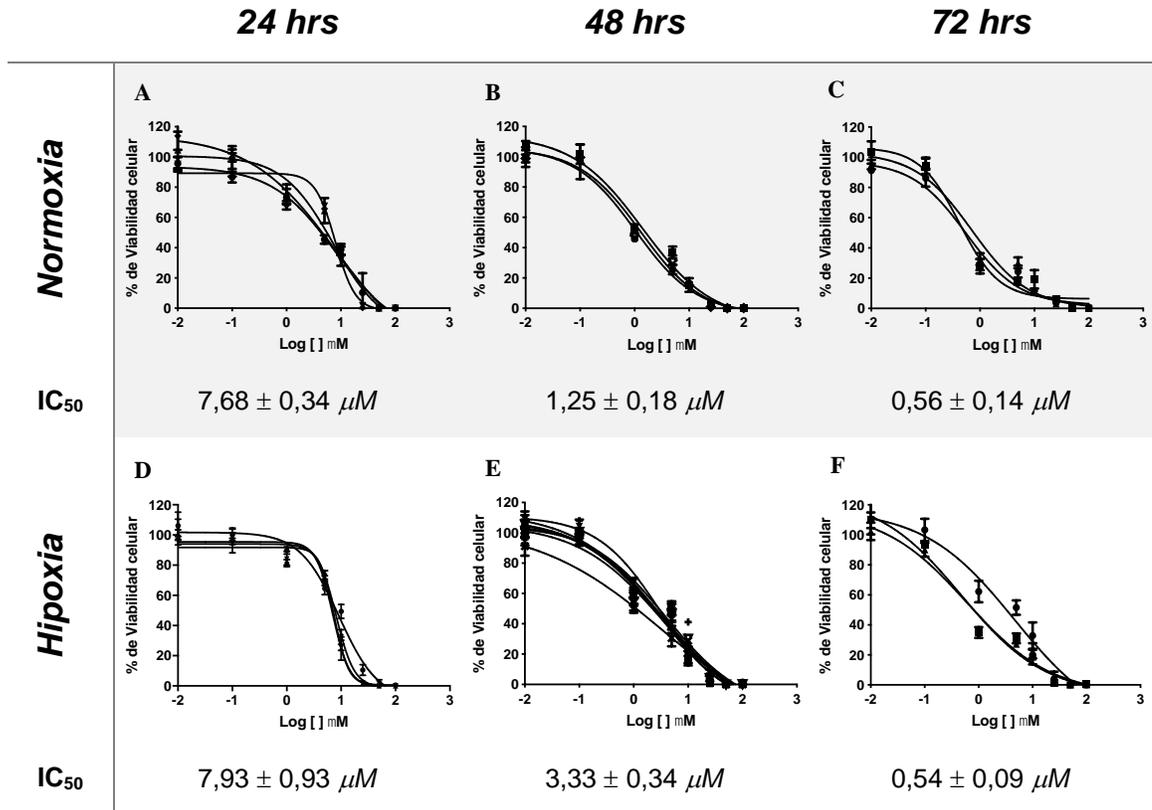
En las curvas sigmoideas representadas en la *Figura 38*, se observa disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración y el tiempo al cual actúa el compuesto 2 OH-TPP<sup>+</sup>C10 en cultivos de normoxia e hipoxia. Se alcanzó un efecto citotóxico del 100% con la mayor concentración utilizada (100 μM) de este compuesto.



**Figura 38.** Efecto citotóxico de 2 OH-TPP<sup>+</sup>C10 sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H727 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto 2 OH-TPP<sup>+</sup>C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (**A y D**), a 48 hrs (**B y E**) y 72 hrs (**C y F**). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub> ± SD.

## Línea Celular NCI – H1299

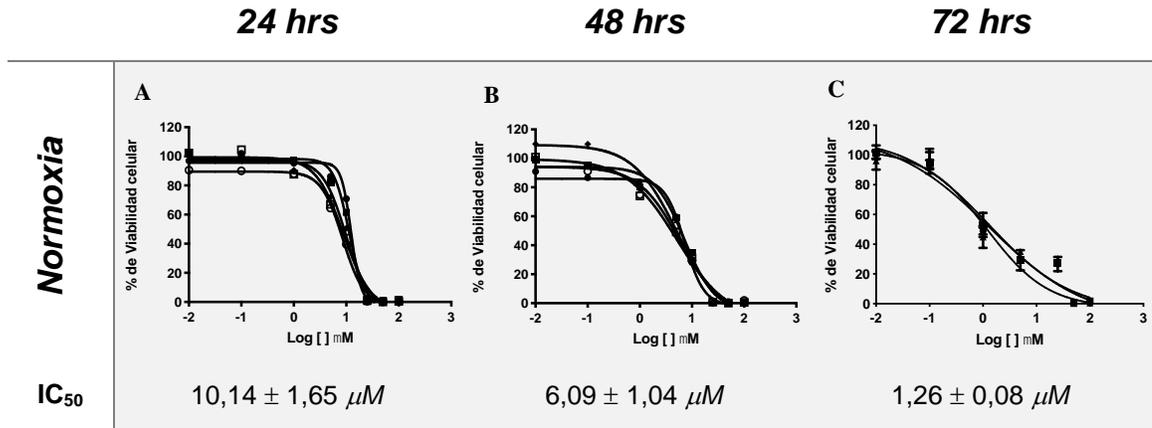
Al igual que la línea celular anterior, el compuesto tiene un efecto sobre la viabilidad celular causando una disminución progresiva a medida que se aumenta la concentración de compuesto y que es dependiente del tiempo. Se alcanza un porcentaje de viabilidad del 0% con la máxima concentración ensayada (*Figura 39*) ( $100\mu\text{M}$ ).



**Figura 39.** Efecto citotóxico de 2 OH-TPP<sup>+</sup>C10 sobre cultivos monocapa en línea celular NCI-H1299 en condiciones de normoxia e hipoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto 2 OH-TPP<sup>+</sup>C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (**A y D**), a 48 hrs (**B y E**) y 72 hrs (**C y F**). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del  $\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ .

## Línea celular Fibroblastos Pulmonares

En nuestra línea celular control representada en la *Figura 40*, también se observa el efecto citotóxico del compuesto dependiente de la concentración y del tiempo al cual fue incubado el compuesto.



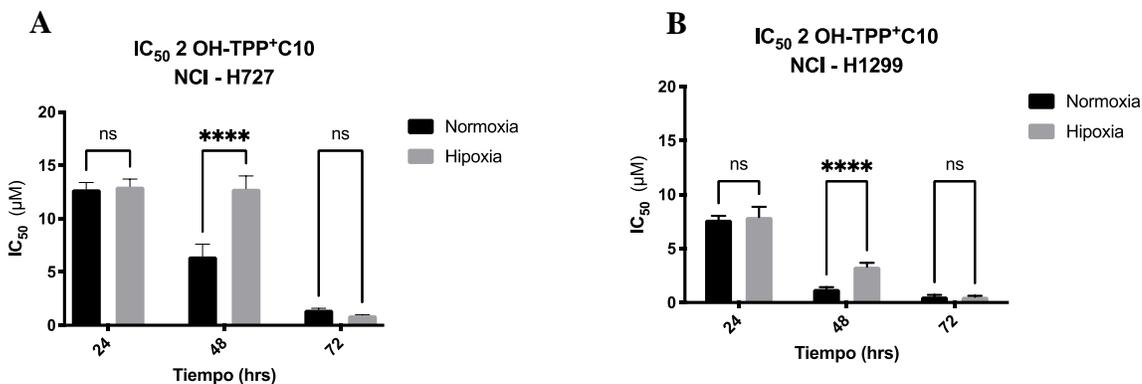
**Figura 40.** Efecto citotóxico de 2 OH-TPP+C10 sobre cultivos monocapa en línea celular de fibroblastos pulmonares en condiciones de normoxia. Representación gráfica del efecto del compuesto 2 OH-TPP+C10 sobre la viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración. Se observa el efecto citotóxico a 24 hrs (A), a 48 hrs (B) y 72 hrs (C). Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los promedios del IC<sub>50</sub> ± SD.

A continuación, en la tabla 12 se muestra un resumen de los valores obtenidos:

	NCI H - 727		NCI H - 1299		Fibroblastos
	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia
	IC <sub>50</sub> [μM]				
24 hrs	12,76 ± 0,63	13,00 ± 0,71	7,68 ± 0,343	7,93 ± 0,93	10,14 ± 1,65
48 hrs	6,46 ± 1,14	12,80 ± 1,20	1,25 ± 0,183	3,33 ± 0,34	6,09 ± 1,04
72 hrs	1,45 ± 0,14	0,94 ± 0,05	0,56 ± 0,145	0,54 ± 0,09	1,26 ± 0,08

**Tabla 10.** Promedio de IC<sub>50</sub> a 24, 48 y 72 h en línea celulares NCI-H727, NCI-H1299 y Fibroblastos pulmonares para el compuesto 2 OH-TPP+C10.

En el análisis estadístico que se realizó, representado en la *Figura 41*, a las 48 h de incubación del compuesto, el IC<sub>50</sub> fue mayor en condiciones de hipoxia en ambas líneas celulares ( $p < 0,05$ , ANOVA).

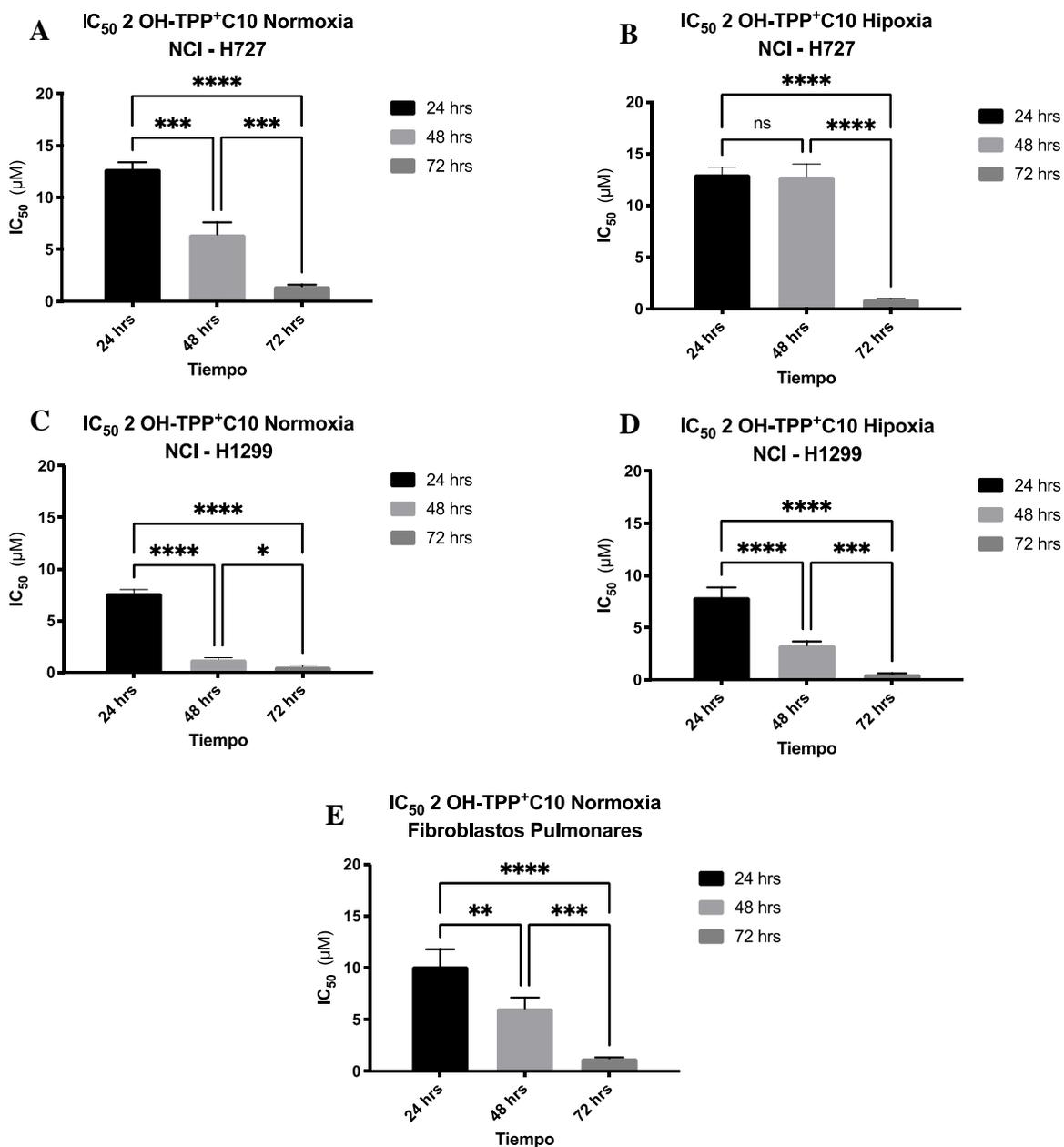


**Figura 41.** Comparación de IC<sub>50</sub> entre normoxia e hipoxia con compuesto 2 OH-TPP+C10. **A)** Línea celular NCI-H727. **B)** Línea celular NCI-H1299.

Al comparar los promedios de IC<sub>50</sub> obtenidos, en la *Figura 42 A* se observa que a medida que aumenta el tiempo de incubación, la concentración necesaria para inhibir en un 50% la viabilidad celular, disminuye de manera significativa, en la línea NCI-H727 en condiciones de normoxia (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) ( $p < 0,05$ , ANOVA). Mientras que esta disminución fue significativa al comparar 24 h vs. 72 h (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 72 h) y 48 h vs. 72h (IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) en los cultivos de hipoxia de esta misma línea celular ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Por otro lado, en la *Figura 42 C y D*, se observa la disminución del IC<sub>50</sub> a medida que aumenta el tiempo, y que estas diferencias fueron significativas en la línea celular NCI H1299 en cultivos de normoxia e hipoxia (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

En cuanto a los fibroblastos pulmonares representados en la *Figura 42 E*, también se observó diferencias estadísticamente significativas en los IC<sub>50</sub> dependientes del tiempo (IC<sub>50</sub> 24 h > IC<sub>50</sub> 48 h > IC<sub>50</sub> 72 h) ( $p < 0,05$ , ANOVA).



**Figura 42.** Comparación de  $IC_{50}$  entre tiempos de 24, 48 y 72 horas con compuesto 2 OH-TPP+C10. **A)** y **B)** Línea celular NCI-H727 en cultivos de normoxia e hipoxia respectivamente. **C)** y **D)** Línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia e hipoxia respectivamente. **E)** Fibroblastos pulmonares.

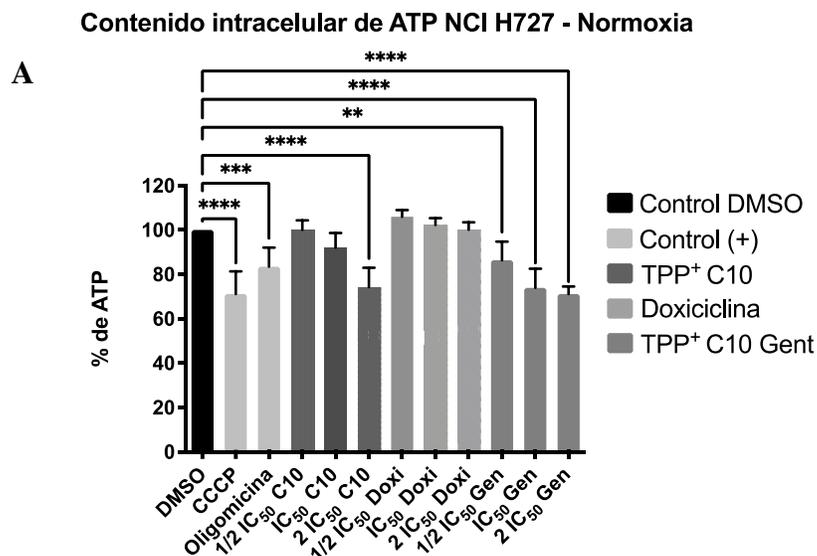
Para los siguientes experimentos (medición de ATP intracelular y medición de potencial de Transmembrana mitocondrial) se ocuparon las concentraciones  $\frac{1}{2} IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , y  $2x IC_{50}$  extraídas de las curvas sigmoideas de los compuestos Gálico-TPP+C10, Gentísico-TPP+C10 y doxiciclina en los tiempos de 72 horas, las cuales se observan en la tabla 5.

### 3) Medición de contenido de ATP intracelular

Como los compuestos alterarían la función mitocondrial, se midió el contenido de ATP intracelular en las líneas NCI-H727 y NCI-H1299 en cultivos de normoxia e hipoxia a través del Kit CellTiter-Glo®. Los resultados se muestran en las siguientes figuras y se expresan en forma de porcentaje de ATP que es equivalente a la intensidad de luminiscencia. Los resultados fueron divididos por línea celular.

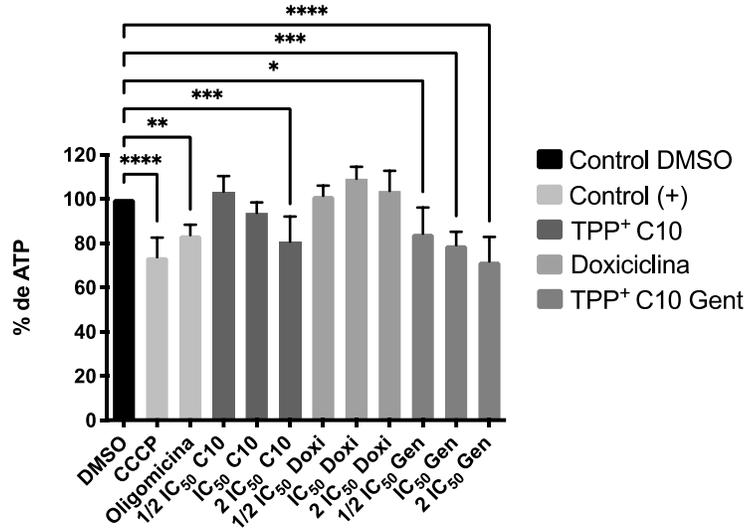
#### Línea celular NCI-H727

En la *Figura 43* se observa una disminución en el porcentaje de ATP que fue significativa para el compuesto Gálico-TPP+C10 en concentración de 2x IC<sub>50</sub> respecto al control DMSO en cultivos de normoxia e hipoxia. Mientras que para el compuesto Gentísico-TPP+C10 se observan diferencias significativas disminuyendo el porcentaje de ATP en concentraciones de ½ IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> y 2x IC<sub>50</sub> respecto a DMSO tanto en normoxia como hipoxia, lo cual nos indica que este compuesto afecta directamente el contenido de ATP intracelular causando una disminución significativa dependiente de la concentración del compuesto (A mayor concentración del compuesto menor porcentaje de ATP intracelular) (p<0,05, ANOVA).



Contenido intracelular de ATP NCI H727 - Hipoxia

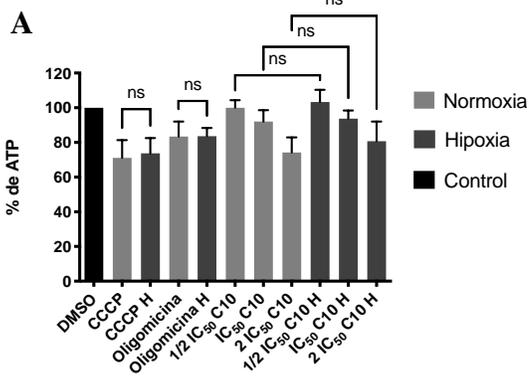
B



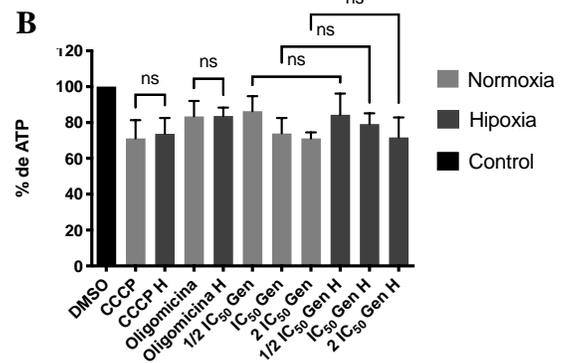
**Figura 43.** Contenido intracelular de ATP en línea NCI-H727. **A)** Cultivo de Normoxia. **B)** Cultivo de hipoxia. Controles de DMSO, CCCP y Oligomicina. N=4. \* P <0,05, \*\* P <0,001 y \*\*\* P <0,0001, ANOVA.

A continuación, en la *Figura 44* se presentan resultados del contenido de ATP intracelular separados por compuestos en la línea celular NCI-H727, realizando una comparación entre normoxia e hipoxia, en la cual se aprecia que bajo nuestro modelo experimental no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la línea celular NCI-H727.

Contenido intracel. de ATP NCI H727 - Normo - Hipo C10

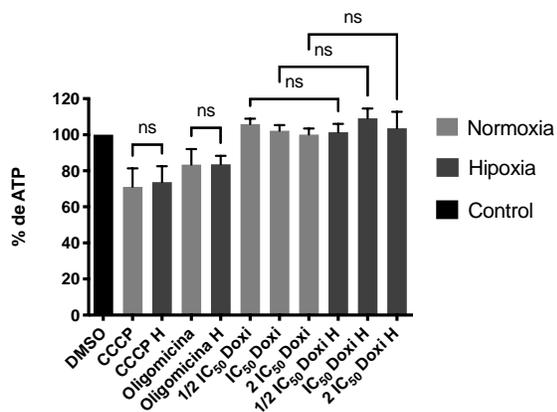


Contenido intracel. de ATP NCI H727 - Normo - Hipo Gent



Contenido intracel. de ATP NCI H727 - Normo - Hipo Doxi

C



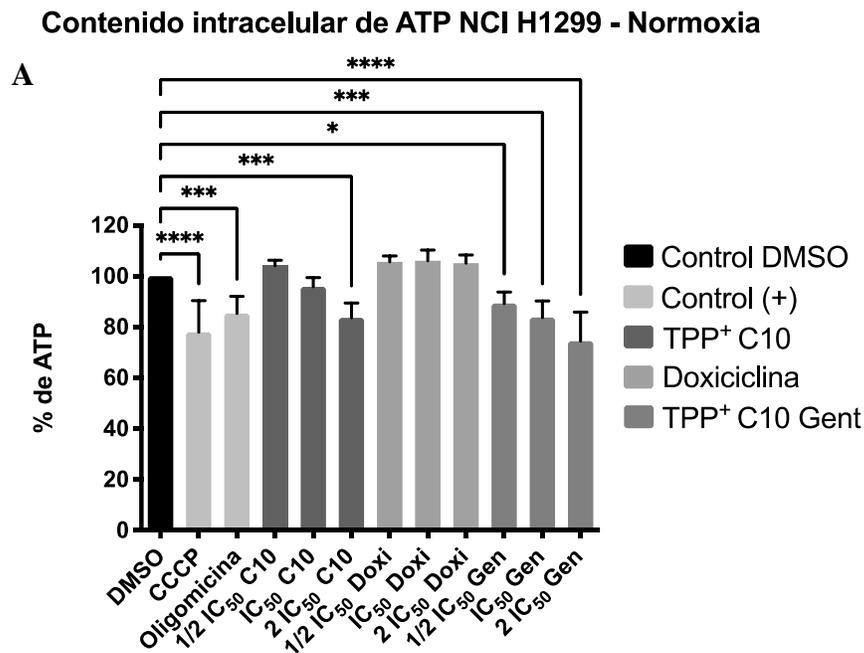
**Figura 44.** Comparación del contenido intracelular de ATP en línea celular NCI-H727 en cultivos de normoxia vs. hipoxia. **A)** Compuesto Gálico-TPP+C10. **B)** Compuesto Gentísico-TPP+C10. **C)** Compuesto doxiciclina. N=4, ANOVA.

## Línea celular NCI-H1299

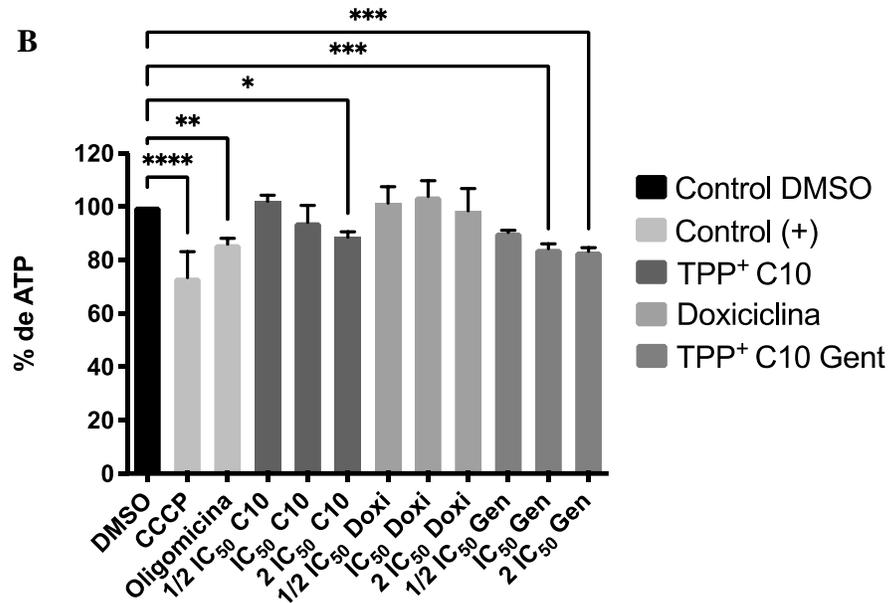
En la *Figura 45*, en nuestro análisis estadístico se observa una disminución significativa para el compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 en concentración de 2x IC<sub>50</sub> respecto al control DMSO en cultivos de normoxia e hipoxia ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Mientras que para el compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 se observan diferencias estadísticamente significativas disminuyendo el porcentaje de ATP intracelular a medida que se aumenta la concentración del compuesto en cultivos normóxicos, mientras que en cultivos hipóxicos hubo disminución significativa a concentraciones de IC<sub>50</sub> y 2x IC<sub>50</sub>, lo cual nos indica que en nuestro modelo experimental el compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 tiene efecto directo sobre el porcentaje de ATP intracelular causando una disminución dependiente de la concentración (*Figura 45*) ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Por otro lado, en el análisis estadístico representado en la *Figura 45*, con el compuesto doxiciclina no se observaron diferencias significativas en ninguna concentración experimentada ( $p < 0,05$ , ANOVA).



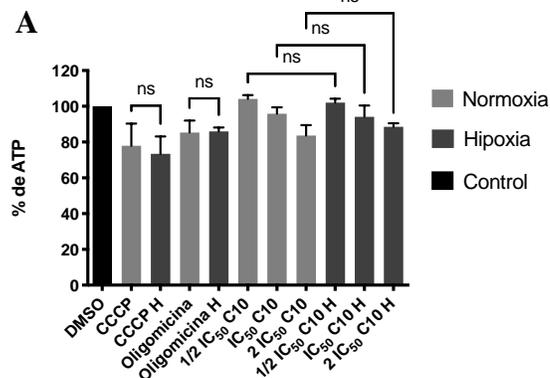
### Contenido intracelular de ATP NCI H1299 - Hipoxia



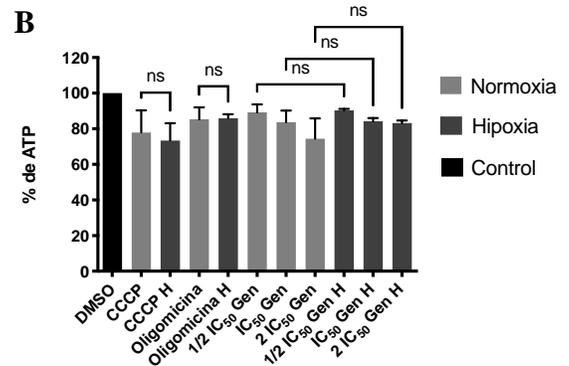
**Figura 45.** Contenido intracelular de ATP en línea NCI-H1299. **A)** Cultivo de Normoxia. **B)** Cultivo de hipoxia. Controles de DMSO, CCCP y Oligomicina. N=4. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ , ANOVA.

A continuación, en la *Figura 46*, se presentan resultados del contenido de ATP intracelular separados por compuestos, realizando una comparación entre normoxia e hipoxia, en la cual no existieron diferencias estadísticas en nuestro modelo experimental.

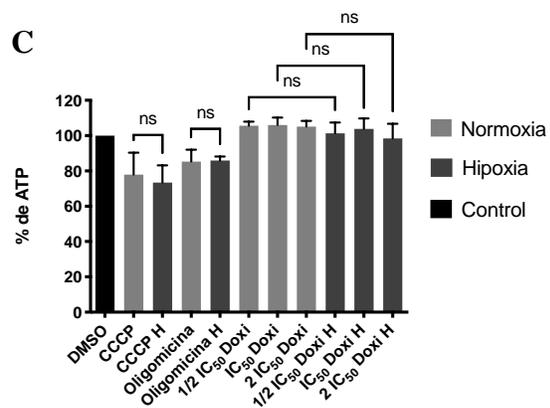
#### Contenido intracel. de ATP NCI H1299 - Normo - Hipo C10



#### Contenido intracel. de ATP NCI H1299 - Normo - Hipo Gen



Contenido intracel. de ATP NCI H1299 - Normo - Hipo Doxi



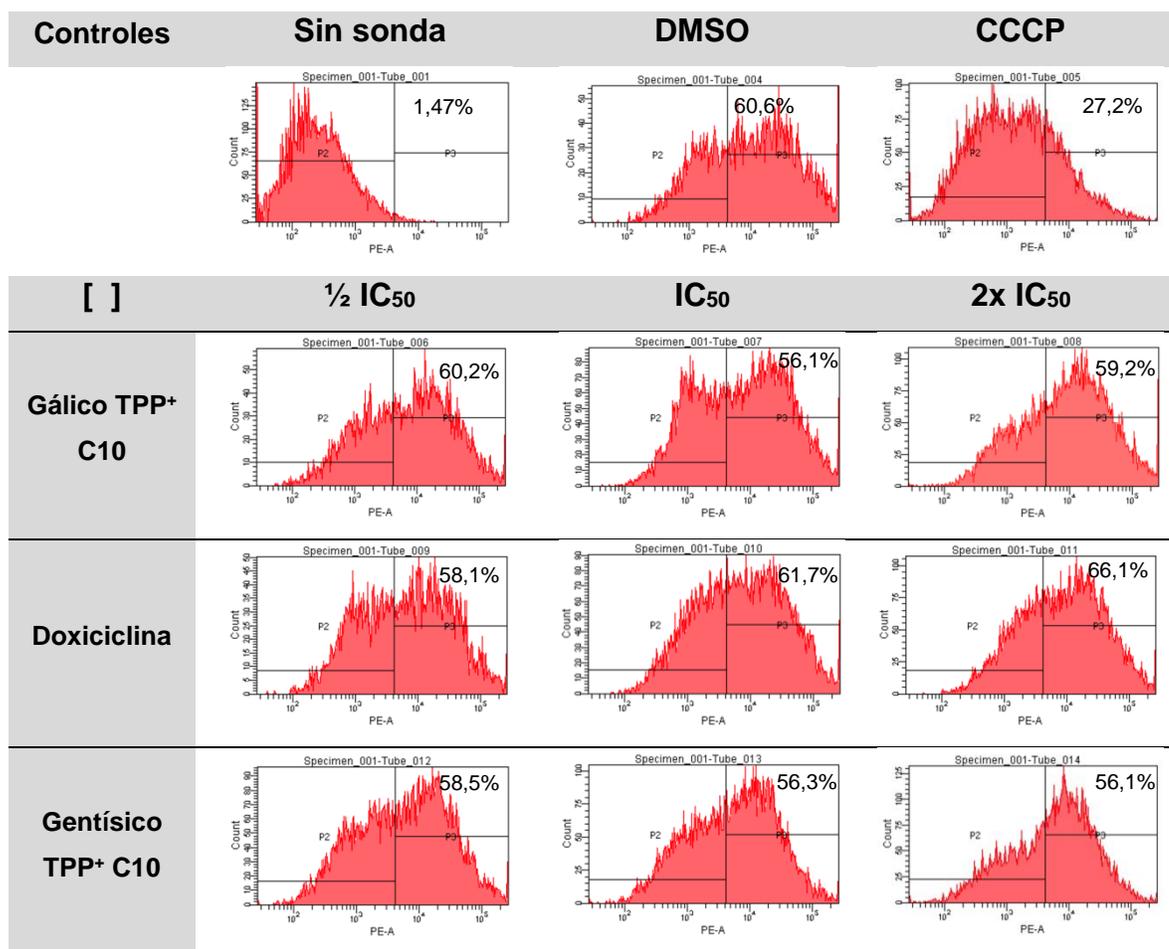
**Figura 46.** Comparación del contenido intracelular de ATP en línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia vs. hipoxia. **A)** Compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10. **B)** Compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10. **C)** Compuesto doxiciclina. N=4, ANOVA.

#### 4) Medición de potencial de transmembrana mitocondrial mediante TMRE

La medición de potencial de transmembrana mitocondrial se realizó con sonda de tetrametilrodamina metil éster y analizado con citometría de flujo. Los resultados fueron divididos por línea celular y subdivididos por cultivos de normoxia e hipoxia, en ellos se muestran las curvas de intensidad del marcador, una menor intensidad del marcador nos indica una disminución del potencial de transmembrana mitocondrial.

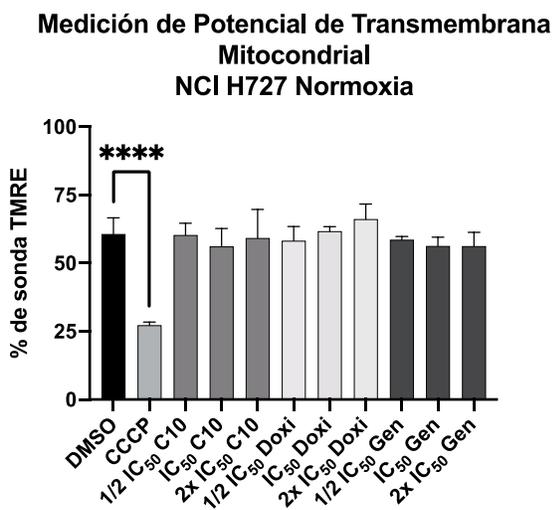
#### Línea celular NCI-H727

#### Normoxia



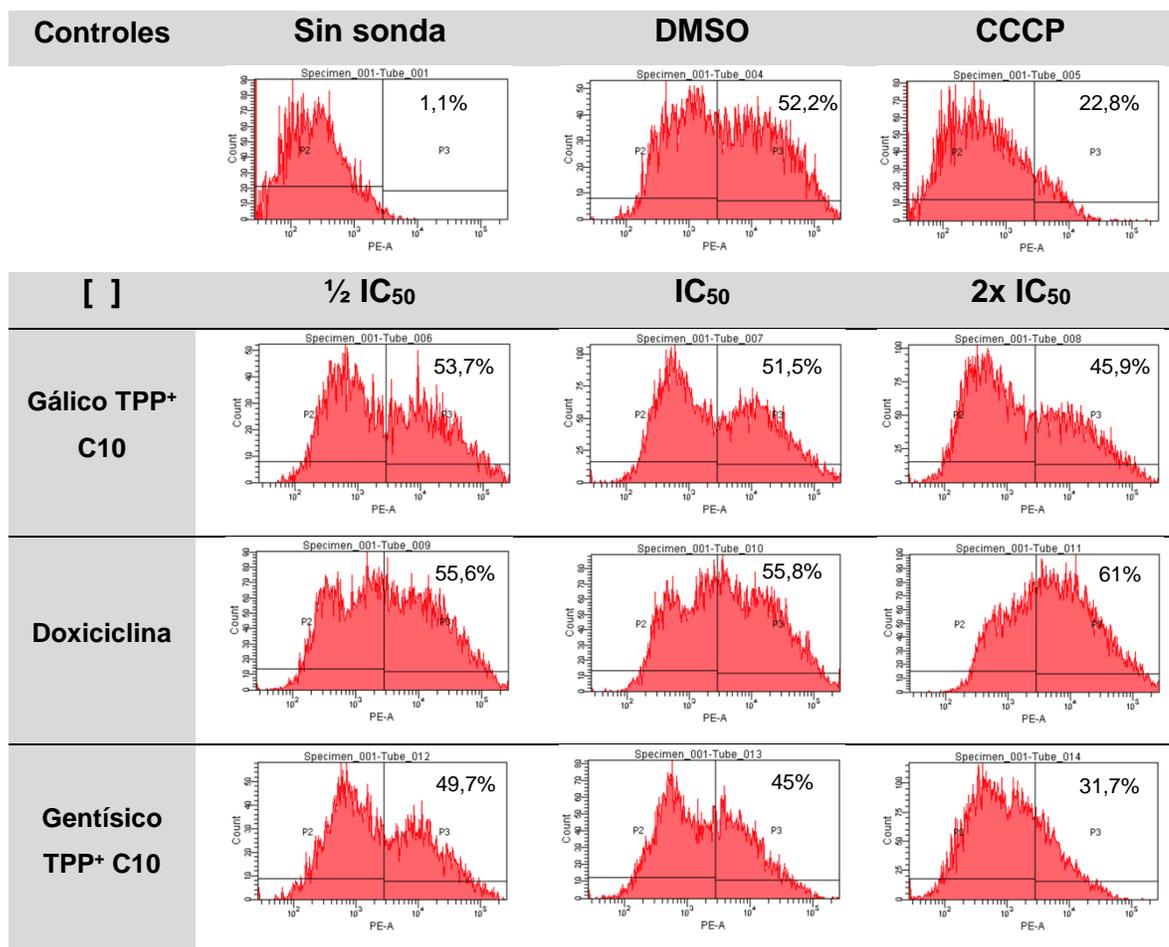
**Figura 47.** Medición de potencial de transmembrana mitocondrial mediante TMRE en línea celular NCI-H727 en cultivos de normoxia. Control negativo de DMSO y control positivo de CCCP.

En el análisis estadístico representado en la *Figura 48*, en los cultivos normóxicos se observa que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la disminución del potencial de transmembrana mitocondrial de los compuestos utilizados respecto al control de DMSO ( $p < 0,05$ , ANOVA).



**Figura 48.** Resumen en porcentajes de la medición de potencial de transmembrana mitocondrial en línea celular NCI-H727 en cultivos normóxicos. Controles de DMSO y CCCP.  $N=3$ . \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ , ANOVA.

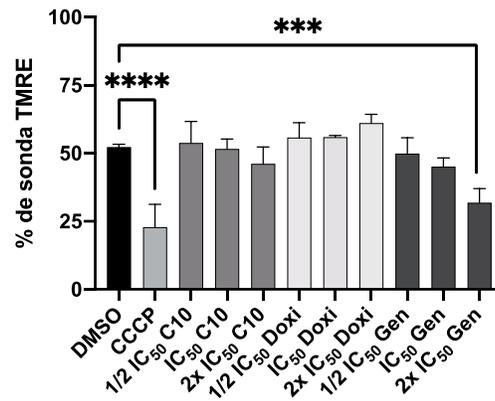
## Hipoxia



**Figura 49.** Medición de potencial de membrana mitocondrial mediante TMRE en línea celular NCI-H727 en cultivos de hipoxia. Control negativo de DMSO y control positivo de CCCP.

En el análisis estadístico representado en la *Figura 50*, en cultivos hipóxicos existe una disminución estadísticamente significativa con el compuesto Gentísico-TPP+C10 en concentración 2xIC<sub>50</sub> ( $p < 0,05$ , ANOVA).

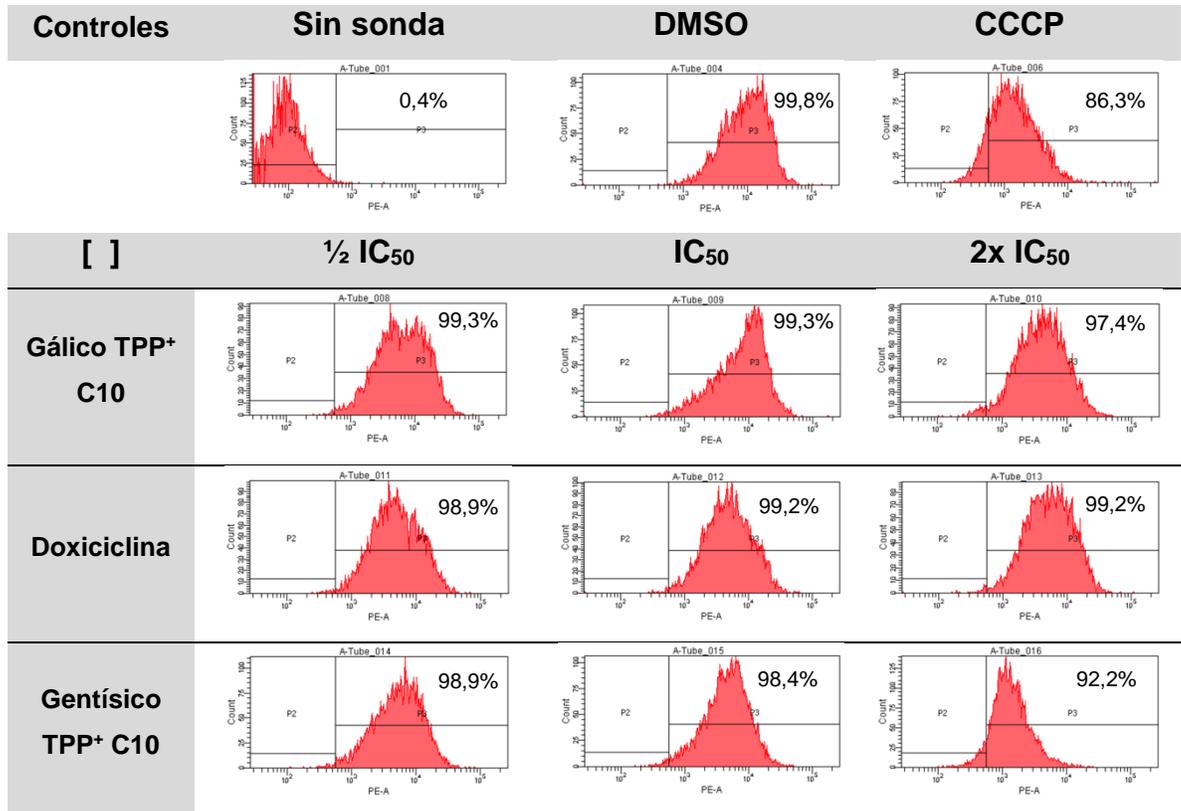
**Medición de Potencial de Transmembrana  
Mitocondrial  
NCI H727 Hipoxia**



**Figura 50.** Resumen en porcentajes de la medición de potencial de transmembrana mitocondrial en línea celular NCI-H727 en cultivos de hipoxia. Controles de DMSO y CCCP. N=3. \* P <0,05, \*\* P <0,001 y \*\*\* P <0,0001, ANOVA.

## Línea celular NCI-H1299

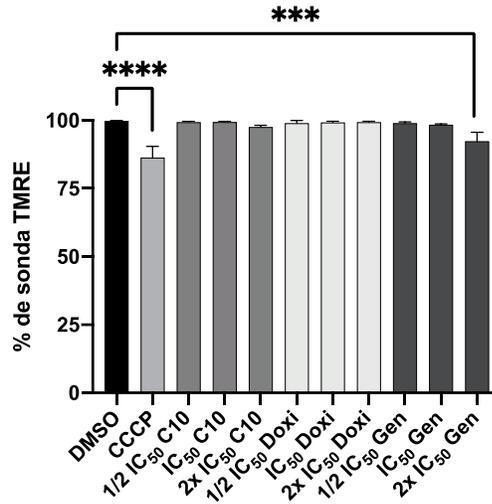
### Normoxia



**Figura 51.** Medición de potencial de membrana mitocondrial mediante TMRE en línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia. Control negativo de DMSO y control positivo de CCCP.

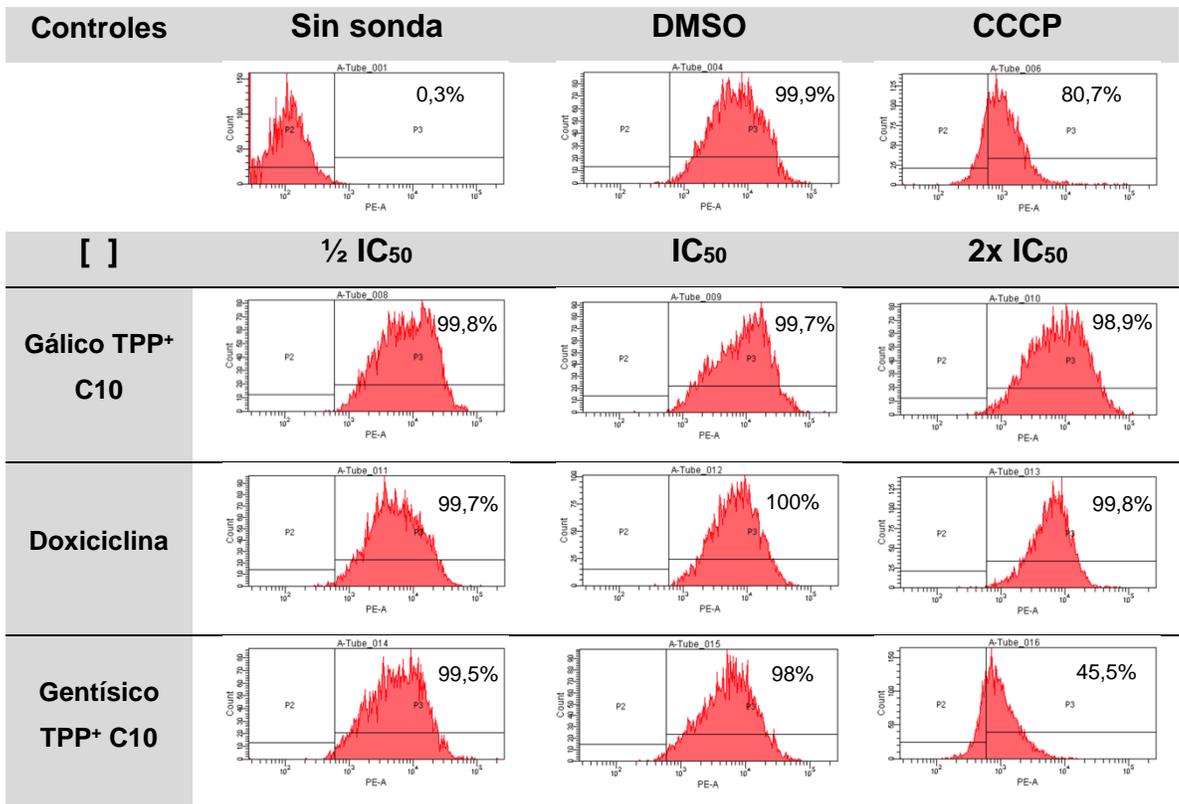
En la *Figura 52*, que representa el análisis estadístico, se observa que el compuesto Gentísico-TPP+C10 presentó una disminución significativa en el potencial de membrana mitocondrial respecto al control de DMSO al utilizar la concentración 2xIC<sub>50</sub> en cultivos normóxicos ( $p < 0,05$ , ANOVA).

**Medición de Potencial de Transmembrana Mitochondrial  
NCI H1299 Normoxia**



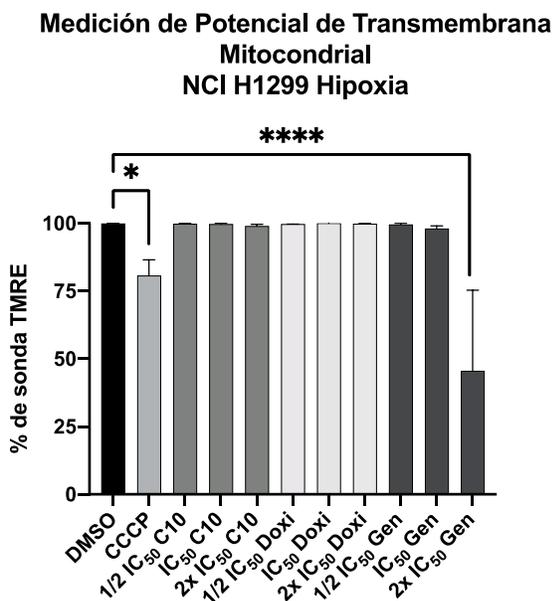
**Figura 52.** Resumen en porcentajes de la medición de potencial de transmembrana mitocondrial en línea celular NCI-H1299 en cultivos de normoxia. Controles de DMSO y CCCP. N=3. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ , ANOVA.

**Hipoxia**



**Figura 53.** Medición de potencial de transmembrana mitocondrial mediante TMRE en línea celular NCI-H1299 en cultivos de hipoxia. Control negativo de DMSO y control positivo de CCCP.

En el análisis estadístico de la *Figura 54*, se observa que el compuesto Gentísico-TPP+C10 en la concentración 2xIC<sub>50</sub> presentó una disminución significativa en el potencial de transmembrana mitocondrial respecto al control de DMSO en cultivos hipóxicos ( $p < 0,05$ , ANOVA).



**Figura 54.** Resumen en porcentajes de la medición de potencial de transmembrana mitocondrial en línea celular NCI-H1299 en cultivos de Hipoxia. Controles de DMSO y CCCP. N=3. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ , ANOVA.

## 5) Estudios de combinación de compuestos

Para determinar si la combinación de los fármacos ensayados en el estudio puede comportarse de manera sinérgica se evaluó 2 combinaciones: Gálico-TPP+C10 con doxiciclina y Gentísico-TPP+C10 con doxiciclina sobre las líneas celulares de NCI-H727 y NCI-H1299, en cultivos de normoxia e hipoxia. Esta combinación fue medida a 72 horas de la aplicación de la combinación.

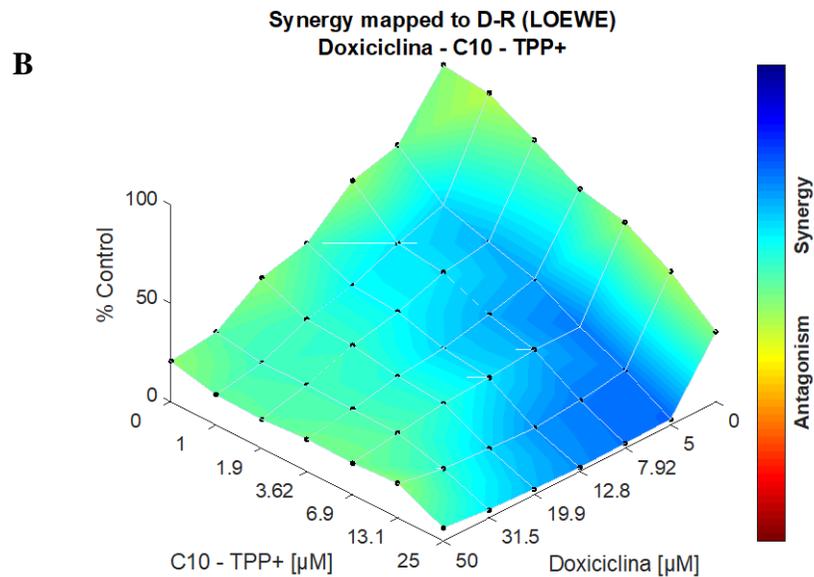
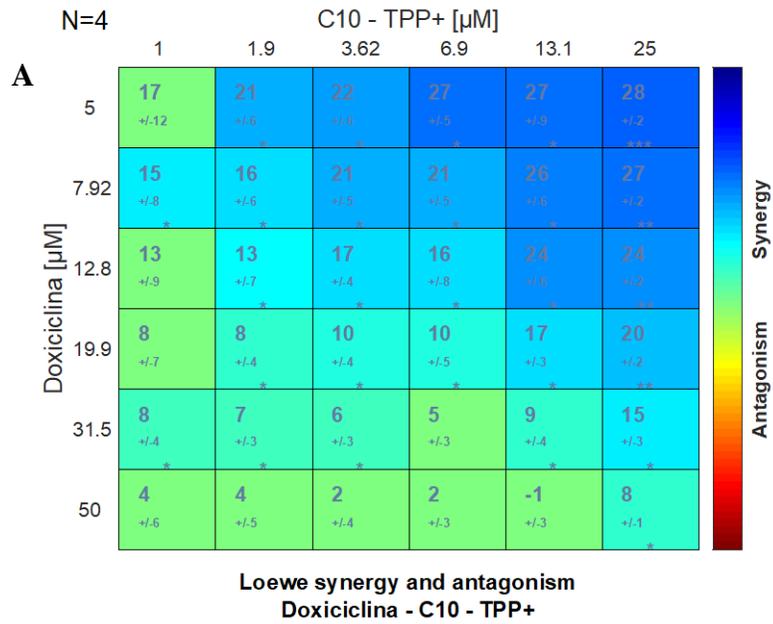
El análisis de *LOEWE* obtenido a través del software *Combeneft*, muestra la puntuación del nivel de sinergia o antagonismo en la combinación de los compuestos, además de su significación estadística. Los asteriscos indican el nivel de significación, y solo se colorean diferente al verde las combinaciones significativas. El nivel de significación se encuentra representado de la siguiente manera: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ . Los resultados fueron divididos por tipo de combinación y subdivididos por línea celular en cultivos de normoxia e hipoxia.

### a. Combinación entre Gálico-TPP+C10 y doxiciclina.

#### Línea celular NCI-H727

##### Normoxia

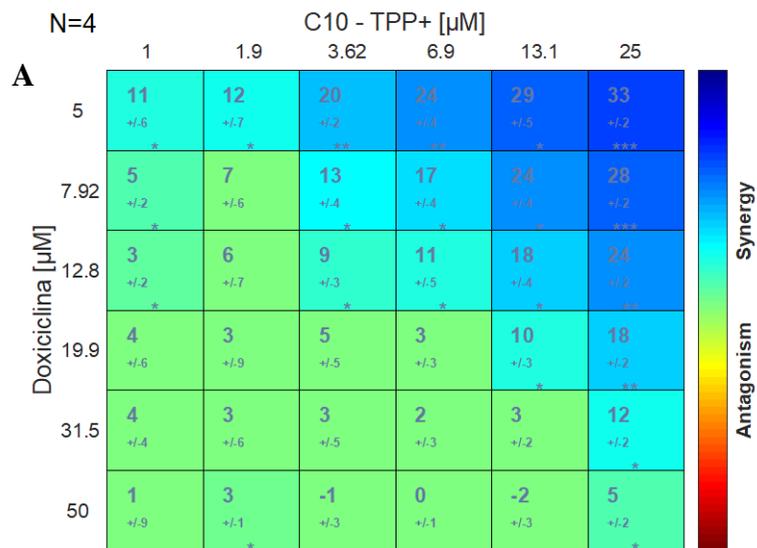
En la matriz que viene a continuación (*Figura 55, A*) se muestran todas las combinaciones ensayadas, con el código de color que indica interacción aditiva, sinérgica o antagónica. Además, se muestra mediante asteriscos el nivel de significancia de las interacciones. Los niveles de sinergia más efectivos se observan en el cuadrante superior derecho de la matriz de combinación en color azul y/o azul claro, donde se produce el cruce de concentraciones de Gálico-TPP+C10 que son más altas, y las concentraciones de doxiciclina que son más bajas (*Figura 55, A*).



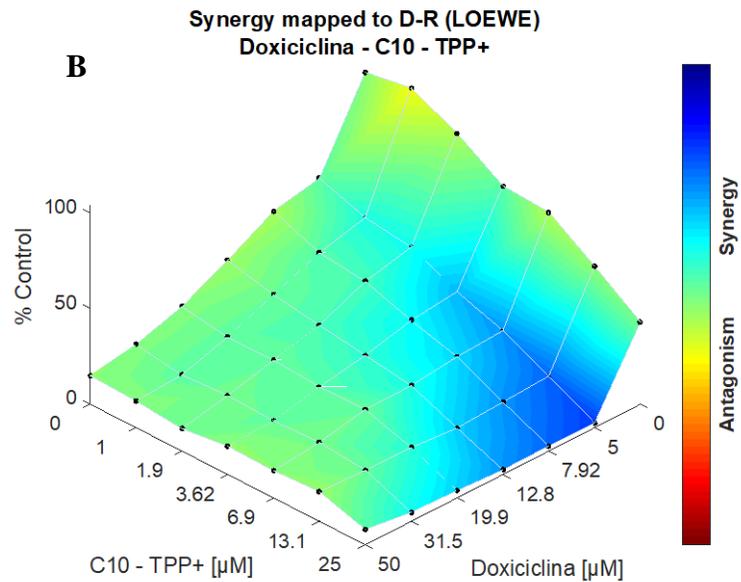
**Figura 55.** Combinación de Gálico-TPP+C10 y doxiciclina en línea celular NCI-H727 en normoxia. **A)** Matriz de sinergia **B)** Mapa de sinergia. Valores obtenidos mediante el promedio de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ .

## Hipoxia:

En la matriz que viene a continuación (*Figura 56, A*) se muestran todas las combinaciones ensayadas, con el código de color que indica interacción aditiva, sinérgica o antagónica. Además, se muestra mediante asteriscos el nivel de significancia de las interacciones. Los niveles de sinergia mas efectivos se observan en el cuadrante superior derecho de la matriz de combinación en color azul y/o azul claro, donde se produce el cruce de concentraciones de Gálico-TPP+C10 que son más altas, y las concentraciones de doxiciclina que son más bajas. (*Figura 56, A*).



Loewe synergy and antagonism  
Doxiciclina - C10 - TPP+

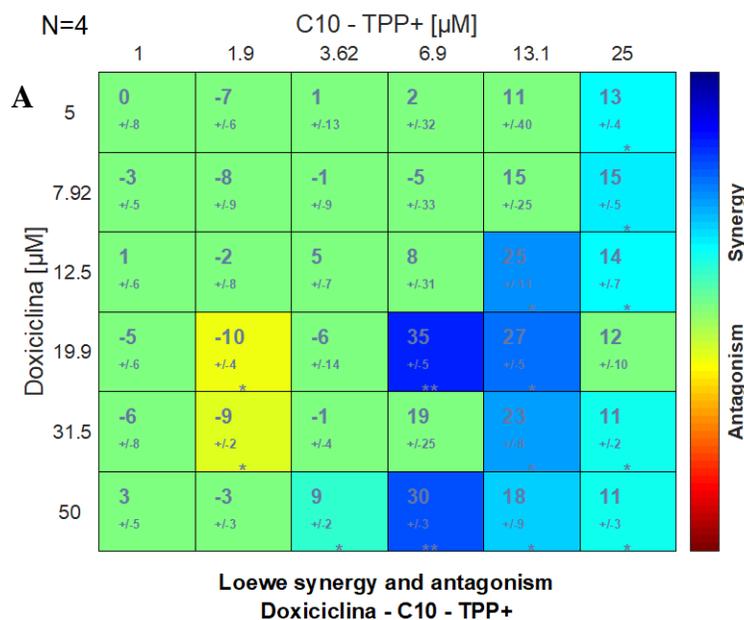


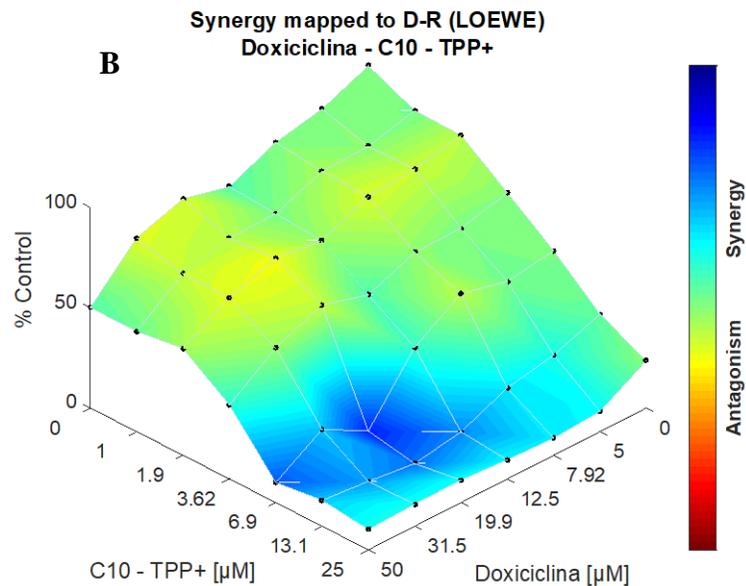
**Figura 56.** Combinación de Gálico-TPP+C10 y doxiciclina en línea celular NCI-H727 en hipoxia. **A)** Matriz de sinergia **B)** Mapa de sinergia. Valores obtenidos mediante el promedio de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ .

## Línea Celular NCI-H1299

### Normoxia

En la matriz que viene a continuación (*Figura 57, A*) representan todas las combinaciones ensayadas en los cultivos normóxicos, con el código de color que indica interacción aditiva, sinérgica o antagónica. Además, se muestra mediante asteriscos el nivel de significancia de las interacciones. Los niveles de sinergia mas efectivos predominan en el cuadrante inferior derecho de la matriz de combinación en color azul y/o azul claro, donde se produce el cruce de concentraciones de Gálico-TPP+C10 que son intermedias y altas, y las concentraciones de doxiciclina que son intermedias y altas. (*Figura 57, A*)

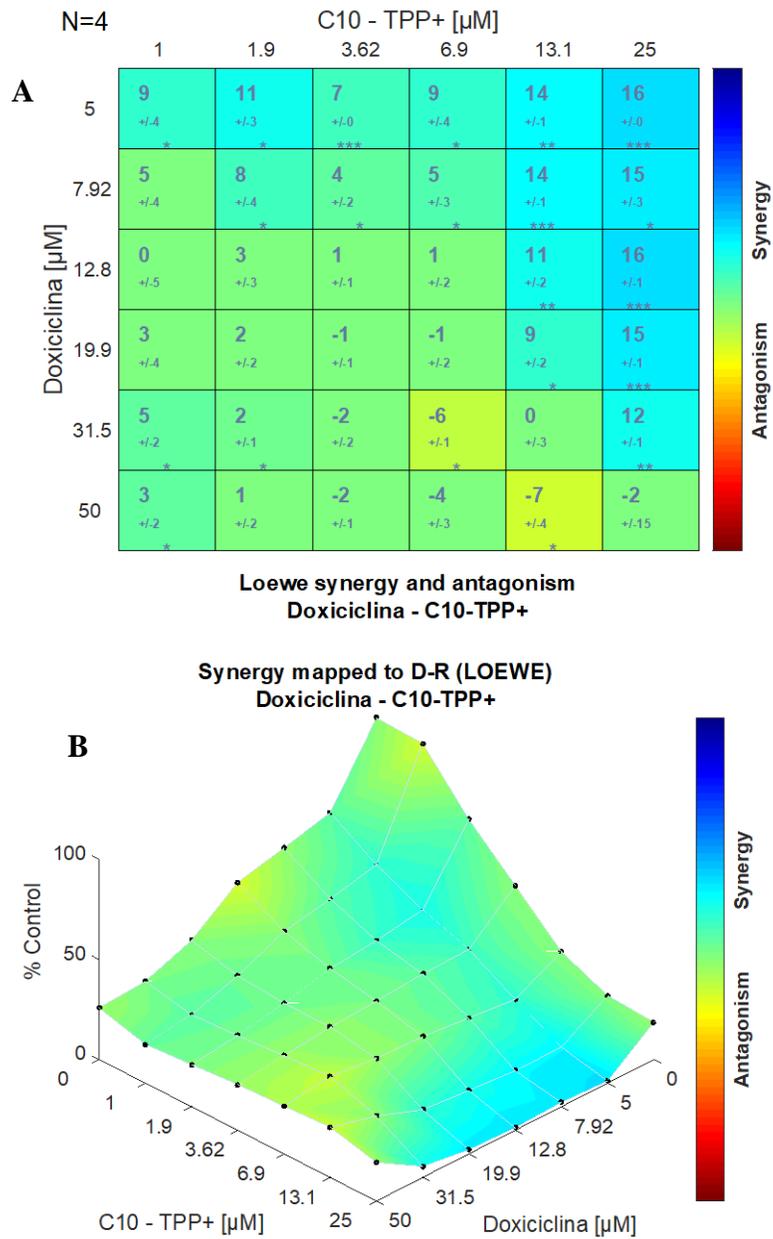




**Figura 57.** Combinación de Gálico-TPP+C10 y Doxiciclina en línea celular NCI-H1299 en normoxia. **A)** Matriz de sinergia **B)** Mapa de sinergia. Valores obtenidos mediante el promedio de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ .

## Hipoxia

En la matriz que viene a continuación (*Figura 58, A*) representan todas las combinaciones ensayadas en los cultivos hipóxicos, con el código de color que indica interacción aditiva, sinérgica o antagónica. Además, se muestra mediante asteriscos el nivel de significancia de las interacciones. Los niveles de sinergia predominan en el cuadrante superior derecho de la matriz de combinación en color celeste y turquesa, donde se produce el cruce de concentraciones de Gálico-TPP+C10 que son más altas, y las concentraciones de doxiciclina que son más bajas. (*Figura 58, A*)



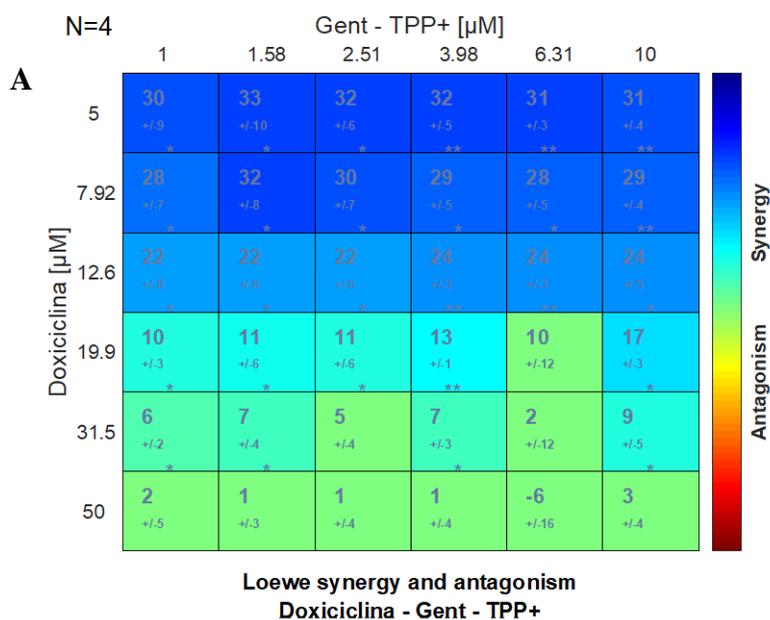
**Figura 58.** Combinación de Gálico-TPP+C10 y doxiciclina en línea celular NCI-H1299 en hipoxia. **A)** Matriz de sinergia **B)** Mapa de sinergia. Valores obtenidos mediante el promedio de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ .

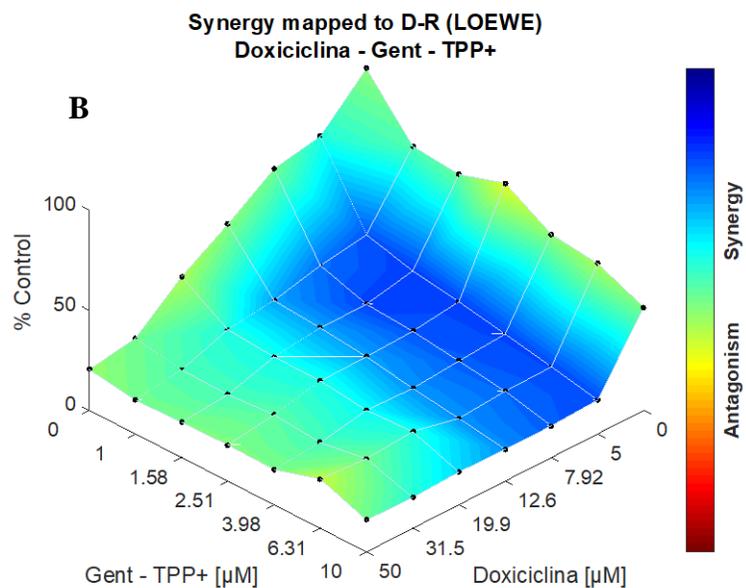
**b. Combinación entre Gentísico-TPP+C10 y doxiciclina.**

**Línea celular NCI-H727**

**Normoxia**

En la matriz que viene a continuación (*Figura 59, A*) representan todas las combinaciones ensayadas en los cultivos normóxicos, con el código de color que indica interacción aditiva, sinérgica o antagónica. Además, se muestra mediante asteriscos el nivel de significancia de las interacciones. Los niveles de sinergia predominan en la mitad superior de la matriz de combinación en color azul y/o azul claro, donde se produce el cruce de todas concentraciones utilizadas de Gentísico-TPP+C10, y las concentraciones de doxiciclina que son bajas e intermedias.

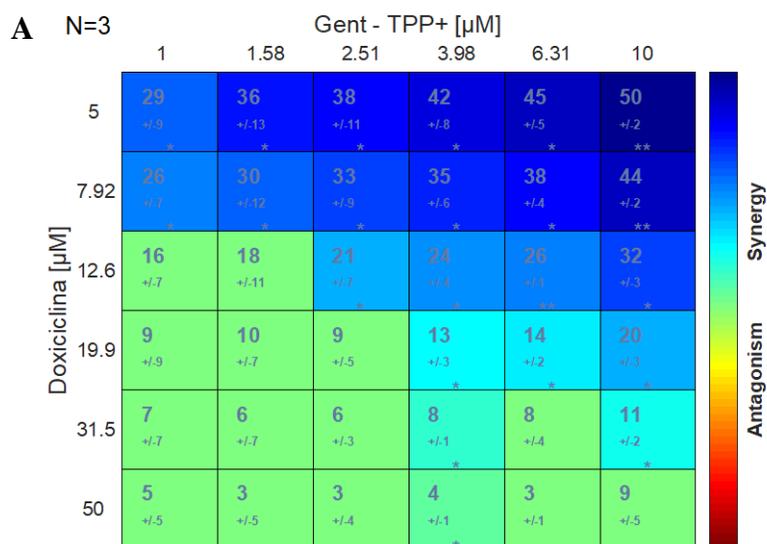




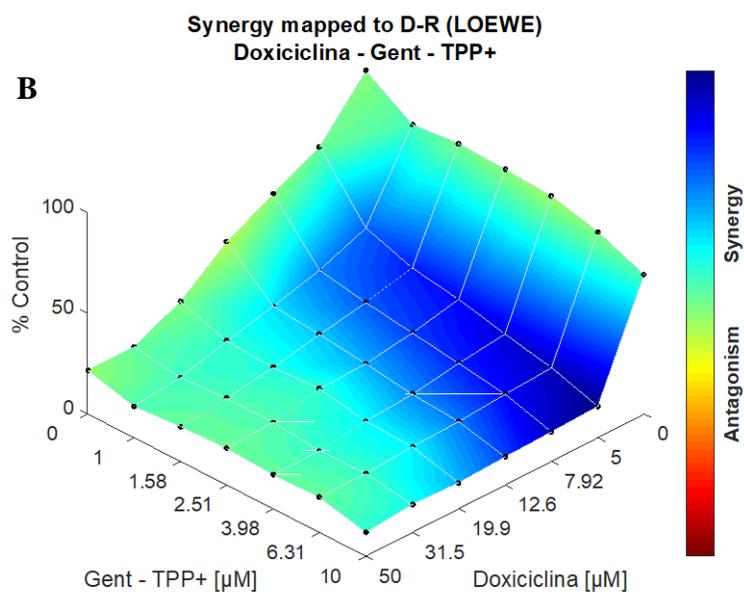
**Figura 59.** Combinación de Gentísico-TPP+C10 y doxiciclina en línea celular NCI-H727 en normoxia. **A)** Matriz de sinergia **B)** Mapa de sinergia. Valores obtenidos mediante el promedio de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$

## Hipoxia

En la matriz que viene a continuación (*Figura 60, A*) representan todas las combinaciones ensayadas en los cultivos hipóxicos, con el código de color que indica interacción aditiva, sinérgica o antagónica. Además, se muestra mediante asteriscos el nivel de significancia de las interacciones. Los niveles de sinergia predominan en la mitad superior de la matriz de combinación en color azul, azul claro y azul oscuro, donde se produce el cruce de todas las concentraciones utilizadas de Gentísico-TPP+C10, y las concentraciones de doxiciclina que son bajas e intermedias (*Figura 60, A*).



Loewe synergy and antagonism  
Doxiciclina - Gent - TPP+



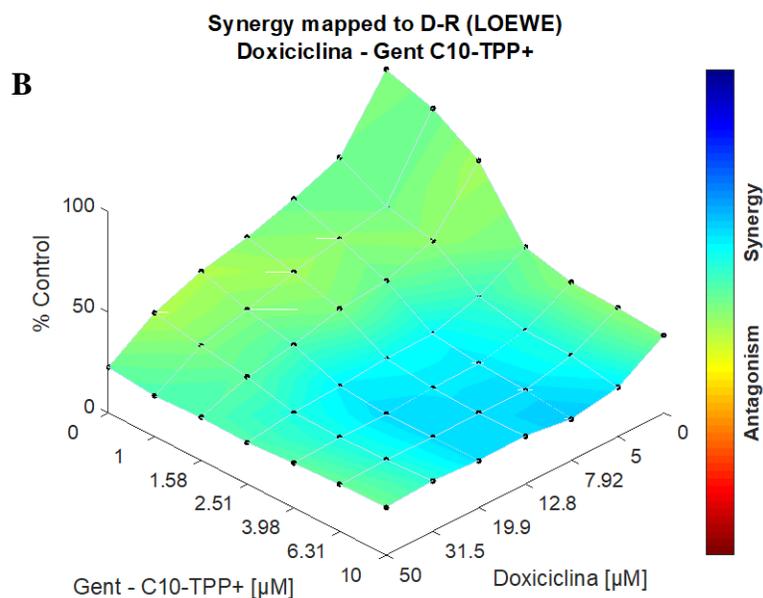
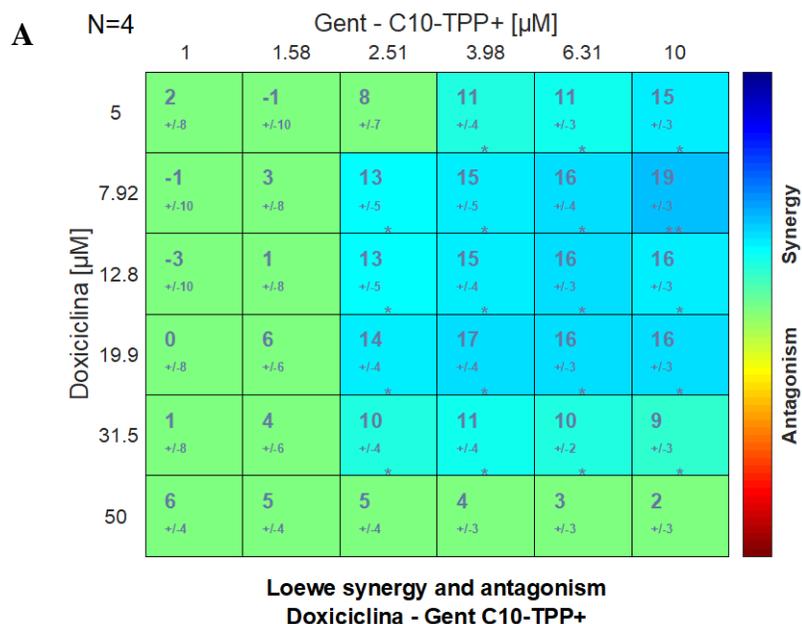
**Figura 60.** Combinación de Gentísico-TPP+C10 y Doxiciclina en línea celular NCI-H727 en hipoxia. **A)** Matriz de sinergia **B)** Mapa de sinergia. Valores obtenidos mediante el promedio de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$

## Línea Celular NCI-H1299

### Normoxia

En la matriz que viene a continuación (*Figura 61, A*) se muestran todas las combinaciones ensayadas, con el código de color que indica interacción aditiva, sinérgica o antagónica. Además, se muestra mediante asteriscos el nivel de

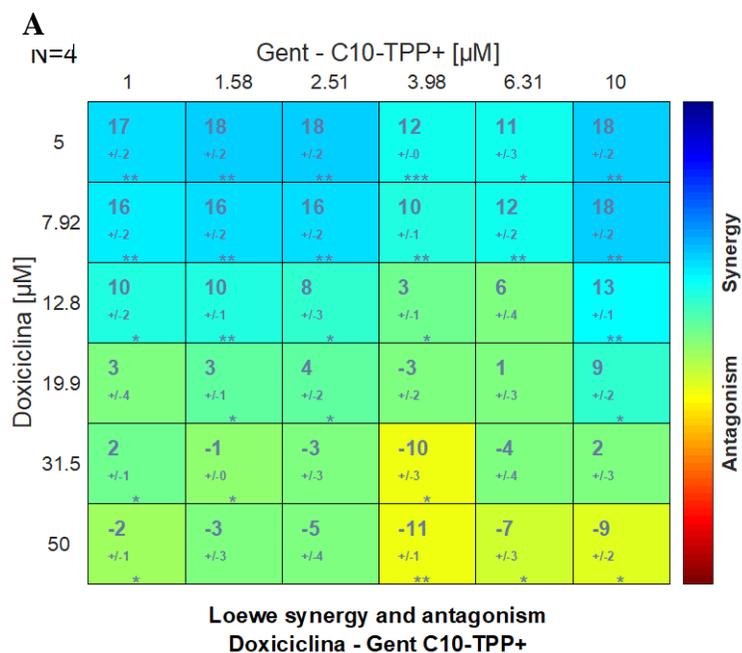
significancia de las interacciones. Los niveles de sinergia predominan en el cuadrante superior derecho y levemente en el cuadrante inferior derecho de la matriz de combinación, dichas sinergias se muestran en color celeste y turquesa, en la cual se produce el cruce de concentraciones altas de Gentísico-TPP+C10, y concentraciones intermedias de doxiciclina (*Figura 61, A*).

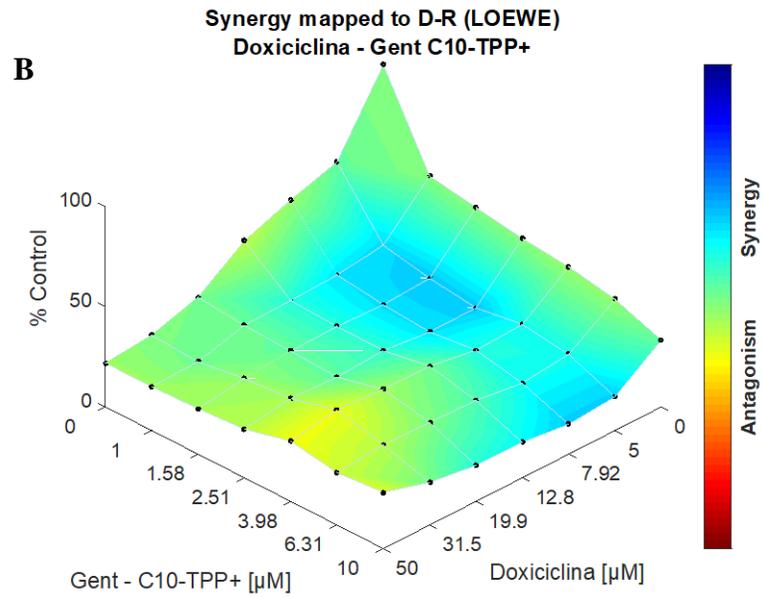


**Figura 61.** Combinación de Gentísico-TPP+C10 y doxiciclina en línea celular NCI-H1299 en normoxia. **A)** Matriz de sinergia **B)** Mapa de sinergia. Valores obtenidos mediante el promedio de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$

## Hipoxia

En la matriz que viene a continuación (*Figura 62, A*) se muestran todas las combinaciones ensayadas, con el código de color que indica interacción aditiva, sinérgica o antagónica. Además, se muestra mediante asteriscos el nivel de significancia de las interacciones. Los niveles de sinergia predominan en el cuadrante superior izquierdo y levemente en el cuadrante superior derecho de la matriz de combinación, dichas sinergias se muestran en color azul claro y celeste, en la cual se produce el cruce de concentraciones bajas de Gentísico-TPP+C10, y concentraciones intermedias y bajas de doxiciclina. (*Figura 62, A*)





**Figura 62.** Combinación de Gentísico-TPP+C10 y doxiciclina en línea celular NCI-H1299 en hipoxia. **A)** Matriz de sinergia **B)** Mapa de sinergia. Valores obtenidos mediante el promedio de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*  $P < 0,0001$

## VI. DISCUSIÓN

### a. Expresión de marcadores de TICs

La teoría de las células iniciadoras de tumores ha sido investigada por diversos autores y se ha descrito en diferentes tipos de tumores, incluyendo el cáncer de pulmón. Las TICs se pueden identificar por marcadores fenotípicos, entre los que se encuentran las glicoproteínas CD44 y CD133 (Dawood, S., Austin, L., & Cristofanilli, M, 2014).

CD44 es un receptor de ácido hialurónico presente en la membrana celular que contribuye a la adhesión, crecimiento, diferenciación y transporte entre la célula y la matriz extracelular (Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., et al., 2019). Mientras que la función fisiológica de CD133 es un tanto desconocida, se sabe que CD133 está preferentemente localizado en protuberancias y microvellosidades de membrana plasmática, lo que sugiere su participación en la organización de esta (Glumac, P. M., & LeBeau, A. M., 2018).

En este estudio se evaluó la presencia de ambos marcadores en la línea tumoral NCI-H1299 en cultivos de normoxia e hipoxia. Existe una población celular CD44<sup>+</sup> equivalente a un 96,3% para cultivos de normoxia y de un 93,6% para cultivos de hipoxia, en ambos cultivos la población CD44<sup>+</sup> alcanza un alto porcentaje (*Figura 11 y Figura 15*). En el año 2010, *Leung y colabs.* evaluaron varios marcadores celulares para TICs entre ellos CD44 y CD133, en un total de 10 líneas celulares de cáncer de pulmón. Los autores obtuvieron una población CD44<sup>+</sup> de 81,3% para la línea celular NCI-H1299, valor que se acerca a nuestros resultados, con este antecedente podemos concluir que la línea celular NCI H1299 tiene una alta expresión del marcador CD44 (Leung, E. L., Fiscus, R. R., Tung, J. W., et al., 2010).

Ahora bien, a pesar que CD44 es un marcador de TICs y este se expresa en un alto porcentaje dentro de la línea celular en estudio, no es posible concluir que toda la población marcada corresponde a TICs. Sin embargo, se ha determinado en una investigación que la población CD44<sup>+</sup> de la línea celular NCI-H1299 tiene una resistencia relativa al cisplatino, y además son capaces de iniciar un tumor *in vivo* con menos células que una población sin clasificar (Leung, et al., 2010).

En contraste, con el marcador CD133, en nuestro experimento la población CD133<sup>+</sup> fue de 0,02% para normoxia y de 0,03% para hipoxia, en ambos casos el resultado es un porcentaje cercano a 0% (*Figura 11 y Figura 15*). Si comparamos con resultados obtenidos por *Leung y colabs.* ellos obtuvieron un 0% de expresión del marcador en la línea celular NCI-H1299, por lo que nuestros resultados se condicen con lo descrito en literatura. Se esperaba evaluar este marcador en otra línea celular (NCI-H727), debido a que no existía literatura de CD133 en esta línea celular, con el objetivo de tener una población celular CD133<sup>+</sup> mas cercano a un 1% que a un 0% que fue lo que obtuvimos en la línea NCI-H1299.

El marcador CD133, es de interés porque en la literatura, la población CD133<sup>+</sup>, a diferencia de CD133<sup>-</sup>, co-expresa altamente el marcador de resistencia a multi-fármacos ABCG2 y muestra una resistencia significativa a los agentes de quimioterapia como cisplatino, etopósido, doxorubicina y paclitaxel y a la radioterapia (Chen, Y. C., Hsu, H. S., Chen, Y. W., et. al., 2008).

Debido a la alta expresión del marcador CD44, es necesario realizar una combinación de marcadores para obtener una población más específica de TICs. Por lo que en nuestro doble marcaje entre CD44/CD133 arrojó una población positiva a ambos marcadores de 0,22% y 0,12% en normoxia e hipoxia respectivamente (*Figura 11 y Figura 15*). En la literatura se describen porcentajes variables de TICs dependiendo del tipo de cáncer y línea celular, algunos especifican que es menor al 1% del total de células, por lo que nosotros esperábamos un porcentaje mas cercano al 1% que al 0% (Maiuthed, A., et. al., 2018). No se ha encontrado la combinación de anticuerpos CD44/CD133 en esta línea celular en la literatura, pero se sugiere realizar combinaciones con marcadores de genes de pluripotencia como OCT-4, SOX-1 y Nanog. (Shukla, S., Khan, S., Sinha, S., et. al., 2018).

Se esperaba un mayor porcentaje de TICs en los cultivos de hipoxia en comparación a los de normoxia. Sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar resultados entre ambos tipos de cultivo. Probablemente porque las células en hipoxia no exhibieron un fenotipo distinto a las células normóxicas, tema que será discutido mas adelante en el presente texto.

## **b. Ensayo de viabilidad celular**

Los cationes lipofílicos deslocalizados (Gálico TPP<sup>+</sup> C10, Gentísico TPP<sup>+</sup> C10, 2,3 diOH TPP<sup>+</sup> C10 y 2 OH TPP<sup>+</sup> C10) son moléculas originadas a partir del ácido gálico y metabolitos de este, unidos a una molécula de trifenilfosfonio a través de una cadena de 10 carbonos, esto les permite a las distintas moléculas dirigirse selectivamente a la mitocondria de células tumorales.

Por otro lado, doxiciclina es un antibiótico de la familia de las tetraciclinas y se ha descrito su uso para inhibir la viabilidad y la proliferación de las células de cáncer de mama y células madre de cáncer de mama (Lin et al., 2018; Peredo-Silva et al., 2017; Zhang et al., 2017).

En nuestros experimentos se construyeron curvas sigmoideas de dosis respuesta, a través de una serie de concentraciones en orden creciente de los compuestos y se determinaron los IC<sub>50</sub> de cada compuesto en los tiempos de 24, 48 y 72 horas en cultivos de normoxia e hipoxia en 2 líneas celulares tumorales. Se tomó como control una línea de fibroblastos pulmonares, al cual también se determinaron los IC<sub>50</sub> de cada compuesto.

### **Efecto de Cationes lipofílicos deslocalizados sobre la viabilidad celular**

En los cultivos de normoxia e hipoxia de las líneas celulares NCI-H727 y NCI-H1299, se observan en las curvas dosis-respuesta que al utilizar la concentración máxima (100  $\mu M$ ) se alcanza la citotoxicidad total de las células llegando al 0% de viabilidad celular en todos los tiempos y con todos los compuestos catiónicos, lo cual nos indica el efecto citotóxico que tienen los compuestos en estudio. Además, en las curvas sigmoideas se observa una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración del compuesto (*Figuras 18, 19, 23, 24, 33, 34, 38 y 39*).

En la línea celular NCI-H727, los DLCs en cultivos de normoxia obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> que varían entre 19,4 – 10,4  $\mu M$ , en tiempo de 24 horas, mientras que a las 48 horas varía entre 12,3 – 6,4  $\mu M$  y a las 72 horas entre 5,7 – 1,4  $\mu M$ . Por otro lado, los cultivos en hipoxia obtuvieron valores de 24,2 – 10,3  $\mu M$ , 12,8 – 6,9  $\mu M$ , y 4,0 – 0,94  $\mu M$  en los tiempos 24, 48 y 72 horas respectivamente (*Tablas 6, 7, 9 y*

10). Los valores de  $IC_{50}$  van disminuyendo a mayor tiempo de exposición lo que indica que el efecto de los compuestos en estudio es tiempo-dependiente.

En la línea celular NCI-H1299, los compuestos catiónicos obtuvieron valores de  $IC_{50}$  en los cultivos de normoxia de 14,7 – 7,6  $\mu M$ , 9,9 – 1,2  $\mu M$  y 4,8 – 0,56  $\mu M$ , en tiempos de 24, 48 y 72 horas respectivamente, en tanto, los cultivos de hipoxia obtuvieron valores de 19,3 – 7,9  $\mu M$ , 12,2 – 3,3  $\mu M$  y 5,0 – 0,54  $\mu M$  en los mismos tiempos (*Tablas 6, 7, 9 y 10*). En nuestro modelo de estudio también se observó la disminución del  $IC_{50}$  a mayor tiempo de exposición indicando el efecto tiempo-dependiente que tienen los DLCs.

La disminución del  $IC_{50}$  es significativa al comparar los tiempos 24 vs. 48 horas, 24 vs. 72 horas y 48 vs. 72 horas tanto en normoxia como hipoxia con el compuesto Gálico TPP+C10 en ambas líneas celulares tumorales ( $IC_{50}$  24h >  $IC_{50}$  48h >  $IC_{50}$  72h) (*Figura 22*).

Para Gentísico TPP+C10, la disminución del  $IC_{50}$  es significativa al comparar los tiempos 24 vs. 48 horas, 24 vs. 72 horas y 48 vs. 72 horas tanto en normoxia como hipoxia en ambas líneas celulares tumorales. Excepto la comparación de 24 vs. 48 horas en hipoxia de la línea NCI-H1299, donde no existió diferencia significativa (*Figura 27*).

Con el compuesto 2,3 diOH TPP+ C10, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar 24 vs. 48; 24 vs. 72; y 48 vs. 72 horas en cultivos de normoxia de ambas líneas celulares existiendo una disminución del  $IC_{50}$  a medida que se aumentaba el tiempo de incubación del compuesto, exceptuando la comparación de 24 vs. 48 horas en la línea NCI-H1299 en el cual la diferencia es no significativa, mientras que en hipoxia fue significativa la comparación de 24 vs. 72 h ( $IC_{50}$  24h >  $IC_{50}$  72h); y 48 vs. 72 h ( $IC_{50}$  48h >  $IC_{50}$  72h) para la línea NCI-H727, y para la línea NCI-H1299 estas diferencias fueron significativas entre todos los tiempos ( $IC_{50}$  24h >  $IC_{50}$  48h >  $IC_{50}$  72h) (*Figura 37*).

Para 2 OH TPP+ C10 existen disminuciones estadísticamente significativas entre los  $IC_{50}$  a medida que se aumentaba el tiempo de incubación del compuesto, esta

diferencia fue entre todos los tiempos en cultivos normóxicos e hipóxicos de ambas líneas celulares, exceptuando la comparación entre 24 vs. 48 horas en cultivos de hipoxia en la línea celular NCI-H727 (*Figura 42*).

Por otro lado, al comparar los valores obtenidos entre IC<sub>50</sub> de normoxia vs. hipoxia, observamos que son valores similares, sin embargo, existen resultados estadísticamente significativos con el compuesto Gálico TPP<sup>+</sup> C10 a las 24 horas en ambas líneas celulares, siendo el IC<sub>50</sub> de la hipoxia (24,2 – 19,3  $\mu\text{M}$ ) mayor que el IC<sub>50</sub> de la normoxia (19,4 – 14,7  $\mu\text{M}$ ) (*Figura 21*).

Con 2,3 diOH TPP<sup>+</sup> C10 hubo diferencia significativa a las 48 horas siendo el IC<sub>50</sub> de hipoxia (12,3  $\mu\text{M}$ ) mayor que el de normoxia (7,5  $\mu\text{M}$ ), en la línea NCI-H727. Mientras que en NCI-H1299, hubo diferencias estadísticas en 24 horas (9,9 vs. 12,5  $\mu\text{M}$ ) y a las 72 horas (3,2 vs. 6,0  $\mu\text{M}$ ), siendo en ambos casos mayor el IC<sub>50</sub> de hipoxia (*Figura 36*).

El compuesto 2 OH TPP<sup>+</sup> C10, tuvo diferencias estadísticamente significativas al comparar normoxia-hipoxia a las 48 horas en ambas líneas celulares siendo mayor el IC<sub>50</sub> de hipoxia (6,4 – 1,2  $\mu\text{M}$ ) que el de normoxia (12,8 – 3,3  $\mu\text{M}$ ) (*Figura 41*).

En el año 2021, los autores *Wang y colabs.* evaluaron el efecto producido por la hipoxia en la resistencia al Cisplatino en células de cáncer de pulmón y determinaron que la hipoxia exacerbó la resistencia al cisplatino debido al aumento de la expresión de la isoenzima piruvato quinasa (PKM2) que se observó en los exosomas secretados por las células hipoxicas (Wang, D., Zhao, C., Xu, F., et al., 2021). Por lo cual es importante evaluar la diferencia entre cultivos normóxicos e hipóxicos para observar si existe un aumento en el IC<sub>50</sub> en cultivos hipóxicos.

En el año 2020, los autores *Jara y colabs.* realizaron experimentos de viabilidad celular con los cationes lipofílicos deslocalizados, en cultivos de normoxia de células tumorales de cáncer de colon. Los valores de IC<sub>50</sub> que obtuvieron en dicho estudio variaron entre 5,3 - 15,2  $\mu\text{M}$  a tiempo de 24 horas, en 48 horas variaron entre 2,7 – 14,2  $\mu\text{M}$ , mientras que a 72 horas los resultados fueron de 3,0 – 12,2  $\mu\text{M}$  dependiendo de la línea celular y del compuesto utilizado. Por lo cual, al contrastar

nuestros valores de IC<sub>50</sub> de ambas líneas tumorales con los valores obtenidos en el estudio, los valores son similares. Además, en el estudio se destaca el efecto citotóxico de los compuestos catiónicos, y que este es dependiente del tiempo y de la concentración (Jara, J. A., Rojas, D., Castro-Castillo, V., et al., 2020).

Por otro lado los autores *Sandoval-Acuña y colabs.* evaluaron el efecto citotóxico de estas moléculas en líneas celulares de cáncer de mama. Los resultados a las 24 horas variaron entre 4,8 – 14,4  $\mu\text{M}$ , dependiendo la línea celular. Mientras que en 48 horas fue de 1,2 – 11,9  $\mu\text{M}$  y a 72 horas los IC<sub>50</sub> fueron entre 1,4 – 7,7  $\mu\text{M}$  dependiendo de la línea celular y del compuesto utilizado. Por lo que en este estudio se ve reflejado la disminución del IC<sub>50</sub> a medida que se aumenta el tiempo de acción del compuesto y su concentración. Por lo cual nuestros resultados son concordantes con los estudios señalados (Sandoval-Acuña, C., Fuentes-Retamal, S., Guzmán-Rivera, D., et al., 2016).

Los fibroblastos pulmonares fueron nuestra línea celular de control, con el compuesto Gálico TPP<sup>+</sup> C10, se obtuvo una citotoxicidad casi total alrededor del 92% en 24 y 48 horas, mientras que en 72 horas fue una citotoxicidad del 100%. (*Figura 20*). En contraste, los DLCs restantes obtuvieron una citotoxicidad total del 100% en todos los tiempos en los cuales se realizó el experimento, observando la disminución del IC<sub>50</sub> a medida que aumenta el tiempo de exposición del compuesto y con valores similares a los IC<sub>50</sub> obtenidos de las líneas tumorales (*Figuras 25, 35 y 40*).

Sin embargo, el efecto de 2,3 diOH TPP<sup>+</sup> C10 sobre fibroblastos obtuvo resultados de IC<sub>50</sub> no concordantes entre sí. Nosotros esperábamos que el IC<sub>50</sub> fuera disminuyendo a medida que se aumentaba el tiempo de exposición del compuesto, sin embargo, a las 72 horas el IC<sub>50</sub> aumentó significativamente y fue superior que el IC<sub>50</sub> obtenido a las 24 y 48 horas. Este fenómeno se escapa de la tónica de los otros DLCs lo que nos lleva a pensar que tal vez los fibroblastos pudieron multiplicarse a pesar de estar sometido a una concentración específica de compuesto (*Figura 35*).

A pesar de estos resultados, en el año 2017, *Peredo-Silva y colabs.* estudiaron el efecto de algunos DLCs en un modelo *in vivo* de adenocarcinoma mamario, y

determinaron que estos compuestos no causan toxicidad sistémica ni daño a órganos importantes para el metabolismo y la excreción de los compuestos en ratones, mediante el análisis de parámetros hematológicos y bioquímicos. En el estudio para confirmar aún más la seguridad de estos compuestos, se realizó un análisis histopatológico de tejido cardíaco, hepático y renal, y los resultados fueron consistentes con los del análisis hematológico (Peredo-Silva et al., 2017).

El modelo de cultivo celular convencional monocapa o 2D es el utilizado en nuestros experimentos, dicho modelo es ampliamente utilizado en experimentos *in vitro* por su fácil observación, manipulación y bajo costo. Sin embargo, representa ciertas desventajas ya que no imitan las estructuras naturales de los tejidos, las interacciones célula-célula y célula-ambiente extracelular no están representadas como lo estarían en un tejido normal. Estas interacciones son responsables de la proliferación, vitalidad, expresión de genes y proteínas, respuesta a estímulos, metabolismo de fármacos y otras funciones celulares. Otro inconveniente del cultivo 2D es que las células de monocapa tienen acceso ilimitado a los ingredientes del medio de cultivo, como oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señal (Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., et al., 2018).

En el caso de nuestros fibroblastos pulmonares, al ser un cultivo monocapa todas las células recibían la misma concentración del compuesto y tenían acceso constante a este mismo por un periodo de 24, 48 o 72 horas. Esto puede explicar los IC<sub>50</sub> similares obtenidos comparando fibroblastos normales con líneas tumorales.

Dicho esto, los sistemas de cultivo celular monocapa 2D a veces no exhiben el proceso de desarrollo celular visto en el entorno fisiológico *in vivo* debido a la simplicidad de los sistemas. La falta de un entorno complejo y rico en información biológica en estos sistemas 2D podría ser la causa de esta disparidad. (Duval, K., Grover, H., Han, L. H., et al., 2017).

### **Efecto de doxiciclina sobre la viabilidad celular**

En la línea NCI-H727, tanto en normoxia como en hipoxia, no se logró determinar el  $IC_{50}$  a las 24 horas, porque este era mayor que la concentración máxima utilizada. Por otro lado, a las 48 horas la concentración fue de 21,6 y 36,6  $\mu M$  en normoxia e hipoxia respectivamente y a las 72 horas, los valores fueron de 14,4 y 14,2  $\mu M$  (Figura 28). En las curvas dosis-respuesta se observa que aumenta la citotoxicidad de doxiciclina a medida que se aumenta el tiempo de acción, llegando a una viabilidad celular del 0%. Además, se disminuye el  $IC_{50}$  a mayor tiempo para lograr la inhibición del 50% de la población celular. Esta disminución del  $IC_{50}$  es significativa comparando 48 horas vs. 72 horas, tanto en normoxia como hipoxia (Figura 32, A y B). La diferencia de concentraciones entre normoxia e hipoxia, solo fue significativa en 48 horas (12,6 vs. 36,6  $\mu M$ ) siendo mayor la concentración en hipoxia (Figura 31, A).

En NCI-H1299 también se logra efecto citotóxico, y este es dependiente de la concentración y del tiempo obteniendo valores de 17,7  $\mu M$ , 16,3  $\mu M$ , y 7,1  $\mu M$  en tiempos de 24, 48 y 72 horas en cultivos de normoxia. En cultivos de hipoxia se obtienen valores más altos de  $IC_{50}$  tales como 37,2  $\mu M$ , 24,0  $\mu M$ , y 15,4  $\mu M$  en los mismos tiempos en cultivos de hipoxia (Tabla 8). Esta diferencia entre normoxia-hipoxia, fue significativa en todos los tiempos (24 normoxia vs. 24 hipoxia, 48 normoxia vs. 48 hipoxia y 72 normoxia vs. 72 hipoxia) (Figura 31, B). Al comparar la diferencia de  $IC_{50}$  entre los tiempos (24 vs. 48; 24 vs. 72; y 48 vs. 72 horas), estas fueron significativas en normoxia e hipoxia, a excepción de 24 vs. 48 horas en normoxia (Figura 32, C y D).

En el año 2020, los autores Fuentes-Retamal y colabs. estudiaron el efecto de doxiciclina en líneas celulares de cáncer de mama a tiempo de 24 horas, en la cual se obtuvo un efecto citotóxico, pero en concentración mayor que en nuestra línea celular de NCI-H1299 (70,5 – 109,3  $\mu M$  vs. 17,7  $\mu M$ ). No se ha encontrado información respecto a tiempos de incubación mayores (Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Peredo-Silva, L., et al., 2020).

A diferencia de los DLCs que afectaban fuertemente a los fibroblastos, doxiciclina tuvo valores indeterminados de  $IC_{50}$  para esta línea celular, porque nuestras concentraciones utilizadas no fueron suficiente para calcular un  $IC_{50}$  exacto, ya que

este era muy alto. Probablemente doxiciclina si haya tenido un efecto citotóxico en esta línea celular, pero a concentraciones muy altas. Esto se explica porque doxiciclina es un antibiótico comercializado desde 1967, por lo que su uso es seguro para el organismo y tiene perfiles de dosis descritos en la literatura.

### **c. Medición de contenido de ATP intracelular**

Con el objetivo de ver como estos compuestos afectaban al funcionamiento celular, y si tenían incidencia en la función de la mitocondria, se midió el contenido de ATP intracelular. En la línea celular NCI-H727 existió una disminución en el porcentaje de ATP llegando a un 74% - 80% en cultivos de normoxia e hipoxia, respectivamente, con el compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 en la concentración 2x IC<sub>50</sub>, esta disminución fue significativa respecto al control con DMSO (100% ATP). Mientras que en las concentraciones restantes que eran menores no hubo diferencias estadísticas (*Figura 43, A y B*).

En la misma línea celular con Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 existieron diferencias estadísticas en todas las concentraciones utilizadas: para ½ IC<sub>50</sub> alcanzó un porcentaje de 86% - 84%, para IC<sub>50</sub> se alcanzó 74% - 79%, mientras que 2x IC<sub>50</sub> obtuvo 71% - 72% (porcentajes expresados para normoxia - hipoxia), lo cual nos indica que la disminución en el porcentaje de ATP es dependiente de la concentración de este compuesto, e incluso son valores equiparables a los obtenidos con el control de CCCP que se alzó con 71% - 74% de ATP (*Figura 43, A y B*).

Al comparar entre ambos cationes lipofílicos deslocalizados tenemos que las concentraciones de Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 utilizadas fueron menores que las concentraciones de Gálico-TPP<sup>+</sup>C10, y que a pesar de esto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 tuvo una disminución considerable del porcentaje del ATP respecto al otro compuesto, incluso en la concentración de ½ IC<sub>50</sub>, por lo que se podría concluir que, en nuestro modelo experimental, el compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 tiene mas eficacia que Gálico-TPP<sup>+</sup>C10.

En NCI-H1299 se obtuvo resultados similares, donde el compuesto Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 tuvo diferencias significativas respecto al control (DMSO) en su concentración 2x

IC<sub>50</sub> alcanzado porcentajes de 83% - 88% tanto en cultivos de normoxia como en hipoxia. En la misma línea con el compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 se obtuvo diferencias estadísticamente significativas a concentraciones de ½ IC<sub>50</sub> con un valor de 89%, IC<sub>50</sub> con 83% y 2x IC<sub>50</sub> con 74% en cultivos de normoxia, mientras que en hipoxia existieron diferencias significativas en concentración de IC<sub>50</sub> alcanzando un valor de 84% y 2x IC<sub>50</sub> con 83%. Todos estos valores sugieren que la variación existente de ATP es dependiente de la concentración del compuesto (*Figura 45, A y B*).

Contrastando con información en la literatura, lo esperable para ambos cationes es una caída en el porcentaje de ATP intracelular. En el estudio de *Sandoval-Acuña y colabs.* evaluaron el efecto de estas moléculas sobre los niveles de ATP en células tumorales de cáncer de mama donde obtuvieron reducciones de ATP entre 10% a un 25% a la máxima concentración utilizada (20 μM) alcanzando valores de 90% a 75% de ATP dependiendo de la línea tumoral en estudio. Considerando que nuestras concentraciones utilizadas eran todas menores o iguales a 10,04 μM para Gálico-TPP<sup>+</sup>C10, y 8,02 μM para Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10, en comparación a los 20 μM que se usaron en el estudio de *Sandoval-Acuña y colabs.* tenemos que nuestros valores expresados en porcentaje de ATP, son similares a los valores del estudio antes mencionado (Sandoval-Acuña, C., et al., 2016).

Existen sensores metabólicos intracelulares que se activan cuando cae la relación ATP/AMP, las células hacen frente a una producción disminuida de ATP adaptándose mediante la activación de otras vías de síntesis de ATP y la inactivación de procesos que consumen ATP (Yuan, H. X., Xiong, Y., & Guan, K. L., 2013). La quinasa activada por AMP (AMPK) se activa por el estrés energético agudo y promueve las vías catabólicas para producir ATP mientras se desactivan las vías anabólicas que consumen ATP. Por tanto, la activación de AMPK después de la adición de los cationes lipofílicos deslocalizados a las células tumorales podría incrementar la síntesis de ATP no mitocondrial, permitiendo que las células afronten la disminución esperada de los niveles de ATP inducida por estos compuestos.

Por otro lado, doxiciclina no afectó los niveles de ATP a ninguna de las concentraciones ensayadas (*Figura 43 y Figura 45*). Esto se debe a que doxiciclina

tiene un mecanismo de acción distinto respecto a los DLCs, estos últimos actúan dirigiéndose a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, desacoplando débilmente el sistema de fosforilación oxidativa. Mientras que la doxiciclina impide la formación de la cadena polipeptídica uniéndose a la subunidad 28S de los ribosomas mitocondriales, afectando la biogénesis mitocondrial, por lo cual no afecta directamente a la producción de ATP en los tiempos ensayados por nosotros, porque el tiempo de acción del compuesto no alcanza a generar un efecto en el contenido de ATP intracelular. Probablemente doxiciclina puede que tenga un efecto en el contenido de ATP intracelular, pero a tiempos de incubación mayores que los de nuestro experimento, esto debido a que el mecanismo de acción de doxiciclina requiere de más tiempo que los DLCs, estos últimos requieren un tiempo de acción más corto para evidenciar efectos en el contenido de ATP intracelular (Lin et al., 2018; Peredo-Silva et al., 2017; Zhang et al., 2017).

No hubo diferencias significativas entre resultados de normoxia hipoxia en ninguna línea celular ni compuesto, este tema será discutido más adelante en este texto (*Figura 44 y Figura 46*).

#### **d. Medición de potencial de transmembrana mitocondrial mediante TMRE**

La medición del potencial de transmembrana mitocondrial nos permite analizar como los compuestos tienen efecto en la mitocondria y el funcionamiento celular. En los cultivos de normoxia de la línea NCI-H727, no existieron diferencias significativas con ningún compuesto catiónico en ninguna concentración utilizada, ya que no hubo una caída en el potencial de membrana respecto al control. En los cultivos de hipoxia, con el catión Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 hubo una caída en el potencial a medida que iba aumentando la concentración, sin embargo, es una diferencia no significativa, mientras que en el compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 también hubo caídas en el potencial a medida que se aumentaba la concentración, pero esta diferencia solo fue estadísticamente significativa con la concentración de 2x IC<sub>50</sub> (*Figura 48, Figura 50*).

En la línea NCI-H1299 se presentaron resultados similares, ya que no hubo diferencias estadísticas en ambos tipos de cultivos con el compuesto Gálico-

TPP<sup>+</sup>C10, mientras que con Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 hubo una disminución en el potencial de membrana mitocondrial que fue significativa solo a concentración 2x IC<sub>50</sub> (Figura 52, Figura 54).

El efecto esperado con los cationes era una caída del potencial de membrana mitocondrial dependiente de la concentración. Si comparamos con resultados en la literatura, Sandoval-Acuña y cols. evaluaron el efecto de Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 y Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 en líneas celulares de cáncer de mama mediante la sonda safranina-O, los resultados presenciaron una caída del potencial de membrana mitocondrial dependiente de la concentración utilizada (a mayor concentración mayor caída del potencial). En nuestros experimentos se utilizaron concentraciones menores o iguales a 10,04  $\mu\text{M}$  para Gálico-TPP<sup>+</sup>C10 y de 8,02  $\mu\text{M}$  para Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 (ambas equivalentes al 2x IC<sub>50</sub> de hipoxia en NCI-H1299), en comparación a las concentraciones utilizadas en el estudio que fueron mayores (5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ). Esto podría explicar que en nuestro resultado existe una caída leve del potencial y que se debería experimentar con concentraciones mayores a la utilizadas porque el tiempo de incubación del compuesto en este experimento es menor que el tiempo de medición de los valores de IC<sub>50</sub> que son de al menos 24 horas (Sandoval-Acuña, C., et al., 2016).

Con doxiciclina no esperábamos que existieran cambios en el potencial de membrana mitocondrial, y efectivamente no existieron diferencias a ninguna concentración, en ninguna línea celular ni tipo de cultivo, esto debido al mecanismo de acción que tiene este compuesto, el cual no provoca una caída de potencial de membrana mitocondrial.

#### **e. Estudios de combinación de compuestos**

Los estudios de combinación nos permiten ver las interacciones que puedan tener 2 compuestos en relación al efecto farmacológico estudiado. Se le conoce como sinergia a la interacción de dos o más compuestos que produce un efecto total mayor que la suma de los efectos particulares de cada uno. Aditividad, es el efecto de un compuesto sumado al efecto del otro, no se potencian entre ellos si no que

se suma el efecto. Y antagonismo es la interacción de dos o más compuestos que contrarrestan su efecto.

### **Combinación entre Gálico-TPP+C10 y doxiciclina**

En los cultivos de normoxia de la línea celular NCI-H727 27 combinaciones de 36 tuvieron un comportamiento sinérgico (color verdoso-turquesa, color celeste-azul). Considerado que el  $IC_{50}$  de Gálico-TPP+C10 en esta línea celular a las 72 horas es de  $4,4 \mu M$  y el de doxiciclina es de  $14,4 \mu M$  si ubicamos estas concentraciones dentro de la matriz tenemos que existen 7 posibles combinaciones donde ocurre sinergia que se encuentran por debajo de los  $IC_{50}$  de ambos compuestos y que logran una gran citotoxicidad celular en esta línea celular (*Figura 55*).

En los cultivos de hipoxia de esta misma línea celular hubo 17 combinaciones estadísticamente significativas que dieron como resultado un efecto de sinergia, de un total de 36 posibles combinaciones. Hubo una disminución en las combinaciones sinérgicas respecto al cultivo de normoxia (27 combinaciones de sinergia en normoxia vs. 17 combinaciones de sinergia en hipoxia). Se destaca que hubo un efecto sinérgico importante en las combinaciones donde hay un color más celeste-azul. Al tener como parámetros de referencia los  $IC_{50}$  a 72 horas de los compuestos obtenidos en hipoxia, tenemos valores de  $4,04 \mu M$  para Gálico-TPP+C10 y de  $14,2 \mu M$  para doxiciclina, si se ubican estos valores dentro de la matriz de combinaciones tenemos 9 posibles combinaciones de las cuales 7 corresponden a un efecto de sinergia utilizando concentraciones menores a los  $IC_{50}$  de los compuestos y son estadísticamente significativo. Además, hubo efecto aditivo en 4 combinaciones (*Figura 56*).

Al comparar entre cultivos normóxicos-hipóxicos se observa que se repiten ciertas combinaciones en ambos cultivos, pero se destacan las combinaciones de  $1,9 \mu M$  Gálico-TPP+C10 +  $5 \mu M$  doxiciclina;  $3,62 \mu M$  Gálico-TPP+C10 +  $5 \mu M$  doxiciclina; y  $3,62 \mu M$  Gálico-TPP+C10 +  $7,92 \mu M$  doxiciclina, porque son combinaciones menores a los  $IC_{50}$  donde hubo sinergia en ambos tipos de cultivos.

En los cultivos normóxicos de la línea NCI-H1299 hubo 12 combinaciones donde existió sinergia estadísticamente significativa. También hubo 2 combinaciones con un efecto antagónico leve (amarillo). Se debe destacar el efecto sinérgico importante en 2 combinaciones originadas a partir del cruce de 6,9  $\mu\text{M}$  Gálico-TPP+C10 + 19,9  $\mu\text{M}$  doxiciclina y 6,9  $\mu\text{M}$  Gálico-TPP+C10 + 50  $\mu\text{M}$  doxiciclina, en ambas hubo una sinergia potente marcadas en color azul, que fueron estadísticamente significativas (*Figura 57*).

En contraste, los cultivos hipóxicos de la línea celular NCI-H1299, existieron 14 combinaciones sinérgicas, pero que en su mayoría fueron sinergias leves a moderadas, se destacan las sinergias originadas a partir del cruce de 25  $\mu\text{M}$  Gálico-TPP+C10 con las concentraciones de doxiciclina que van del 5 – 31,5  $\mu\text{M}$ . Al considerar los  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos en esta línea celular (5,02  $\mu\text{M}$  Gálico-TPP+C10 y 15,4  $\mu\text{M}$  doxiciclina) y ubicarlos dentro de las concentraciones, resalta la combinación de 1,9  $\mu\text{M}$  Gálico-TPP+C10 + 5  $\mu\text{M}$  doxiciclina, porque es una sinergia que se obtiene con concentraciones menores a los  $\text{IC}_{50}$  de cada compuesto. También hubo 2 combinaciones con antagonismo leve (amarillo-verdoso), que se contrasta frente a la gran cantidad de sinergias que hubo en otras combinaciones (*Figura 58*).

Este tipo de combinación entre el cruce de Gálico-TPP+C10 y doxiciclina ha sido estudiado por *Peredo-Silva, Fuentes-Retamal y colabs.* en experimentos *in vivo* en adenocarcinoma mamario. En el cual se evaluó el tamaño del tumor en ratones aplicando terapia con Gálico-TPP+C10 por si solo, doxiciclina por si sola, y la terapia conjunta entre ambos compuestos. Los resultados mostraron un efecto positivo y sinérgico en la combinación de estos compuestos, ya que el tamaño del tumor fue remitiendo al cabo de 30 días de la aplicación de la terapia y obtuvo mejores resultados que los compuestos por si solo (Peredo-Silva, L., et al., 2017).

Este importante hallazgo puede deberse a un efecto sinérgico, que puede explicarse por el uso de dos compuestos con diferentes mecanismos de acción: 1) desacoplamiento mitocondrial inducido por Gálico-TPP+C10, que desencadena estrés metabólico debido a una drástica reducción de ATP, acompañado de la liberación de factores proapoptóticos, y 2) inhibición de la biogénesis mitocondrial

por doxiciclina. El empleo simultáneo de estos dos conjuntos de actividades citotóxicas causa una sinergia considerable en las líneas tumorales.

### **Combinación entre Gentísico-TPP+C10 y doxiciclina**

En la línea celular NCI-H727 en cultivos de normoxia, existieron 26 combinaciones de un total de 36 donde existió un efecto de sinergia, destacan las combinaciones originadas desde 1 – 10  $\mu M$  de Gentísico-TPP+C10 y 5 – 12,8  $\mu M$  doxiciclina, donde hubo una sinergia estadísticamente significativa. Al tomar en cuenta los valores de  $IC_{50}$  de los compuestos en esta línea celular (1,75  $\mu M$  Gentísico-TPP+C10 y 14,4  $\mu M$  doxiciclina) y los posicionamos dentro de los valores de la matriz de combinaciones, tenemos que existen 6 combinaciones de un total de 6 donde hubo efecto de sinergia a menores concentraciones que los  $IC_{50}$  de cada compuesto, destacando la combinación de 1,58  $\mu M$  Gentísico-TPP+C10 + 5  $\mu M$  doxiciclina y 1,58  $\mu M$  Gentísico-TPP+C10 + 7,92  $\mu M$  doxiciclina, porque se encuentran en color azul dentro de la matriz (*Figura 59*).

En los cultivos de hipoxia de esta línea celular tenemos 21 combinaciones con sinergia estadísticamente significativa (disminuye la cantidad respecto a normoxia), donde destacan las combinaciones originadas por el cruce desde 1  $\mu M$  a 10  $\mu M$  de Gentísico-TPP+C10 y de 5  $\mu M$  a 7,92  $\mu M$  doxiciclina, por su efecto sinérgico potente. Tomando en consideración los  $IC_{50}$  de esta línea celular en hipoxia a las 72 horas (2,52  $\mu M$  Gentísico-TPP+C10 y 14,2  $\mu M$  doxiciclina) al ubicarlas en la matriz, tenemos que hay 7 combinaciones con sinergia de un total de 9 que son menores a las concentraciones de los  $IC_{50}$  siendo las más destacada 2,51  $\mu M$  Gentísico-TPP+C10 + 5  $\mu M$  doxiciclina y 1,58  $\mu M$  Gentísico-TPP+C10 + 5  $\mu M$  doxiciclina, esta última combinación se repite al igual que en el cultivo de normoxia, lo cual se perfila a ser una buena combinación. Además, existió una combinación con efecto aditivo (verde) (*Figura 60*).

En la línea celular NCI-H1299, existieron 19 combinaciones con sinergia en los cultivos de normoxia que fueron estadísticamente significativos, destacan los cruces ocurridos desde 3,98  $\mu M$  a 10  $\mu M$  de Gentísico-TPP+C10 y de 5  $\mu M$  a 31,5  $\mu M$  de doxiciclina. La sinergia más potente ocurrió en el cruce de 10  $\mu M$  Gentísico-

TPP+C10 + 7,92  $\mu\text{M}$  doxiciclina (*Figura 61*). Contrastando con los cultivos de hipoxia, hubo 17 combinaciones con sinergia, y 4 combinaciones con efecto aditivo y 6 combinaciones con efecto antagónico. Teniendo en cuenta los  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos en hipoxia (4,01  $\mu\text{M}$  Gentísico-TPP+C10 y 15,4  $\mu\text{M}$  doxiciclina), tenemos que existen 11 combinaciones sinérgicas de un total de 12, se perfilan como buenas candidatas 1,58  $\mu\text{M}$  Gentísico-TPP+C10 + 5  $\mu\text{M}$  doxiciclina y 2,51  $\mu\text{M}$  Gentísico-TPP+C10 + 5  $\mu\text{M}$  doxiciclina, porque generan sinergia a concentraciones menores que los  $\text{IC}_{50}$  de cada compuesto (*Figura 62*).

*Fuentes-Retamal y colabs.* evaluaron el efecto de Gentísico-TPP+C10 en líneas celulares de cáncer de mama, en sus experimentos demostraron que el estrés metabólico inducido por este compuesto aumenta la expresión de la proteína 1 $\alpha$  coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1  $\alpha$ ) (Fuentes-Retamal, S., 2020), esta proteína tiene un papel ampliamente descrito en la biogénesis mitocondrial, y se encuentra modulada por AMPK (Jornayvaz, F. R., Shulman, G. I. 2010).

Recordemos que AMPK es capaz de censar la caída de ATP, por lo tanto, los cationes lipofílicos tienen un efecto desacoplador que induce una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo que conduce a una disminución de la síntesis de ATP celular y activación de AMPK relacionada con el desequilibrio bioenergético y también como mecanismo de compensación celular, este modula a PGC-1  $\alpha$  que es el encargado de regular la biogénesis mitocondrial (Jara, J. A., et al., 2020; Popov L. D., 2020).

Por otro lado, el efecto de doxiciclina en la combinación inhibe la biogénesis mitocondrial, porque este compuesto impide de la formación de la cadena polipeptídica uniéndose a la subunidad 28 S de los ribosomas mitocondriales, esto conlleva a la no formación de proteínas necesarias para la biogénesis mitocondrial, llevando a las células a un estado de colapso metabólico.

La hipoxia es un componente importante del cáncer a través de HIF-1. Existe evidencia que indica el papel de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  en el crecimiento y la recurrencia del cáncer inducido por TICs, por ejemplo la unión directa de HIF-2 $\alpha$  a elementos

de respuesta hipóxica ubicado en las regiones promotoras mejora la expresión de genes de pluripotencia como Sox2, Nanog y Oct4. También es posible inducir la transición epitelial-mesenquimal y activar vías de señalización TGF- $\beta$ , WNT, Notch (Hajizadeh, F., Okoye, I., Esmaily, M., et. al., 2019; Najafi, M., Farhood, B., Mortezaee, K., et. al., 2020).

En nuestros experimentos al cultivar las células en hipoxia por solo 24 horas y luego realizar los experimentos en condiciones de normoxia, es probable que las células vayan perdiendo características que habían adquirido mientras estaban en hipoxia, lo que explicaría por qué en algunos de nuestros experimentos las células se comportaron de manera similar frente a los fármacos en condiciones hipóxicas o normóxicas.

Por esta razón, como proyección a este trabajo proponemos realizar un western blot, y evaluar la expresión de HIF-1 $\alpha$ , a diferentes tiempos, por ejemplo medir HIF-1 $\alpha$  al tiempo 0 de sacar las células de hipoxia, luego al tiempo de 24, 48 y 72 horas que fue el tiempo máximo al cual se llevo a cabo los experimentos (Wu, D., Yotnda, P., 2011).

Otra técnica que se trató de implementar para llevar a cabo la hipoxia en las células era primero trabajar con células en normoxia, para posteriormente contarlas y sembrarlas en placas, con el objetivo de llevar estas placas a una cámara de hipoxia, y de esta forma las células se adhirieran a la placa mientras pasaban 24 h de hipoxia. Sin embargo al hacer este proceso, una gran cantidad de células no se adhirió a la placa y quedaban flotando por lo cual no era posible estandarizar la misma cantidad de células en cada pocillo.

Una alternativa es el uso de incubadoras de hipoxia conectadas a tanques de gas premezclado o sistemas de mezcla de gases, que permite la experimentación y los cambios de medios de cultivo y manipulación de células en un ambiente hipóxico continuo (Wu, D., Yotnda, P., 2011).

En la literatura existe controversia sobre si la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es inducida por una hipoxia continua o por reoxigenación. En 2016,

*Zhang y colabs.* realizaron un estudio donde evaluaron la formación de ROS en células de cáncer cervico-uterino (HeLa) y concluyeron que la reoxigenación producía formación de ROS, por contraparte *Wei y colabs.* también evaluaron ROS en células de cáncer de pulmón (A549) y determinaron que la cantidad de ROS en las células aumenta con la prolongación del tiempo de hipoxia. En ambos casos la producción de ROS provoca muerte celular (Zhang, K., Zhao, T., Huang, X., et. al., 2016; Wei, Y. L., Dong, H. M., Xie, Z. F., et. al., 2017).

Existen estudios que describen que para observar un mayor porcentaje de TICs es posible a través de modelos 3D *in vitro*, porque ese modelo trata de emular condiciones similares a lo que ocurre en un tumor. Además, al tener este modelo en hipoxia, estas condiciones ayudan activamente al crecimiento de varios factores tumorales a través de los factores inducibles por hipoxia (HIF) y son capaz de inducir el aumento de la proporción de TICs (Xu, X. X., Liu, C., Liu, Y., et al., 2014; Bhattacharya, S., Calar, K., & de la Puente, P., 2020; Pavlacky, J., Polak, J., 2020). De esta manera utilizando otros modelos podríamos corroborar si efectivamente los marcadores planteados en este trabajo verían modificada su expresión.

## VII. CONCLUSIONES

Las TICs o CSC, son un pequeño subgrupo de células con características específicas similares a células madres, si bien se encontraron células con marcadores positivos a TICs, no es posible asegurar que esa población corresponde realmente a este pequeño subgrupo. Se sugiere utilizar otros marcadores de CSC para comprobar si existe este subgrupo dentro de las líneas celulares trabajadas.

Los experimentos realizados en este trabajo de investigación nos permiten concluir que los compuestos estudiados tienen una acción citotóxica sobre las líneas celulares tumorales, esta acción es dependiente del tiempo al que están expuestas las células y de la concentración del compuesto.

El compuesto Gentísico-TPP<sup>+</sup>C10 tiene una acción sobre el potencial de transmembrana mitocondrial y con una disminución en el contenido de ATP intracelular. A diferencia de Gálico-TPP<sup>+</sup>C10, que también se esperaba un efecto en el potencial de transmembrana, pero que si hubo una disminución del contenido de ATP intracelular. Ambas moléculas tienen un efecto que altera la bioenergética mitocondrial conduciendo a las células a un estrés metabólico conducente a la muerte celular.

Doxiciclina a diferencia de las moléculas mencionadas anteriormente, no conduce a una alteración del potencial de transmembrana, ni tampoco existió una disminución del ATP intracelular bajo nuestras condiciones experimentales, lo cual es indicativo que doxiciclina tiene un mecanismo de acción distinto a los DLCs.

Si bien en nuestros experimentos de medición de ATP, medición de potencial de transmembrana y marcadores de TICs, las células cultivadas en hipoxia no presentaron diferencias con células de normoxia, en algunos experimentos de viabilidad celular si existió una diferencia en las concentraciones usadas generalmente con un IC<sub>50</sub> más alto para células de hipoxia. A pesar de esto se debe comprobar la existencia de diferencias entre ambas poblaciones a través de marcadores de hipoxia.

Las combinaciones de Gálico-TPP+C10 y doxiciclina / Gentísico-TPP+C10 y doxiciclina son prometedoras, ya que se observa el efecto de sinergia en un porcentaje considerable de cruces de concentraciones realizadas, incluso con valores inferiores a los IC<sub>50</sub> de cada compuesto utilizado. Se propone esta estrategia combinada basada en el bloqueo (con doxiciclina) de la respuesta adaptativa inducida por inhibición bioenergética mitocondrial (causada por los DLCs). Es por esto que es importante seguir estudiando estas combinaciones en otros modelos como en 3D in vitro o modelo in vivo para establecer si este tratamiento es una estrategia candidata valiosa para la lucha contra el cáncer de pulmón.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alberg, A. J., Brock, M. V, Ford, J. G., Samet, J. M., & Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5 Suppl), e1S-e29S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>

Ali, I., Alfarouk, K. O., Reshkin, S. J., & Ibrahim, M. E. (2017). Doxycycline as Potential Anti-cancer Agent. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(12). <https://doi.org/10.2174/1871520617666170213111951>

American Cancer Society. (2019). Cancer facts and figures. Recuperado de <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>

Amorín Kajatt, E. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1), 85–92. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342013000100017>

Atashzar, M. R., Baharlou, R., Karami, J., Abdollahi, H., Rezaei, R., Pourramezan, F., & Zoljalali Moghaddam, S. H. (2020). Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *Journal of cellular physiology*, 235(2), 790–803. <https://doi.org/10.1002/jcp.29044>

Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical biochemistry*, 508, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>

Bag, A., & Ghorai, P. K. (2016). Development of Quantum Chemical Method to Calculate Half Maximal Inhibitory Concentration (IC50 ). *Molecular informatics*, 35(5), 199–206. <https://doi.org/10.1002/minf.201501004>

Bernhardt, E. B., & Jalal, S. I. (2016). Small Cell Lung Cancer. *Cancer treatment and research*, 170, 301–322. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_14)

Bhattacharya, S., Calar, K., & de la Puente, P. (2020). Mimicking tumor hypoxia and tumor-immune interactions employing three-dimensional in vitro models. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 39(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01583-1>

Boukalova, S., Rohlenova, K., Rohlena, J., & Neuzil, J. (2018). Mitocans: Mitochondrially targeted anti-cancer drugs. In *Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics* (pp. 613–635). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-73344-9\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-319-73344-9_27)

Brenner, A. V, Wang, Z., Kleinerman, R. A., Wang, L., Zhang, S., Metayer, C., ... Lubin, J. H. (2001). Previous pulmonary diseases and risk of lung cancer in Gansu Province, China. *International Journal of Epidemiology*, 30(1), 118–124. <https://doi.org/10.1093/ije/30.1.118>

Brody, H. (2014). Lung cancer. *Nature*, 513(7517), S1–S1. <https://doi.org/10.1038/513S1a>

Cao, X. H., Zhao, S. S., Liu, D. Y., Wang, Z., Niu, L. L., Hou, L. H., & Wang, C. L. (2011). ROS-Ca<sup>2+</sup> is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 190(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.01.010>

Catalán, M., Castro-Castillo, V., Gajardo-de la Fuente, J., Aguilera, J., Ferreira, J., Ramires-Fernández, R., Olmedo, I., Molina-Berríos, A., Palominos, C., Valencia, M., A., y Jara, J. A. (2020). Síntesis de flujo continuo de cationes lipofílicos derivados del ácido benzoico como nuevas entidades químicas citotóxicas en las líneas celulares del carcinoma de cabeza y cuello humano. *Química medicinal RSC*, 11(10), 1210-1225. <https://doi.org/10.1039/d0md00153h>

Chen, L. B. (1988). Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annual Review of Cell Biology*, Vol. 4, pp. 155–181. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.001103>

Chen, Y. C., Hsu, H. S., Chen, Y. W., Tsai, T. H., How, C. K., Wang, C. Y., Hung, S. C., Chang, Y. L., Tsai, M. L., Lee, Y. Y., Ku, H. H., & Chiou, S. H. (2008). Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PloS one*, 3(7), e2637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002637>

Choubey S, Goyal S, Varughese LR, Kumar V, Sharma AK, Beniwal V. Probing Gallic Acid for Its Broad Spectrum Applications. *Mini Rev Med Chem*. 2018;18(15):1283-1293. doi: 10.2174/1389557518666180330114010. PMID: 29600764.

Chrysanthakopoulos, N. A. (2016). Correlation between periodontal disease indices and lung cancer in Greek adults: a case-control study. *Experimental Oncology*, 38(1), 49–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27031720>

Couraud, S., Zalcman, G., Milleron, B., Morin, F., & Souquet, P.-J. (2012). Lung cancer in never smokers – A review. *European Journal of Cancer*, 48(9), 1299–1311. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.03.007>

Dawood, S., Austin, L., & Cristofanilli, M. (2014). Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 28(12), 1101–1110.

Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 605–644. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001>

Deweerd, S. (2014). Aetiology: Crucial clues. *Nature*, 513(7517), S12–S13. <https://doi.org/10.1038/513S12a>

Donoff, R. B., Albert, T., Olson, D. J., & Guralnick, W. (1976). Metastatic bronchogenic carcinoma to the mandible. *Journal of Oral Surgery (American Dental Association)*: 1965), 34(11), 1007–1011. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/185346>

Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 32(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>

Evans, M. (2013). Lung cancer: needs assessment, treatment and therapies. *British Journal of Nursing*, 22(Sup17), S15–S22. <https://doi.org/10.12968/bjon.2013.22.Sup17.S15>

Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Limonta, P., & Gagliano, N. (2019). Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells. *Cells*, 8(2), 143. <https://doi.org/10.3390/cells8020143>

Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Peredo-Silva, L., Guzmán-Rivera, D., Pavani, M., Torrealba, N., Truksa, J., Castro-Castillo, V., Catalán, M., Kemmerling, U., Urra, F. A., & Ferreira, J. (2020). Complex Mitochondrial Dysfunction Induced by TPP+-Gentisic Acid and Mitochondrial Translation Inhibition by Doxycycline Evokes Synergistic Lethality in Breast Cancer Cells. *Cells*, 9(2), 407. <https://doi.org/10.3390/cells9020407>

Fulda, S., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(6), 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd3137>

García García, V. G.-M. M. & B. M. A. (2005). Bases moleculares del cáncer oral: Revisión bibliográfica. 287–295. Recuperado de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-12852005000600002](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852005000600002)

Gatenby, R. A., & Gawlinski, E. T. (2003). The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer research*, 63(14), 3847–3854.

Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, 17(12), 725–737. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.87>

Gillies, R. J., Robey, I., & Gatenby, R. A. (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *Journal of Nuclear Medicine*, Vol. 49. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.047258>

Global Cancer Observatory, & International Agency for Research on Cancer. (2021). *Cancer Today*. Retrieved July 7, 2021, from International Agency For Research on Cancer website: <https://gco.iarc.fr/today/home>

Glumac, P. M., & LeBeau, A. M. (2018). The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clinical and translational medicine*, 7(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0198-1>

Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends in Cell Biology*, Vol. 18, pp. 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.01.006>

Gomes, M., Teixeira, A. L., Coelho, A., Araújo, A., & Medeiros, R. (2014). The Role of Inflammation in Lung Cancer. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 816, pp. 1–23). [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8_1)

Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 30–44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>

Hajizadeh, F., Okoye, I., Esmaily, M., Ghasemi Chaleshtari, M., Masjedi, A., Azizi, G., Irandoust, M., Ghalamfarsa, G., & Jadidi-Niaragh, F. (2019). Hypoxia inducible factors in the tumor microenvironment as therapeutic targets of cancer stem cells. *Life sciences*, 237, 116952.

Halestrap, A. P., & Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family - From monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 447, pp. 619–628. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1067-2>

Heiden, M. G. Vander, Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, Vol. 324, pp. 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>

Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V, Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran, W. J., Wu, Y.-L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*, 389(10066), 299–311. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30958-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8)

Hong, Q.-Y., Wu, G.-M., Qian, G.-S., Hu, C.-P., Zhou, J.-Y., Chen, L.-A., Bai, C.-X. (2015). Prevention and management of lung cancer in China. *Cancer*, 121(S17), 3080–3088. <https://doi.org/10.1002/cncr.29584>

Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703–707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>

Hu, Z., Wu, C., Shi, Y., Guo, H., Zhao, X., Yin, Z., Shen, H. (2011). A genome-wide association study identifies two new lung cancer susceptibility loci at 13q12.12 and 22q12.2 in Han Chinese. *Nature Genetics*, 43(8), 792–796. <https://doi.org/10.1038/ng.875>

International Agency for Research on Cancer. (2020). Chile - Global Cancer Observatory. Retrieved July 7, 2021, from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/152-chile-fact-sheets.pdf>

Irani, S. (2017). Metastasis to the Jawbones: A review of 453 cases. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, Vol. 7, pp. 71–81. [https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD\\_512\\_16](https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_512_16)

Ito, H., Onizawa, K., & Satoh, H. (2017). Non-small-cell lung cancer metastasis to the oral cavity: A case report. *Molecular and Clinical Oncology*, 6(3), 422–424. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1141>

Jara, J. A., Castro-Castillo, V., Saavedra-Olavarría, J., Peredo, L., Pavanni, M., Jaña, F., Ferreira, J. (2014). Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in

singenic mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(6), 2440–2454. <https://doi.org/10.1021/jm500174v>

Jara, J. A., Rojas, D., Castro-Castillo, V., Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Parra, E., Pavani, M., Maya, J. D., Ferreira, J., & Catalán, M. (2020). Novel benzoate-lipophilic cations selectively induce cell death in human colorectal cancer cell lines. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 65, 104814. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104814>

Jimenez de la Jara, J., Bastias, G., Ferreccio, C., Moscoso, C., Sagues, S., Cid, C., Owen, G. I. (2015). A snapshot of cancer in Chile: analytical frameworks for developing a cancer policy. *Biological Research*, 48(1), 10. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-48-10>

Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry*, 47, 69–84. <https://doi.org/10.1042/bse0470069>

Kalemkerian, G. (2016). Small Cell Lung Cancer. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(05), 783–796. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1592116>

Kamat, R., Shetye, O., Akkara, F., & Dhupar, V. (2014). Mandibular metastasis from a pulmonary squamous cell carcinoma. *Annals of Maxillofacial Surgery*, 4(1), 103. <https://doi.org/10.4103/2231-0746.133086>

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science : AMS*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 11, pp. 325–337. <https://doi.org/10.1038/nrc3038>

Korshunov, D. A., Kondakova, I. V., & Shashova, E. E. (2019). Modern Perspective on Metabolic Reprogramming in Malignant Neoplasms. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 84, pp. 1129–1142. <https://doi.org/10.1134/S000629791910002X>

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., & Hermoso, M. A. (2014). Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research*, 2014, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2014/149185>

Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y.-W., & Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1856(2), 189–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>

Leon, G., MacDonagh, L., Finn, S. P., Cuffe, S., & Barr, M. P. (2016). Cancer stem cells in drug resistant lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 158, pp. 71–90. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.12.001>

Leung, E. L., Fiscus, R. R., Tung, J. W., Tin, V. P., Cheng, L. C., Sihoe, A. D., Fink, L. M., Ma, Y., & Wong, M. P. (2010). Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PloS one*, 5(11), e14062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014062>

Lin, C. C., Lo, M. C., Moody, R. R., Stevers, N. O., Tinsley, S. L., & Sun, D. (2018). Doxycycline targets aldehyde dehydrogenase-positive breast cancer stem cells. *Oncology Reports*, 39(6), 3041–3047. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6337>

Liu, J., Xiao, Z., Wong, S. K., Tin, V. P., Ho, K. Y., Wang, J., Sham, M. H., & Wong, M. P. (2013). Lung cancer tumorigenicity and drug resistance are maintained through ALDH(hi)CD44(hi) tumor initiating cells. *Oncotarget*, 4(10), 1698–1711. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1246>

Locatelli, C., Filippin-Monteiro, F. B., & Creczynski-Pasa, T. B. (2013). Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 60, pp. 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.056>

Lopez-Ayllon, B. D., Moncho-Amor, V., Abarrategi, A., Ibañez de Cáceres, I., Castro-Carpeño, J., Belda-Iniesta, C., ... Sastre, L. (2014). Cancer stem cells and cisplatin-resistant cells isolated from non-small-lung cancer cell lines constitute related cell populations. *Cancer Medicine*, 3(5), 1099–1111. <https://doi.org/10.1002/cam4.291>

Luna-Ortiz P, Flores-Chávez P, Martínez-Rosas M. (2014). Las mitocondrias como blanco terapéutico. *Rev Mex Anest.* 37(4):283-296. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=54354>

MacDonagh, L., Gray, S. G., Breen, E., Cuffe, S., Finn, S. P., O'Byrne, K. J., & Barr, M. P. (2016). Lung cancer stem cells: The root of resistance. *Cancer Letters*, 372(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.012>

MacDonagh, L., Gray, S. G., Breen, E., Cuffe, S., Finn, S. P., O'Byrne, K. J., & Barr, M. P. (2016). Lung cancer stem cells: The root of resistance. *Cancer Letters*, 372(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.012>

Maiuthed, A., Chantarawong, W., & Chanvorachote, P. (2018). Lung cancer stem cells and cancer stem cell-targeting natural compounds. *Anticancer Research*, Vol. 38, pp. 3797–3810. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12663>

Maiuthed, A., Chantarawong, W., & Chanvorachote, P. (2018). Lung Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell-targeting Natural Compounds. *Anticancer research*, 38(7), 3797–3809. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12663>

Mao, Y., Yang, D., He, J., & Krasna, M. J. (2016). Epidemiology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.001>

Mathupala, S. P., Colen, C. B., Parajuli, P., & Sloan, A. E. (2007). Lactate and malignant tumors: A therapeutic target at the end stage of glycolysis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. 39, pp. 73–77. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9062-x>

McErlean, A. (2011). Epidemiology of Lung Cancer. *Seminars in Roentgenology*, 46(3), 173–177. <https://doi.org/10.1053/J.RO.2011.02.002>

Michaud, D. S., Fu, Z., Shi, J., & Chung, M. (2017). Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk. *Epidemiologic Reviews*, 39(1), 49–58. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxx006>

Michaud, D. S., Liu, Y., Meyer, M., Giovannucci, E., & Joshipura, K. (2008). Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *The Lancet Oncology*, 9(6), 550–558. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70106-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70106-2)

Michaud, D. S., Lu, J., Peacock-Villada, A. Y., Barber, J. R., Joshi, C. E., Prizment, A. E., ... Platz, E. A. (2018). Periodontal Disease Assessed Using Clinical Dental Measurements and Cancer Risk in the ARIC Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 110(8), 843–854. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx278>

Misir, A., Mercan, U., & Günhan, Ö. (2013). Metastasis of lung adenocarcinoma to the mandible: Report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 17(2), 253–256. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.119745>

Morales, A., Bravo, J., Baeza, M., Werlinger, F., & Gamonal, J. (2016). Las enfermedades periodontales como enfermedades crónicas no transmisibles: Cambios en los paradigmas. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 9(2), 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.004>

Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., & Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal*, 274(6), 1393–1418. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>

Moss, R. L. (1961). Metastasis of bronchogenic carcinoma to the mandible. Report of a case. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 14(12), 1501–1509. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(61\)90254-7](https://doi.org/10.1016/0030-4220(61)90254-7)

Murphy, M. P. (2008, July). Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, Vol. 1777, pp. 1028–1031. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.029>

Najafi, M., Farhood, B., Mortezaee, K., Kharazinejad, E., Majidpoor, J., & Ahadi, R. (2020). Hypoxia in solid tumors: a key promoter of cancer stem cell (CSC) resistance. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(1), 19–31. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03080-1>

Nasim, F., Sabath, B. F., & Eapen, G. A. (2019). Lung Cancer. *The Medical Clinics of North America*, 103(3), 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.006>

National Cancer Institute. (2017). Metastatic Cancer - National Cancer Institute. Retrieved August 16, 2019, from NCI website: <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>

National Cancer Institute. (2020). Targeted Therapy to Treat Cancer - National Cancer Institute. Retrieved September 13, 2021, from NCI website: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>

Neuzil, J., Dong, L. F., Rohlena, J., Truksa, J., & Ralph, S. J. (2013, May). Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion*, Vol. 13, pp. 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.07.112>

Pavlacky, J., & Polak, J. (2020). Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models. *Frontiers in endocrinology*, 11, 57. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00057>

Pazo R.A., Álvarez, M., Cebollero de Miguel, A., Agustín M.J., Martínez L., Anel Bernal, A., Pérez J.L., Antón Torres A. (2012). Apoptosis. *cáncer & Co | REGIO. Revista Internacional de Grupos en Investigación en Oncología*. Retrieved from <https://www.elsevier.es/es-revista-regio-revista-internacional-grupos-investigacion-339-articulo-apoptosis-cancer-co-X225364501243094X>

Peredo-Silva, L., Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Pavani, M., Maya, J. D., Castro-Castillo, V., ... Ferreira, J. (2017). Derivatives of alkyl gallate triphenylphosphonium exhibit antitumor activity in a syngeneic murine model of mammary adenocarcinoma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 334–346. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.06.017>

Popov L. D. (2020). Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(9), 4892–4899. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15194>

Raja Lakshmi, C., Sudhakara Rao, M., Bhavana, S. M., & Sathish, S. (2014). Primary Squamous Cell Carcinoma of Lung Leading to Metastatic Jaw Tumor. *Case Reports in Pulmonology*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/392616>

Rajinikanth, M., Prakash, A., Swathi, T., & Reddy, S. (2015). Metastasis of lung adenocarcinoma to the jaw bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 19(3), 385–388. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.174624>

Rakoff-Nahoum, S. (2006). Why cancer and inflammation? *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 79(3–4), 123–130. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940622>

Ralph, S. J., & Neuzil, J. (2009, January). Mitocans, a class of emerging anti-cancer drugs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(1), 7–8. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200890054>

Remedios, A., Cutiño, M., Perez Z., (2016). Papel de la reprogramación metabólica en la carcinogénesis. 20. 292-304. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1560-43812016000200007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000200007)

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>

Ross, M. F., Kelso, G. F., Blaikie, F. H., James, A. M., Cocheme, H. M., Filipovska, A., ... Murphy, M. P. (2005). Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in

mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biokhimiya*, 70(2), 273–283.  
<https://doi.org/10.1007/s10541-005-0104-5>

Sabari, J. K., Lok, B. H., Laird, J. H., Poirier, J. T., & Rudin, C. M. (2017). Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(9), 549. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2017.71>

Sandoval-Acuña, C., Fuentes-Retamal, S., Guzmán-Rivera, D., Peredo-Silva, L., Madrid-Rojas, M., Rebolledo, S., Castro-Castillo, V., Pavani, M., Catalán, M., Maya, J. D., Jara, J. A., Parra, E., Calaf, G. M., Speisky, H., & Ferreira, J. (2016). Destabilization of mitochondrial functions as a target against breast cancer progression: Role of TPP(+)-linked-polyhydroxybenzoates. *Toxicology and applied pharmacology*, 309, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.08.018>

Schwartz, A. G., & Cote, M. L. (2016). Epidemiology of Lung Cancer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_2)

Semenza, G. L. (2010, February). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol. 20, pp. 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.009>

Shukla, S., Khan, S., Sinha, S., & Meeran, S. M. (2018). Lung Cancer Stem Cells: An Epigenetic Perspective. *Current cancer drug targets*, 18(1), 16–31. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170206104623>

Sleeman, J., & Steeg, P. S. (2010). Cancer metastasis as a therapeutic target. *European Journal of Cancer*, 46(7), 1177–1180. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.039>

Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial., B., Martínez-Barba, E., Rodríguez González, M. A., Palazón Tovar, T., Villanueva San Vicente, V., Amorós García, M. D., ... Méndez Trujillo, S. (2001). *Revista española de cirugía oral y maxilofacial: Publicación Oficial de la Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, ISSN 1130-0558, ISSN-e 2173-9161, Vol. 23, No. 1, 2001, págs. 27-

31 (Vol. 23). Retrieved from  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2239455>

Tanaka, M., Hiraki, A., Ueoka, H., Bessho, A., Kiura, K., Takigawa, N., ... Harada, M. (2002). Gingival metastasis in lung cancer. *Oncology Reports*, 9(3), 571–574. <https://doi.org/10.3892/or.9.3.571>

Tower, J. (2012). Stress and stem cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(6), 789–802. <https://doi.org/10.1002/wdev.56>

Vazquez, A., Liu, J., Zhou, Y., & Oltvai, Z. N. (2010). Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. *BMC Systems Biology*, 4. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-58>

Viale, A., Corti, D., & Draetta, G. F. (2015, September 15). Tumors and mitochondrial respiration: a neglected connection. *Cancer Research*, Vol. 75, pp. 3685–3686. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0491>

Vieira, B. J., Aarestrup, F. M., Carvalho Da Fonseca, E., & Dias, E. P. (2001). Bilateral gingival metastasis of lung adenocarcinoma: Report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 59(10), 1224–1225. <https://doi.org/10.1053/joms.2001.26731>

Vineis, P., Alavanja, M., Buffler, P., Fontham, E., Franceschi, S., Gao, Y. T., ... Doll, R. (2004). Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 96(2), 99–106. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh014>

Walker, S. (2008). Updates in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 12(4), 587–596. <https://doi.org/10.1188/08.CJON.587-596>

Wang, D., Zhao, C., Xu, F., Zhang, A., Jin, M., Zhang, K., Liu, L., Hua, Q., Zhao, J., Liu, J., Yang, H., & Huang, G. (2021). Cisplatin-resistant NSCLC cells induced by hypoxia transmit resistance to sensitive cells through exosomal PKM2. *Theranostics*, 11(6), 2860–2875. <https://doi.org/10.7150/thno.51797>

Waqar, S. N., & Morgensztern, D. (2017). Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). *Pharmacology & Therapeutics*, 180, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.002>

Wei, Y. L., Dong, H. M., Xie, Z. F., & Cai, S. X. (2017). Role of reactive oxygen species in hypoxia-induced non-small cell lung cancer migration, 97(40), 3174–3178. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.40.012>

Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Induction and testing of hypoxia in cell culture. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (54), 2899. <https://doi.org/10.3791/2899>

Xie L, Bourne PE. Developing multi-target therapeutics to fine-tune the evolutionary dynamics of the cancer ecosystem. *Front Pharmacol.* (2015) 24;6:209. doi: 10.3389/fphar.2015.00209. PMID: 26441664; PMCID: PMC4585080.

Xu, X. X., Liu, C., Liu, Y., Yang, L., Li, N., Guo, X., Sun, G. W., & Ma, X. J. (2014). Enrichment of cancer stem cell-like cells by culture in alginate gel beads. *Journal of biotechnology*, 177, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.016>

Yan, B., Dong, L., & Neuzil, J. (2016). Mitochondria: An intriguing target for killing tumour-initiating cells. *Mitochondrion*, Vol. 26, pp. 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.12.007>

Yao, Q.-W., Zhou, D.-S., Peng, H.-J., Ji, P., & Liu, D.-S. (2014). Association of periodontal disease with oral cancer: a meta-analysis. *Tumor Biology*, 35(7), 7073–7077. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1951-8>

Ye, L., Jiang, Y., Liu, W., & Tao, H. (2016). Correlation between periodontal disease and oral cancer risk: A meta-analysis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(8), 237. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.200746>

Ye, X. Q., Li, Q., Wang, G. H., Sun, F. F., Huang, G. J., Bian, X. W., ... Qian, G. S. (2011). Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *International Journal of Cancer*, 129(4), 820–831. <https://doi.org/10.1002/ijc.25944>

Ye, X. Q., Wang, G. H., Huang, G. J., Bian, X. W., Qian, G. S., & Yu, S. C. (2011). Heterogeneity of Mitochondrial Membrane Potential: A Novel Tool to Isolate and Identify Cancer Stem Cells from a Tumor Mass? *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(1), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9122-9>

You, B. R., Moon, H. J., Han, Y. H., & Park, W. H. (2010). Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1334–1340. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.034>

Yuan, H. X., Xiong, Y., & Guan, K. L. (2013). Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Molecular cell*, 49(3), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.019>

Zeng, X.-T., Xia, L.-Y., Zhang, Y.-G., Li, S., Leng, W.-D., & Kwong, J. S. W. (2016). Periodontal Disease and Incident Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Journal of Periodontology*, 87(10), 1158–1164. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.150597>

Zhang, K., Zhao, T., Huang, X., He, Y., Zhou, Y., Wu, L., Wu, K., Fan, M., & Zhu, L. (2016). Dissolved oxygen concentration in the medium during cell culture: Defects and improvements. *Cell biology international*, 40(3), 354–360. <https://doi.org/10.1002/cbin.10570>

Zhang, L., Xu, L., Zhang, F., & Vlashi, E. (2017). Doxycycline inhibits the cancer stem cell phenotype and epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Cell Cycle*, Vol. 16, pp. 737–745. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1241929>