

**TRATAMIENTO SELECTIVO DE CÁNCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO,
AFECTANDO LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

Presentado por:
SANDRA MILENA SANABRIA BARRERA



**Universidad del Valle
Facultad de Salud
Escuela de Ciencias Básicas
Santiago de Cali, Colombia
Agosto, 2017**

**TRATAMIENTO SELECTIVO DE CÁNCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO,
AFECTANDO LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

SANDRA MILENA SANABRIA BARRERA

Trabajo de investigación para optar al título de
Doctor en Ciencias Biomédicas

Dirigido por:

Marcos López Casillas, PhD
Director de Biotecnología
Director Grupo de Investigación Biomédica Traslacional
Fundación Cardiovascular de Colombia

**Universidad del Valle
Facultad de Salud
Escuela de Ciencias Básicas
Santiago de Cali, Colombia
Agosto, 2017**

**TRATAMIENTO SELECTIVO DE CÁNCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO,
AFECTANDO LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

SANDRA MILENA SANABRIA BARRERA

CONCEPTO:

COMITÉ EVALUADOR

JURADO 1

JURADO 2

JURADO 3

JURADO 4

Santiago de Cali, Colombia

*Dedico esta tesis al forjador de mi camino, a mi Padre Celestial, el que me
acompaña y siempre me levanta de mi continuo tropezar.
A mi incondicional y amoroso esposo Luis Alberto.
A la prolongación de mi existencia, mis hijos Diego Alejandro y Daniel Santiago.
Y a quienes me dieron la vida, mi heroína madre y mi padre que está en el cielo.*

**“Hay una fuerza motriz más poderosa que
el vapor, la electricidad y la energía atómica:
la voluntad”**

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

Han sido 7 años llenos de esfuerzo, constancia, dedicación, alegrías, tristezas, ganancias y grandes pérdidas, sensaciones que nunca olvidaré, pero, sobre todo, he estado rodeada de grandes seres humanos que me ofrecieron una mano, un hombro, un oído cuando más lo necesité, es por esta razón que me resulta especialmente emotivo escribir estas líneas.

Debo agradecer en principio a quien hizo posible este sueño, el Dr. Marcos López, quien el año 2009 empezó a trabajar en la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV), y debido a su gestión se inició por primera vez el convenio de formación de estudiantes de doctorado con la Universidad del Valle. Este invaluable hecho, abrió las posibilidades a que no solamente yo, sino otras personas pudieran iniciar sus estudios doctorales desde la ciudad de Bucaramanga en una de las mejores Universidades del país. En mi caso particular, siendo madre de dos niños (4 y 6 años), esposa, trabajadora, y enfrentando una situación personal después del fallecimiento de mi hermano mayor y enfermedad de mi padre, no era fácil pensar en irme de Bucaramanga para estudiar un Doctorado. Es por esta razón que siempre estaré eternamente agradecida con los Doctores Marcos López, Víctor Raúl Castillo (Presidente-FCV), Leonardo Fierro (Director programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad del Valle 2011).

Dr. Marcos, fue un camino difícil, iniciar un proceso de formación doctoral en un laboratorio que iniciaba de cero. Recuerdo haber abierto varias cajas de equipos con los cuales pasaría los siguientes 7 años. Cambiamos tres veces el proyecto de tesis, hasta que llegamos al gran trabajo que desarrollamos y que nos brindó grandes celebraciones. Gracias a su dirección tuve la oportunidad de salir del país a representar por primera vez a Colombia en prestigiosos eventos, a los cuales usted asistió cuando estaba en su proceso de formación en el Medical College of Wisconsin. Además de retarme constantemente, siempre confió en mí y vio lo que podía hacer, mucho antes de que yo misma lo viera. Siempre estaré agradecida querido amigo.

Agradezco también a la FCV, dado que me permitió trabajar y estudiar, además de brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto con recursos propios de la institución, mientras implementaba el primer Banco de Tejidos Osteomuscular de la región, confiando siempre en mi trabajo y apoyando mi proceso de formación. Gracias Dr. Castillo, usted ha sido como un padre para mí en esta institución, desde hace 10 años la FCV me abrió sus puertas y me hizo partícipe de esta gran familia.

Gracias Dra. Lina Chaparro, aprendí grandes lecciones, no sólo laborales sino personales. Estuve a punto de renunciar varias veces, sin embargo, siempre sentí que usted confiaba en mí y que debía continuar con mi trabajo, debía cumplir, no podía quedarle mal. Usted había confiado en mí cuando llegué a trabajar en la FCV, usted me permitió trabajar en esta institución, a pesar de que no pude firmar contrato sino una semana después de seleccionada, por el fallecimiento de mi hermano mayor. A pesar de ser una total desconocida, recién graduada bacterióloga, sin conocidos importantes, sin amigos pudientes, que venía de San Gil, hija de padres campesinos y primera en mi familia en haber podido tener un título profesional. Hoy siento mucha nostalgia y a la vez alegría, gracias por darme la oportunidad y por creer en mí.

Todos los experimentos de la presente tesis se desarrollaron en el laboratorio de Investigaciones de la FCV y fueron implementados, desarrollados y validados como parte del proceso de formación del doctorado, lo cual, nos generó un tiempo considerable. En este duro proceso, pasaron por el laboratorio personas que me acompañaron, me dieron ánimos cuando más lo necesité, se trasnocharon, sufrieron y se alegraron conmigo, por ende, quiero agradecer a las estudiantes de pregrado, Ana María, Greys Carolina, Karen y Tatiana; a mis compañeras de doctorado, María Eugenia, Mariana, Lisette, Laura M; a la joven investigadora Cindy Tatiana. También deseo agradecer a la profesora Stelia Carolina Méndez, dado que al permitir que su estudiante de Doctorado Yenny Bueno rotara por nuestro laboratorio, hizo posible que conociera a una gran persona. Gracias Yenny por compartir tus conocimientos conmigo, gracias por presentarme a Marilyn Alvarez, y gracias a ustedes dos por su ayuda implementando western blot.

Con el continuo crecer del laboratorio, se abrieron otras áreas: el laboratorio clínico de la FCV y el laboratorio de especializados. Llegaron grandes profesionales a nuestra institución fortaleciendo campos especializados como citometría, histocompatibilidad, citogenética y patología. Por ello, quiero agradecer a las doctoras Norma Serrano, Elizabeth Guio, Johana Navarro, por los conocimientos y consejos compartidos. Adicionalmente y de manera especial, quiero agradecer a dos grandes profesionales, colegas y amigas, que me brindaron no solo un apoyo académico, sino su amistad y ayuda cuando más lo necesité, gracias por su paciencia infinita e incondicional amistad Lucía y Wendy, siempre estaré en eterno agradecimiento.

Quiero agradecer también a los doctores Adalberto Sánchez y Julio Montoya, por apoyarme en este difícil proceso a distancia, gracias a las profesoras Alicia de Plata, Anilza Bonelo, Beatriz Parra y a los profesores Andrés Castillo, Guillermo Ortega y Fredy Quijano, por los conocimientos brindados, por su comprensión en un proceso de formación a distancia y por la calidez brindada, siempre los llevaré en mi corazón. Por todos los trámites administrativos, agradezco a las secretarías del postgrado Adriana y Paola, así como a las personas que desde la FCV estuvieron pendientes de este proceso, Dra. Elsa Serpa, Jefe Maruja y Jefe Juan.

A mi equipo de trabajo del Banco de Tejidos, han sido muchas personas que en diferentes tiempos formaron parte de este equipo y todos ellos me apoyaron para que las cosas funcionaran en ambos lados (trabajo y estudio), sin ellos, no tendríamos el Banco Multitejidos que hoy tiene el nororiente del país. Gracias Olga, Luz Mary, Sandra P, Fredy, Andrés, Jhon, Greys, Angie, Hugo, Roque, Melissa, Lady y Carmen. Gracias Ingenieros Juan Felipe y Diana, por creer en el Banco de Tejidos y en mí.

A mi Madre, tú me enseñaste el trabajo constante, la perseverancia, la responsabilidad, la administración responsable, el sacrificio, la humildad, eres mi heroína, eres la persona más fuerte que conozco y estoy muy orgullosa de ser tu hija, gracias por enseñarme junto con mi padre, que la oportunidad de estudiar que ustedes no tuvieron, se debía aprovechar. Gracias querido hermano Nelson, solo quedamos nosotros tres, pero desde el cielo Aldemar y mi padre, nos acompañan y guían. Gracias querido sobrino Jorge, por ser la prolongación de la existencia de Aldemar. Gracias Juancho y Matías, por iluminar la vida de mi hermano y la mía. Gracias Fredy por acompañar a mi madre, por llegar a su vida, por darme la tranquilidad de que mi madre estaba en buenas manos. Gracias por estar con ella cuando yo no pude.

Quiero agradecerle infinitamente a mi esposo, este doctorado ha sido la más grande prueba de nuestro matrimonio, noches sin ir a mi casa, fines de semana dedicados en el laboratorio, inestabilidad emocional, ansiedad, tristeza, alegrías y tú, siempre estuviste ahí, ayudándome en casa, pendiente de nuestros hijos, dándome un abrazo cuando en las noches ya no podía más, por aguantarme en estos últimos años. Fuiste, eres y serás el hombre que más amo en esta vida, mi soporte, la bendición que Dios me regalo para que me acompañara en este gran camino que es la vida misma. Gracias a mis locos bajitos, Diego y Daniel, por su paciencia, por recostarse a mi lado mientras escribía, por permitirme acompañarlos en las noches mientras se dormían leyéndoles un artículo científico, espero que los sueños hayan sido gratos... gracias por darme un rayito de luz cuando todo estaba oscuro, gracias por crecer a mi lado, gracias por jugar a las escondidas y por bailar bajo la lluvia conmigo, gracias simplemente por existir.

Por último, Dios padre celestial, creí que la ciencia estaba mucho de la religión, pero gracias a ti encontré mi camino en la ciencia.

El presente trabajo fue financiado y realizado en el Laboratorio de Investigaciones del área de Biotecnología e innovación y desarrollo, de la FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA, dirigido por el Marcos López Casillas, Ph.D.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	15
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.2 JUSTIFICACION.....	20
1.3 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	24
1.3.1 <i>Cáncer de seno en el mundo.....</i>	<i>24</i>
1.3.2 <i>Clasificación del cáncer de seno</i>	<i>26</i>
1.3.3 <i>Cáncer de seno triple negativo TNBC</i>	<i>28</i>
1.3.4 <i>Bioenergética Mitochondrial como blanco terapéutico</i>	<i>33</i>
1.3.5 <i>Estado del arte: Blancos terapéuticos</i>	<i>38</i>
1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
1.4.1 <i>Hipótesis.....</i>	<i>43</i>
1.4.2 <i>Objetivo General:</i>	<i>44</i>
1.4.3 <i>Objetivos Específicos</i>	<i>44</i>
1.5 METODOLOGIA	45
1.5.1 <i>Desarrollo Objetivo 1.....</i>	<i>45</i>
1.5.2 <i>Desarrollo Objetivo 2.....</i>	<i>58</i>
1.5.3 <i>Desarrollo Objetivo 3.....</i>	<i>69</i>
1.5.4 <i>Desarrollo Objetivo 4.....</i>	<i>80</i>
1.5.5 <i>Análisis de los datos</i>	<i>81</i>
1.5.6 <i>Consideraciones éticas</i>	<i>81</i>
CAPÍTULO II RESULTADOS	84
2.1 OBJETIVO ESPECIFICO 1.....	85
2.1.1 <i>El compuesto Mito-SG1 es más citotóxico que Mito-metformina en no-TNBC y TNBC.....</i>	<i>85</i>
2.1.2 <i>Mito-SG1 genera selectivamente muerte celular en las líneas celulares no-TNBC y TNBC.</i>	<i>88</i>
2.1.3 <i>Mito-SG1 inhibe la proliferación, el crecimiento celular y la migración en TNBC y no-TNBC....</i>	<i>90</i>
2.2 OBJETIVO ESPECIFICO 2.....	95
2.2.1 <i>Evaluación de los cambios morfológicos del núcleo producidos por Mito-SG1 en TNBC y no-TNBC</i>	<i>95</i>
2.2.2 <i>Mito-SG1 induce traslocación de fosfatidil serina en TNBC</i>	<i>99</i>
2.2.3 <i>Mito-SG1 induce activación de caspasas 3/7 en TNBC.....</i>	<i>103</i>
2.2.4 <i>La activación de la vía intrínseca de la apoptosis posiblemente es el mecanismo de muerte celular inducido por Mito-SG1</i>	<i>105</i>
2.3 OBJETIVO ESPECIFICO 3.....	106
2.3.1 <i>Mito-SG1 induce despolarización de membrana mitocondrial y estrés oxidativo en TNBC y no TNBC.</i>	<i>106</i>
2.3.2 <i>Las células que son forzadas a depender de la respiración mitocondrial para la producción de ATP son más sensibles a Mito-SG1</i>	<i>112</i>
2.3.3 <i>Mito-SG1 genera una disminución dosis dependiente del metabolismo mitocondrial.</i>	<i>114</i>
2.3.4 <i>Mito-SG1 genera un cambio en el fenotipo metabólico de TNBC y afectación del índice bioenergético.....</i>	<i>126</i>
2.3.5 <i>Glicólisis como mecanismo compensatorio de la disfunción mitocondrial ocasionada por Mito-SG1 en las líneas celulares de TNBC y no TNBC.</i>	<i>132</i>

2.3.6	<i>Evaluación de la distribución del uso de las principales fuentes de carbono, bajo el tratamiento con Mito-SG1</i>	137
2.4	OBJETIVO ESPECIFICO 4.....	141
2.4.1	<i>Mito-SG1 potencia los efectos citotóxicos de doxorrubicina, presentando un efecto sinérgico en la línea celular MDA-MB-468 y un efecto aditivo en MDA-MB-231.</i>	143
2.4.2	<i>Mito-SG1 sinergiza con 2DG en las líneas celulares de TNBC</i>	146
CAPÍTULO III DISCUSIÓN		150
3.1	EFFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS DEL AGENTE CATIÓNICO DIRIGIDO A LA MITOCONDRIA MITO-SG1 EN TNBC	151
3.2	AFECTACIÓN DE LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL COMO MECANISMO ANTITUMORAL DE MITO-SG1	155
3.3	POTENCIAL ROL DE LA VIA RAS/MEK/ERK EN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE MITO-SG1	160
3.4	POTENCIAL SINERGICO DE MITO-SG1 CON LAS TERAPIAS CONVENCIONALES	163
CONCLUSIONES		166
RECOMENDACIONES		167
PERSPECTIVAS		168
BIBLIOGRAFIA		173

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

FIGURA I- 1 PROBLEMÁTICA DEL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE SENO TRIPLE NEGATIVO.	17
FIGURA I- 2 INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE CÁNCER EN EL MUNDO, EXCLUYENDO MELANOMA, AMBOS SEXOS, GLOBOCAN 2012.	24
FIGURA I- 3 INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE CÁNCER EN COLOMBIA, EXCLUYENDO MELANOMA, SEXO FEMENINO, GLOBOCAN 2012.	25
FIGURA I- 4 DESENLACE Y TASA DE SOBREVIVENCIA EN COHORTES INDEPENDIENTES.	28
FIGURA I- 5 PERFIL BIOENERGÉTICO MITOCONDRIAL SEGÚN ESTATUS DE RECEPTORES EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE SENO.	32
FIGURA I- 6 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA, GLICÓLISIS ANAERÓBICA Y GLICÓLISIS AERÓBICA (EFECTO WARBURG).	34
FIGURA I- 7 FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LAS QUINASAS QUE MODULAN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN CÁNCER DE SENO SUBTIPO BASAL.	41
FIGURA I- 8 SÍNTESIS DE SG1.	46
FIGURA I- 9 SÍNTESIS DE MITO-SG1.	48
FIGURA I- 10 LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 ATCC® HTB-26TM.	49
FIGURA I- 11 LÍNEA CELULAR MDA-MB-468 ATCC® HTB-132TM.	50
FIGURA I- 12 LÍNEA CELULAR MCF7 ATCC® HTB-22TM.	51
FIGURA I- 13 LÍNEA CELULAR T47D ATCC® HTB-133TM.	52
FIGURA I- 14 LÍNEA CELULAR MCF 10A ATCC® HTB-10317TM.	53
FIGURA I- 15 FUNDAMENTO DEL ENSAYO MTT.	53
FIGURA I- 16 FUNDAMENTO ENSAYO SYTOX GREEN®.	55
FIGURA I- 17 FUNDAMENTO DEL ENSAYO DE EXCLUSIÓN DEL COLORANTE AZUL DE TRIPÁN.	55
FIGURA I- 18 TSCRATH SOFTWARE.	58
FIGURA I- 19 CAMBIOS MORFOLÓGICOS NUCLEARES VISUALIZADOS CON DAPI.	59
FIGURA I- 20 FUNDAMENTO ENSAYO DE ANEXINA V.	61
FIGURA I- 21 VÍAS EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS.	62
FIGURA I- 22 FLUJOGRAMA DE EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS Y MITOCONDRIALES.	65
FIGURA I- 23 TINCIÓN COOMASIE.	67
FIGURA I- 24 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA CON EL USO DE LA Sonda RADIOMÉTRICA JC1 EN LA LÍNEA CELULAR MCF7.	70
FIGURA I- 25 ENSAYO DE MITOSOX™ RED.	71
FIGURA I- 26 FLUJOGRAMA DE EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.	73
FIGURA I- 27 ESQUEMA EN 3D DEL FUNCIONAMIENTO DEL XFe24 SEAHORSE BIOSCIENCE.	75
FIGURA I- 28 PARÁMETROS DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EVALUADOS POR MEDIO DEL ENSAYO XF CELL MITO STRESS TEST KIT (SEAHORSE BIOSCIENCE).	76
FIGURA I- 29 PARÁMETROS DE LA GLICÓLISIS EVALUADOS POR MEDIO DEL ENSAYO XF CELL GLYCOLYSIS STRESS TEST KIT (SEAHORSE BIOSCIENCE).	77
FIGURA I- 30 XF MITO FUEL FLEX TEST KIT XF.	79
FIGURA I- 31 PROTOCOLO DE SIEMBRA.	80

CAPITULO II

FIGURA II- 1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE MITO-MET Y MITO-SG1, CON SUS CORRESPONDIENTES COMPUESTOS PARENTALES METFORMINA Y SG1.	85
FIGURA II- 2 EFECTO DE MITO-MET Y MITO-SG1 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN CÁNCER DE SENO.	87
FIGURA II- 3 EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS PARENTALES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN CÁNCER DE SENO.	88

FIGURA II- 4 MUERTE CELULAR EVALUADA CON SYTOX GREEN®	89
FIGURA II- 5 EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON MITO-SG1 Y SU COMPUESTO PARENTAL SG1, SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.	91
FIGURA II- 6 MITO-SG1 INHIBE LA FORMACIÓN DE COLONIAS EN LAS LÍNEAS CELULARES TNBC Y NO-TNBC.	93
FIGURA II- 7 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE MITO-SG1 SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR IN VITRO EN MDA-MB-231 Y MCF7.	94
FIGURA II- 8 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS APLICADA A LA CUANTIFICACIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS NUCLEARES.	96
FIGURA II- 9 MITO-SG1 GENERA ALTERACIONES EN LA MORFOLOGÍA NUCLEAR DE TNBC Y NO –TNBC COMPATIBLES CON APOPTOSIS.	99
FIGURA II- 10 EVALUACIÓN DE LA TRASLOCACIÓN DE FOSFATIDIL SERINA EN LA LÍNEA CELULAR MCF7.	100
FIGURA II- 11 EVALUACIÓN DE LA TRASLOCACIÓN DE FOSFATIDIL SERINA EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.	101
FIGURA II- 12 EVALUACIÓN DE LA TRASLOCACIÓN DE FOSFATIDIL SERINA EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-468.	102
FIGURA II- 13 MITO-SG1 INDUCE ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS 3/7 EN TNBC.	104
FIGURA II- 14 MITO-SG1 ESTIMULA LA LIBERACIÓN DE CITOCROMO C AL CITOSOL EN MDA-MB-231.	105
FIGURA II- 15 ESQUEMA DEL CAMBIO DE FLUORESCENCIA DETECTADO CON JC-1.	107
FIGURA II- 16 MITO-SG1 GENERA DESPORALIZACIÓN DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL EN TNBC Y NO TNBC.	107
FIGURA II- 17 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MITO-SG1 SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN TNBC Y NO TNBC.	108
FIGURA II- 18 DETECCIÓN DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL EN LÍNEAS CELULARES DE TNBC Y NO TNBC POSTERIOR AL TRATAMIENTO POR 24 HORAS CON MITO-SG1.	109
FIGURA II- 19 DETECCIÓN DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	110
FIGURA II- 20 DETECCIÓN DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-468 POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	111
FIGURA II- 21 LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ERK ES AFECTADA POR EL TRATAMIENTO CON MITO-SG1 EN TNBC.	112
FIGURA II- 22 AUMENTO DE LA RESPIRACIÓN CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 AL SUSTITUIR LA GLUCOSA POR GALACTOSA EN EL MEDIO DE CULTIVO.	113
FIGURA II- 23 EFECTO DE MITO-SG1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 QUE HA SIDO PRE-ACONDICIONADA A DEPENDER DE FOSOX PARA LA GENERACIÓN DE ATP.	114
FIGURA II- 24 TITULACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS EN MICROPLACA DE CULTIVO XF24 V7.	115
FIGURA II- 25 TITULACIÓN DE FCCP EN MDA-MB-468, MDA-MB-231 Y MCF7.	116
FIGURA II- 26 MITO-SG1 GENERA UNA DISMINUCIÓN DOSIS DEPENDIENTE DE LA TASA DE CONSUMO DE OXÍGENO EN TNBC.	118
FIGURA II- 27 MITO-SG1 GENERA UNA DISMINUCIÓN DOSIS-TIEMPO DEPENDIENTE DE LA TASA DE CONSUMO DE OXÍGENO EN TNBC.	119
FIGURA II- 28 MAPA BIOENERGÉTICO BI-DIMENSIONAL DEL OCR Y EL ECAR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MITO-SG1, DURANTE LAS PRIMERAS 3 HORAS DE LA INYECCIÓN DEL COMPUESTO.	120
FIGURA II- 29 PARÁMETROS DE LA RESPIRACIÓN CELULAR EVALUADOS CON EL XF CELL MITO STRESS TEST KIT.	121
FIGURA II- 30 EFECTO DE 24 HORAS DE TRATAMIENTO CON MITO-SG1 EN LAS LÍNEAS CELULARES MDA-MB-231, MDA-MB-468 Y MCF7 SOBRE LA TASA DE CONSUMO DE OXÍGENO. EVALUADA CON XF CELL MITO STRESS TEST KIT.	123
FIGURA II- 31 EFECTO DEL TRATAMIENTO POR 24 HORAS CON MITO-SG1 SOBRE LOS 6 PARÁMETROS PRINCIPALES DE LA RESPIRACIÓN CELULAR DE LAS LÍNEAS CELULARES TNBC Y NO TNBC.	124
FIGURA II- 32 MITO-SG1 NO AFECTA SIGNIFICATIVAMENTE LA EFICIENCIA DEL ACOPLAMIENTO.	126
FIGURA II- 33 EFECTO DE MITO-SG1 SOBRE EL PERFIL DEL FENOTIPO ENERGÉTICO CELULAR DE MDA-MB-231.	127
FIGURA II- 34 EFECTO DE MITO-SG1 SOBRE EL PERFIL DEL FENOTIPO ENERGÉTICO CELULAR DE MDA-MB-468.	129
FIGURA II- 35 EFECTO DE MITO-SG1 SOBRE EL PERFIL DEL FENOTIPO ENERGÉTICO CELULAR DE MCF7.	130
FIGURA II- 36 MITO-SG1 INHIBE DE FORMA DOSIS DEPENDIENTE EL ÍNDICE BIOENERGÉTICO CELULAR.	132
FIGURA II- 37 PARÁMETROS DE LA GLICÓLISIS, EVALUADOS CON EL XF CELL GLYCOLYSIS STRESS TEST.	133
FIGURA II- 38 EFECTO DE 24 HORAS DE TRATAMIENTO CON MITO-SG1 EN LA FUNCIÓN GLICOLÍTICA DE LAS LÍNEAS CELULARES TNBC Y NO TNBC.	135
FIGURA II- 39 COMPORTAMIENTO DEL RADIO OCR/ECAR DURANTE LA EVALUACIÓN DE LA GLICÓLISIS.	136
FIGURA II- 40 EFECTO DE 24 HORAS DE TRATAMIENTO CON MITO-SG1 EN LA CONTRIBUCIÓN A LA TASA DE CONSUMO DE OXÍGENO DE LAS PRINCIPALES FUENTES DE CARBONO EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.	138

FIGURA II- 41 EFECTO DE 24 HORAS DE TRATAMIENTO CON MITO-SG1 EN LA CONTRIBUCIÓN A LA TASA DE CONSUMO DE OXÍGENO DE LAS PRINCIPALES FUENTES DE CARBONO EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-468.....	139
FIGURA II- 42 ISOBLOGRAMA CLÁSICO PARA IC ₅₀ , IC ₇₅ E IC ₉₀ E INTERPRETACIÓN.	142
FIGURA II- 43 CURVA DOSIS RESPUESTA E ISOBLOGRAMA DE LA INTERACCIÓN DE MITO-SG1 CON DOXORRUBICINA.....	144
FIGURA II- 44 CURVA DOSIS RESPUESTA E ISOBLOGRAMA DE LA INTERACCIÓN DE MITO-SG1 CON 2DG.	147

PERSPECTIVAS

FIGURA P- 1 EFECTOS DE MITO-SG1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y CLONOGENICIDAD DE LA LÍNEA CELULAR HEPG2	169
FIGURA P- 2 EFECTOS DE MITO-SG1 SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	169

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO I

TABLA I-1 BÚFER DE CARGA DESNATURALIZANTE	66
TABLA I-2 BÚFER DE CORRIDA	66
TABLA I-3 GEL DE CONCENTRACIÓN	66
TABLA I-4 GEL DE CORRIDA AL 16%	67
TABLA I-6 BÚFER DE TRANSFERENCIA.....	68
TABLA I-5 SOLUCIÓN DE BLOQUEO.....	68
TABLA I-7 SOLUCIÓN DE DILUCIÓN DE ANTICUERPOS	68
TABLA I-8 SOLUCIÓN DE TBS	68
TABLA I-9 GEL DE CORRIDA AL 14%	73

CAPITULO II

TABLA II- 1 EJEMPLO DE CODIFICACIÓN POR ASIGNACIÓN DE CÓDIGO BINARIO.	97
TABLA II- 2 FACTORES DE CODIFICACIÓN POR CADA LÍNEA CELULAR.	97
TABLA II- 3 ASIGNACIÓN DE CÓDIGOS POR TIPO DE CAMBIO MORFOLÓGICO NUCLEAR.....	98
TABLA II- 4 ECUACIONES PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS A EVALUAR DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL CON XF CELL MITO STRESS TEST KIT	122
TABLA II- 5 ECUACIONES PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS A EVALUAR DE LA GLICÓLISIS CON XF CELL GLYCOLYSIS STRESS TEST	134
TABLA II- 6 DESCRIPCIÓN DE SINERGISMO O ANTAGONISMO EN ESTUDIOS DE COMBINACIÓN DE DROGAS ANALIZADOS CON EL MÉTODO DE ÍNDICE DE COMBINACIÓN.....	143
TABLA II- 7 ÍNDICE DE COMBINACIÓN DE MITO-SG1 CON LOS DIFERENTES COMPUESTOS EVALUADOS EN LAS LÍNEAS CELULARES DE TNBC.	145
TABLA II- 8 ÍNDICE DE REDUCCIÓN DE DOSIS MITO-SG1+DOXORRUBICINA EN TNBC.	146
TABLA II- 9 ÍNDICE DE REDUCCIÓN DE DOSIS MITO-SG1+2DG EN TNBC.	148

ÍNDICE DE ECUACIONES

CAPITULO I

Ecuación I-1 Eficiencia en la formación de colonias.....	56
Ecuación I-2 Fracción superviviente.....	56
Ecuación I-3 Índice de combinación.....	79

CAPÍTULO II

Ecuación II-1 % OCR estrés.....	126
Ecuación II-2 % ECAR estrés.....	126
Ecuación II-3 Índice bioenergético.....	129

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Certificado Beca Doctoral del Programa de Doctorados Nacionales del Instituto para el Desarrollo de Ciencia y Tecnología de Colombia COLCIENCIAS (COLCIENCIAS/Colfuturo 567/2012).
- Anexo 2.** Certificado presentación poster ***“Cytotoxic Effects of Mitochondria-Targeted Nitroxide Mito-SG1 on Hepatic Cancer Cells”***. Evento internacional: 19th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine. Noviembre 14-18, San Diego, CA, USA. Primera participación de Colombia en el evento.
- Anexo 3.** Artículo publicado: Abstract ***“Cytotoxic Effects of Mitochondria-Targeted Nitroxide Mito-SG1 on Hepatic Cancer Cells”***. Free Radical Biology and Medicine, Volume 53, Supplement 2, 1 November 2012, Page S50. Sandra Milena Sanabria-Barrera, Greys Carolina Avila-Rojas, Micael Hardy, Olivier Ouari, Marcos Lopez. Clasificación COLCIENCIAS: A1, Factor de Impacto: 5.6
- Anexo 4.** Aprobación proyecto en calidad de Co-Investigadora por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología (2014). Proyecto No. 3371: ***“Agentes antioxidantes mitocondriales y sensibilizadores de insulina para el tratamiento de cáncer hepático”***.
- Anexo 5.** Certificado como CONFERENCISTA 4^{TO} Seminario Nacional en Ciencias Aplicadas: ***“Terapias selectivas contra cáncer hepático y de seno, dirigidas a la bioenergética mitocondrial”***.
- Anexo 6.** Artículo publicado: Abstract ***“Terapias selectivas contra cáncer hepático y de seno, dirigidas a la bioenergética mitocondrial”***. Sanabria Barrera SM, Sánchez Aranguren LC, López Casillas M, Hardy M, Olivier Ouari. Innovaciencia facultad cienc. exactas fis. naturales. 2015; 3(1) sup 1: 8 - 9
- Anexo 7.** Soporte ponencia oral ***“Targeting triple-negative breast cancer metabolism and bioenergetics by mitochondria-targeted SG-1 nitroxide (Mito-SG1)”***. Evento internacional: 22nd Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine. Noviembre 18-21, Boston, MA, USA.
- Anexo 8.** Artículo publicado: Abstract ***“Targeting triple-negative breast cancer metabolism and bioenergetics by mitochondria-targeted SG-1 nitroxide (Mito-SG1)”***. Free Radical Biology and Medicine, Volume 87, Supplement 1, October 2015, Page S72 Sandra Milena Sanabria-Barrera, Lissette Carolina Sanchez-Aranguren, Cindy Tatiana Espinosa-Gonzalez, Laura Maria Gonzalez-Ortiz, Micael Hardy, Olivier Ouari, Marcos Lopez. COLCIENCIAS: A1, Factor de Impacto: 5.8
- Anexo 9.** Travel award Society for Redox Biology and Medicine, Noviembre 2 de 2015. Soporte
- Anexo 10.** Travel Award Seahorse Bioscience, Noviembre 2015.
- Anexo 11.** Ponencia Oral ***“Targeting Triple-Negative Breast cancer Metabolism and Bioenergetics by Mitochondria-Targeted SG-1 Nitroxide (Mito-SG1): Effects Beyond Mitochondria”*** Evento Internacional: Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies. Septiembre 24-28 de 2017. Split, Croacia.
- Anexo 12.** Proyecto aprobado Convocatoria de Salud de COLCIENCIAS Conv 744-2016 ***“Tratamiento selectivo de cáncer gástrico afectando la bioenergética mitocondrial”***. Investigadora principal Sandra Milena Sanabria Barrera. Código SIGP 65667155040.

LISTA DE ABREVIACIONES

2DG:	2-deoxi-glucosa
AC-T:	Terapia combinada con doxorubicina, ciclofosfamida y paclitaxel
ADP:	Adenosina difosfato
ATP:	Adenosina trifosfato
BLC:	Búfer de lisis celular
CADV:	Canal aniónico dependiente de voltaje
CAF:	Ciclofosfamida, doxorubicina y fluorouracil
CDK4:	Quinasa dependiente de ciclina 4
CDKN2A:	Inhibidor de quinasa 2 dependiente de ciclina
CI:	Índice de combinación (combination index)
CO₂:	Dióxido de carbono
CP:	Carboxi proxilo
CR:	Capacidad de reserva
CS:	Cáncer de seno
CTE:	Cadena transportadora de electrones
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCIS:	Carcinoma ductal In Situ
DHE	Dihidro etidio
DiOC6(3):	3,3'-Dihexil oxacarbocianina Ioduro
D_m:	Dosis media efectiva
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO:	Dimetil sulfóxido
ECAR:	Tasa de acidificación extracelular
EGFR:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER:	Receptor de estrógenos
ESM:	Error estándar de la media
FASN:	Sintasa de ácidos grasos

FCCP:	Carbonilo cianuro 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
FDA:	Food drug administration
FosOx:	Fosforilación oxidativa
FPM:	Fuerza protón motriz
FS:	Fosfatidil serina
GSH:	Glutación reducido
HE:	Hidroetidina
HER2:	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico
HKII:	Hexoquinasa II
IB:	Índice bioenergético
IC:	Concentración inhibitoria
IRD:	Índice de reducción de dosis
JC1:	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil bencimidazolilo carbocianina Ioduro
m:	Pendiente
MCR:	Máxima capacidad respiratoria
MITO-CP:	Carboxi proxilo unido a un catión de trifenil fosfina
MITO-SG1:	SG1 unido a un catión de trifenil fosfina
MOMP:	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa
MPTP:	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
MTA:	Agentes dirigidos a la mitocondria (Mitochondria-targeted agents)
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NAD⁺:	Nicotinamida adenina dinucleótido en la forma oxidada
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido en la forma reducida
NADP⁺:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en la forma oxidada
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en la forma reducida
No TNBC:	Cáncer de seno que expresa uno o más de los siguientes receptores ER, PR y/o HER2
NOX:	NADPH oxidasa
OCR:	Tasa de consumo de oxígeno

PAHO:	Pan American Health Organization
PBS:	Búfer fosfato salino
PDGFR:	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE:	Plating Efficiency
PI:	Ioduro de propidio
PPP:	Vía de las pentosas fosfato
PR:	Receptor de progesterona
PTEN:	La fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTP:	Poros de transición de la permeabilidad
r:	Coefficiente de correlación
RA:	Respiración acoplada
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RTK	Tirosin kinase receptor
SBF:	Suero fetal bovino
SDH:	Succinato deshidrogenasa mitocondrial
SF	Surviving fraction
SG1:	N-terc-butil-N- [1-dietilfosfono- (2,2-dimetilpropilo)]
SOD:	Superóxido dismutasa
TCA:	Ciclo del ácido tricarboxílico
TNA:	Transportador de nucleótidos de adenina
TNBC:	Cáncer de seno triple negativo
TP53:	Tumor protein p53
TPP⁺:	Catión de trifeníl fosfina
VEGFR:	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
WHO:	World Health Organization

RESUMEN

El cáncer de seno triple negativo (TNBC), es la forma más agresiva de cáncer de seno, caracterizada por no expresar receptores de estrógenos (ER), receptores de progesterona (PR) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2). TNBC no responde a la terapia endocrina convencional y frecuentemente presenta resistencia. Por lo tanto, el desarrollo de terapias efectivas, seguras y clínicamente útiles para tratar TNBC es urgentemente necesario. Recientemente, ha sido reportado que las líneas celulares de TNBC están caracterizadas por disfunción mitocondrial, glicólisis elevada, y un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en comparación con las células de cáncer de seno receptores-positivas (no TNBC). Así, una estrategia viable para tratar el TNBC es utilizando como blanco terapéutico las diferencias bioquímicas entre el metabolismo y la bioenergética mitocondrial de las células sanas y las tumorales, con agentes dirigidos a la mitocondria (MTAs). En este estudio, nosotros investigamos los efectos citotóxicos y alteraciones en la bioenergética celular inducidas por MTAs en líneas celulares de cáncer de seno y células de epitelio mamario no tumorales. La metformina dirigida a la mitocondria (Mito-Met), es basada en la biguanida metformina, una droga antidiabética conjugada a un catión de trifenilfosfina. Mito-SG1 es un nitróxido lineal dirigido a la mitocondria, SG1 [(N-terc-butil-N- [1-dietilfosfono- (2,2-dimetilpropilo)]] conjugado a un catión alquil trifenilfosfonio.

Ensayos de muerte celular, formación de colonias, crecimiento celular, potencial de membrana mitocondrial, producción de ROS, apoptosis y de función bioenergética mitocondrial en tiempo real fueron realizados en líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no TNBC (MCF7 y T47D) tratadas y no tratadas con MTAs. Mito-SG1 exhibe mayor efecto selectivo antitumoral que Mito-Met en todas las líneas celulares evaluadas. Mito-SG1 indujo selectivamente una inhibición dosis dependiente de la viabilidad celular, formación de colonias y crecimiento celular en células TNBC y no TNBC, pero no en células MCF-10A normales. El tratamiento con Mito-SG1 también indujo un cambio dependiente de la concentración en el potencial de membrana mitocondrial, la activación de caspasas 3/7, externalización de fosfatidilserina y un aumento en la producción de ROS. Nosotros también establecimos que Mito-SG1 se direcciona a la mitocondria induciendo una disminución en la tasa de consumo de oxígeno (OCR), la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva en las células TNBC y no TNBC. Descubrimos que el tratamiento con Mito-SG1 provocó un cambio en los fenotipos metabólicos basales y en condición de estrés energético de TNBC, lo que sugiere que se afecta la capacidad de las células para satisfacer sus demandas energéticas de supervivencia por disfunción mitocondrial. Encontramos diferencias metabólicas en la oxidación de las principales fuentes de carbono, lo que permiten el desarrollo de nuevas terapias dirigidas al metabolismo celular específico en TNBC. Curiosamente, también se encontró que los efectos de Mito-SG1 van más allá de la disfunción mitocondrial. El tratamiento con Mito-SG1 en las líneas celulares de TNBC demostró que afecta la vía Ras-MEK-ERK, previniendo la fosforilación de quinasas corriente abajo.

Palabras claves: Cáncer de seno triple negativo, agentes dirigidos a la mitocondria, Mito-SG1, Mito-Met, metabolismo.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancers (TNBC), are the most aggressive forms of breast cancer that are negative for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression. TNBC is not responsive to common endocrine therapies and often exhibit resistance. Thus, development of effective, safe and clinically useful therapies to treat TNBC are urgently needed. Recently, it has been reported that TNBC cell lines are characterized by mitochondrial dysfunction, elevated glycolysis, and increased generation of reactive oxygen species (ROS) as compared to receptor positive breast cancer cells (non-TNBC). Thus, a viable strategy to treat TNBC is by targeting the biochemical differences between cancer and normal cell metabolism and mitochondrial bioenergetics with mitochondria-targeted agents (MTAs). In this study, we investigated the cytotoxic effects and alterations in cellular bioenergetics induced by MTA in breast cancer and normal breast epithelial cells. Mitochondria targeted metformin (Mito-Met) is based on biguanide antidiabetic drug metformin, conjugated to an alkyl triphenylphosphonium cation. Mito-SG1 is a mitochondria-targeted lineal nitroxide, SG1 [(N-tert-butyl- N-[1-diethylphosphono-(2,2-dimethylpropyl)]] conjugated to an alkyl triphenylphosphonium cation.

Cell death, colony formation, cell growth, mitochondrial membrane potential, ROS production, apoptosis and real time mitochondrial bioenergetic function assays were performed in untreated and treated TNBC (MDA-MB-231 and MDA-MB-468) and non-TNBC cell lines (MCF7 and T47D) with MTAs. Mito-SG1 exhibit more selective antitumoral effects than Mito-Met in all cell lines evaluated. Mito-SG1 selectively induced a dose dependent inhibition of cell viability, colony formation and cell growth in TNBC and non-TNBC cells but not in normal MCF-10A cells. Treatment with Mito-SG1 also induced a concentration dependent change in mitochondrial membrane potential, activation of caspases 3/7, phosphatidylserine externalization and an increase in ROS production. We also established that Mito-SG1 targets mitochondria inducing a decrease in oxygen consumption rate (OCR), maximal respiration and spare respiratory capacity in TNBC and non-TNBC cells. We also discovered that treatment with Mito-SG1 prompted a switch in both TNBC baseline and stressed metabolic phenotypes suggesting that it impaired the cells ability to meet their energetic demands for survival by targeting mitochondria. By the other way, we found metabolic differences in the oxidation of the main carbon sources that allow the development of new therapies directed to specific cellular metabolism in TNBC. Mito-SG1 was found to synergize with 2DG and enhancing doxorubicin cytotoxicity in TNBC cells. Interestingly, we also found that Mito-SG1 effects are also beyond targeting mitochondria. Treatment of TNBC cells demonstrated that Mito-SG1 also impacts the Ras-MEK-ERK pathway, preventing downstream phosphorylation of kinases.

Keywords: Triple negative breast cancer, mitochondria-targeted agents, Mito-SG1, Mito-Met, metabolism.

INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de seno CS es la segunda causa de cáncer en el mundo, la quinta causa de muerte relacionada y se constituye como el tipo de cáncer más prevalente en ambos sexos (GLOBOCAN 2012). En mujeres, el CS es de lejos, el cáncer más común con 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados en el 2012, lo que corresponde al 25% de todos los casos de cáncer a nivel mundial. El CS es el tipo de cáncer más común, tanto en países en vía de desarrollo (883.000 casos) como en las regiones más desarrolladas (794.000 casos), con una leve diferencia entre los dos. En mujeres, el CS constituye la principal causa de muerte en países en vía de desarrollo (324.000 muertes, 14.3% del total), y es ahora la segunda causa de muerte en países desarrollados (198.000 muertes, 15.4% del total) después del cáncer de pulmón.

En Colombia, es la principal causa de muerte en mujeres (GLOBOCAN 2012) y según informe técnico realizado por la Subdirección de Enfermedades No Transmisibles (ENT) del Ministerio de Salud y Protección Social en el 2014, se destaca el aumento del cáncer de seno en el país. En Colombia, esta enfermedad se perfila como un problema de salud pública debido a que por su causa anualmente fallecen 2.649 mujeres. Se estima que alrededor de 8.686 casos son detectado al año; los cuales, en su mayoría son registrados en Bogotá, Medellín, Cali, Barranquilla, Cartagena, Bucaramanga, Santa Marta y San Andrés. Así mismo, la ocurrencia de mayor mortalidad del cáncer de seno ocurre en las grandes ciudades del país, lo que plantean podría ser explicado por la presencia de factores de riesgo comunes en las ciudades, relacionada con la urbanización y el desarrollo. “La edad tardía al primer embarazo, la baja paridad, la no práctica de lactancia materna y el uso de anticonceptivos orales; sumados a otros factores de riesgo como una menor prevalencia de la práctica de actividad física y una mayor prevalencia de la obesidad en el contexto urbano son consecuencias de lo que estamos viendo en el país frente a esta patología”. Sin embargo, a pesar de los avances de los países desarrollados en la detección temprana y el tratamiento, el porcentaje del total de muertes relacionadas se mantiene en el 15.4% vs un 14.3% de los países en vías de desarrollo.

La mayoría de los cánceres de seno son carcinomas, un tipo de cáncer que comienza en las células (células epiteliales) que revisten los órganos y los tejidos como el seno. De hecho, los cánceres de seno son a menudo un tipo de carcinoma llamado adenocarcinoma, que es el carcinoma que comienza en el tejido glandular. Otros tipos de cáncer también pueden ocurrir en el seno, como los sarcomas, que empiezan en las células del músculo o tejido conectivo. En algunos casos, un solo tumor del seno puede ser una combinación de diferentes tipos o ser una mezcla de *in situ* y cáncer invasivo. El cáncer de seno también se puede clasificar en función

de las proteínas que se encuentran sobre la superficie de las células cancerosas o dentro de ellas, en grupos como “receptor hormonal positivo” o “triple negativo”. El fenotipo receptor hormonal positivo responde bien a las terapias hormonales, sin embargo, el cáncer de seno triple negativo, conocido en por sus siglas en inglés como TNBC (Triple negative breast cáncer), el cual representa aproximadamente el 20% de todos los casos de cáncer de seno (1), es considerado como el más severo subgrupo dado que no expresa los genes para los receptores de estrógenos, progesterona y factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2), por lo tanto, no responde a la hormonoterapia, ni a las terapias dirigidas a los receptores de HER2, como Herceptin (Trastuzumab), conllevando un mayor riesgo de recaída y una tasa de mortalidad más alta en comparación con otros subtipos de cáncer de seno Figura I-1. A pesar de las investigaciones sobre nuevos tratamientos, la quimioterapia citotóxica se mantiene como la única terapia aprobada para TNBC. Sin embargo, a pesar de tener una primera respuesta sustancial, se presenta una frecuente recaída y una pobre tasa de sobrevida (2, 3).

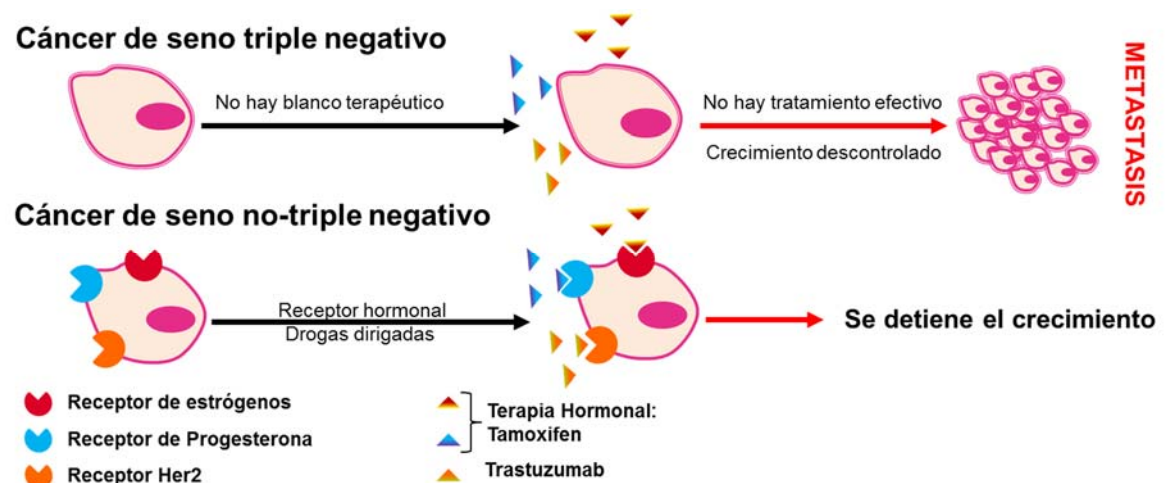


Figura I- 1 Problemática del tratamiento de cáncer de seno triple negativo.

Fuente: Adaptado de <http://triplestepowardthecure.org/understanding.ph>.

En consecuencia, el TNBC en Colombia, como a nivel mundial se constituye en un desafío socioeconómico para la familia del paciente y para el sistema de seguridad social en salud, lo cual hace necesario y prioritario la implementación de estrategias que contribuyan a minimizar la mortalidad de esta patología. Recientes hallazgos evidencian que los tumores difieren en el nivel de expresión de un alto número de genes y mutaciones, incluso entre pacientes con el mismo tipo de tumor (4, 5). Lo que nos lleva a concluir que, será improbable suprimir el cáncer empleando terapias dirigidas a un único gen o a una sola vía de señalización que pueden diferir entre un paciente u otro, o dentro del mismo tumor. Por ende, es imperativa la búsqueda de un objetivo que sea invariable y cuya explotación pueda presentar una estrategia general para el tratamiento eficiente a través de todas las patologías neoplásicas.

Recientemente, el desarrollo de compuestos cuya blanco es la mitocondria ha mostrado prometedores resultados (6, 7). En modelos de sobreexpresión del oncogen Ras en células y ratones, se ha demostrado que tanto el metabolismo mitocondrial, como las especies reactivas del oxígeno (ROS) son esenciales para la carcinogénesis (8). En contraste, la actividad de la armada enzimática antioxidante celular primaria (cobre, zinc superóxido dismutasa (SOD), manganeso-SOD, catalasa y glutatión peroxidasa) se encuentra disminuida (6). Sin embargo, para superar este problema, la célula cancerosa re-direcciona la glicólisis aeróbica de la vía glucosa-6-fosfato a la vía pentosa fosfato (PPP), resultando en la sobre-producción de NADPH y glutatión reducido (GSH) (7, 9). Por otra parte, el incremento de NADPH, dado por la deficiencia respiratoria, inactiva PTEN a través de un mecanismo de modificación redox, liderando la activación de Akt (10). De esta forma, se adquiere una mayor resistencia de las células tumorales a las agresiones oxidativas y quimioterapias generadoras de ROS como la doxorrubicina (11).

Dado el rol principal de la mitocondria en cáncer, uno de los puntos débiles a considerar es sin duda la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) lo que induce inflamación y apoptosis, a través de la liberación del citocromo C al citoplasma, vía caspasas (11). La inducción de la MOMP puede ocurrir a través de la familia de proteínas Bcl-2, por la activación de la permeabilidad mitocondrial a través de la formación del poro de transición (MPTP) o una combinación de ambos (7, 9). No es de sorprender que Bcl-2 y Bcl-xl estén sobre-expresadas como un mecanismo de protección en los tumores. El aumento de ROS se sabe que induce la activación de la MPTP. Aunque en el cáncer, las mitocondrias se reconocen como la principal fuente de ROS, estas concentraciones mortales son controladas por el aumento de GSH procedente del citoplasma y este es fácilmente permeable a la mitocondria. Estrategias que aborden la MPTP mediante la inducción de ROS para cambiar la capacidad antioxidante del cáncer e inducir la muerte celular se encuentran en uso y en desarrollo (7, 9). Las terapias tradicionales como la radiación y doxorrubicina se basan en este principio (12, 13). Sin embargo, ninguna de estas estrategias de tratamiento logra cumplir el reto de específicamente ejercer toxicidad selectiva en células tumorales y no en células normales, generando por ende, las altas tasas de mortalidad tanto por resistencia como por el daño colateral que genera la terapia (14).

Sin embargo, nuestro laboratorio ha sido pionero en el desarrollo de nuevos agentes mitocondriales con actividad antitumoral en modelos de cáncer de seno. El agente mitocondrial mimético de superóxido dismutasa (SOD), Mito-CP (nitroxido carboxi proxilo enlazado a un catión lipofílico de trifenilfosfina), ha demostrado que ejerce efectos citotóxicos selectivos en células de cáncer de seno, pero no en células epiteliales mamarias normales. Trasladando nuestros resultados previos, tenemos como hipótesis que la Mito-Met (metformina enlazadas a un catión lipofílico de trifenilfosfina), debería ejercer un efecto citotóxico selectivo en células resistentes a quimioterapia de CG atacando a la mitocondria. De la misma manera, sintetizamos el un nuevo mito-nitroxido, Mito-SG1, el cual tiene una menor capacidad de

reducción que Mito-CP y en estudios preliminares demostró efectos apoptóticos en concentraciones submicromolares en células de Hepatocarcinoma) y cáncer de seno.

Por ende, se plantea como pregunta de investigación, si ¿los agentes Mito-SG1 y Mito-Met pueden ejercer efectos citotóxicos selectivos en células de cáncer de seno triple negativo y cuál sería su mecanismo de acción?

1.2 JUSTIFICACION

El cáncer de seno es la malignidad más común en las mujeres en todo el mundo, así como la primera causa de muerte relacionada (15). A pesar del control local de esta patología por medio de la resección quirúrgica y la radioterapia, muchas mujeres que presentan un tumor aparentemente localizado terminan recayendo con bajas tasas de supervivencia y alta mortalidad (16). En Colombia, a pesar de los esfuerzos por parte del Ministerio de Salud, entre ellos la adopción del Plan Decenal para el Control del Cáncer 2012-2021, cuya finalidad es reducir la incidencia, mortalidad y discapacidad por esta enfermedad, en el caso de cáncer de seno, este se mantiene como el cáncer más incidente en mujeres, al igual que la primera causa de muerte relacionada. Son muchos los factores que intervienen en el mantenimiento de las estadísticas del cáncer de seno, tales como, la edad tardía al primer embarazo (17, 18), la baja paridad (19), la no práctica de lactancia materna (20) y el uso de anticonceptivos orales (21); sumados a otros factores de riesgo como una baja práctica de actividad física (22, 23) y una mayor prevalencia de la obesidad (24, 25) entre otros; sin embargo, una vez detectado el cáncer de seno, existen una amplia gama de tratamientos hormonales, radioterapia, resección quirúrgica que favorecen la tasa de supervivencia, siendo esta casi del 100% cuando hay una detección temprana del cáncer. ¿Entonces, porque seguimos teniendo tasas de mortalidad tan altas? El problema de la mortalidad se podría agrupar en tres contextos principalmente: la detección tardía (26), la resistencia a las terapias convencionales (27-29), y a la presencia de un subtipo de cáncer de seno de difícil tratamiento y peor pronóstico, conocido como cáncer de seno triple negativo (TNBC).

En el caso TNBC, a pesar de una detección temprana, este presenta peor pronóstico que los otros subtipos de cáncer de seno, dado que no responden a las terapias convencionales por la no expresión de receptores hormonales (receptores de estrógeno y progesterona) así como la no expresión del receptor 2 para el factor de crecimiento epidérmico HER2. El TNBC representa el 20% de los diagnósticos de cáncer de seno en el mundo. Más del 20% de los pacientes con TNBC presentan mutación en el gen supresor de tumor BRCA, particularmente en BRCA 1. Las mujeres en premenopausia, así como aquellas que han tenido tres o más nacimientos y la obesidad están asociados con un incremento en el riesgo de TNBC (1). Estudios demuestran que el diagnóstico de TNBC se da más por sus manifestaciones clínicas que por mamografía, debido a su agresividad y rápido crecimiento. Estos subtipos de tumores, fenotípicamente únicos, tienen un pronóstico y un tratamiento específicos. Para entender el tratamiento actual del cáncer de seno hay que reconocer los cambios y hallazgos que a lo largo del tiempo se han ido dando. En la actualidad existen descripciones del perfil genético de los tumores y de las diferentes características que éstos expresan. El análisis de las

peculiaridades genéticas de los tumores es continuo, encontrándose en la literatura muchas publicaciones que determinan las características intrínsecas del cáncer de seno y que los dividen en tumores luminales, cuando expresan receptores hormonales, en tumores con niveles altos de HER2 y en tumores de tipo "basal", cuando expresan bajos niveles para receptores hormonales y para HER2, constituyendo éstos la mayoría del fenotipo TNBC (30-32). Se han establecido diferencias marcadas, en términos de pronóstico y tratamiento, para cada subtipo, resaltándose el hecho de que los tumores triple receptor negativo tienden a ser biológicamente más agresivos y de peor pronóstico (33, 34). Estudios recientes también sugieren que el potencial metastásico a órganos viscerales, incluyendo sistema nervioso central, es también más evidente en el subtipo triple negativo (35, 36) y a diferencia de los otros, es un subtipo que carece de tratamientos específicos dirigidos a blancos moleculares. Por esta razón, la urgencia de desarrollar nuevos agentes para el tratamiento, más allá de la quimioterapia que existe hasta la fecha.

Para entender los problemas del tratamiento actual de cáncer de seno y las implicaciones clínicas de la caracterización molecular de los subtipos de cáncer, nos basaremos en la clasificación propuesta en el 2013 en la conferencia realizada en St Gallen (37). Dentro del grupo de cáncer con receptor hormonales positivos y negativos para HER2 de temprana detección, los subtipos Luminal A y Luminal B tienen un desenlace predictivo a 10 años independiente del tratamiento sistémico administrado, así como, un riesgo residual de recurrencia después de 5 años de tratamiento endocrino. El subtipo positivo para HER2, presenta 4 subtipos que pueden ser identificados, dominando el fenotipo biológico y clínico. Desde la perspectiva clínica, los pacientes con HER2+/HER2- enriquecido parecen beneficiarse más de terapias neoadyuvantes con trastuzumab o bloqueo dual con trastuzumab/lapatinib, en combinación con quimioterapia. En pacientes con HER2+/Luminal A, la enfermedad evidencia un mejor desenlace comparado con otros subtipos. Finalmente, en el caso de TNBC, el subtipo basal es el más predominante (70-80%) y, desde una perspectiva biológica, debería ser considerado como un subtipo en sí mismo. Es importante contemplar que en TNBC dependiendo del subtipo basal versus no basal, se puede predecir su sobrevida después de terapias neoadyuvantes con quimioterapia con diferentes multiagentes. Se observa buen resultado con bevacizumab en el tratamiento neoadyuvante (38-40) y en el caso de cáncer metastásico el docetaxel frente a carboplatino, es preferido como tratamiento de primera línea (41). En general, los resultados presentados sugieren que el perfil molecular proporciona información clínicamente relevante más allá de las clasificaciones actuales basadas en la patología.

Sin embargo, las terapias multimodales también tienen un mayor rango de efectos adversos dado la toxicidad de los diferentes agentes empleados, así como, son limitadas a los tumores genéticamente relacionados, minimizando su espectro de acción, dado que los tumores difieren en el nivel de expresión de un alto número de genes y mutaciones, incluso entre pacientes con el mismo tipo de tumor (4, 5).

Adicionalmente, el problema principal de estas terapias en TNBC, es que a pesar de que presentan inicialmente un buen resultado, la tasa de recaída es alta y de mal pronóstico, en comparación con cáncer de seno no triple negativo. La supervivencia post-recidiva en cáncer No TNBC es de 2,3 años versus 1 año en TNBC, así como durante los primeros 3 años es mayor la tasa de mortalidad en TNBC (36). En la actualidad no existen terapias aprobadas por la FDA para TNBC, generando como único recurso las terapias multimodales citotóxicas no selectivas con quimioterapia, tales como doxorubicina, ciclofosfamida seguida por paclitaxel (AC-T) estudio CALGB9741 (42, 43), o ciclofosfamida, doxorubicina y fluorouracil (CAF) estudio CALGB8541 (44). Por ende, es imperativa la búsqueda de un blanco terapéutico que sea invariable y cuya explotación pueda presentar una estrategia general para el tratamiento eficiente a través de todas las patologías neoplásicas.

Debido a la falta de blancos terapéuticos en TNBC, sigue siendo un reto el desarrollo de terapias selectivas, seguras y efectivas clínicamente para su tratamiento. Recientemente han sido reportadas características a nivel molecular únicas en TNBC, tales como disfunción mitocondrial, un mayor potencial de membrana, una elevada tasa de glicólisis, y un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, reactive oxygen species) en comparación con aquellos subtipos de cáncer de seno que son receptor-positivos (45). Así, se abre la posibilidad de una potencial estrategia para tratar TNBC, aprovechando sus diferencias bioquímicas entre las células normales y las malignas, así como a nivel de la bioenergética mitocondrial con mito-compuestos como los sensibilizadores insulínicos y Mito-nitróxidos dirigidos a la mitocondria, tales como Mito-Met y Mito-SG1 respectivamente.

Este grupo de agentes con actividad anti-cáncer que inducen la apoptosis por medio de la desestabilización mitocondrial, denominado mitocans (agentes anti-cáncer dirigidos a la mitocondria) o mito-compuestos han sido recientemente objeto de investigación (46-49). Estos nuevos fármacos han demostrado la inducción de la apoptosis en las células malignas. Entre dichos agentes se encuentran los antioxidantes, miméticos de SOD, la hexoquinasa, y drogas que interfieren en la cadena respiratoria y el ADN mitocondrial (46, 50). En 1969 Liberman et. Al. (51) demostraron que un catión permeable a las membranas biológicas puede acumularse preferentemente en la matriz mitocondrial. Siguiendo el mismo principio, varios laboratorios de investigación están tratando con varios agentes dirigidos a la mitocondria. Smith et. col. y colaboradores, fueron los primeros en dirigir compuestos antioxidantes como ubiquinona (Mito-Q) y vitamina E, a la mitocondria por unión covalente de la molécula diana a un catión lipofílico de trifenilfosfonio (TPP) (52). El catión TPP es tomado preferentemente por las mitocondrias (90-95%), donde se acumula debido al aumento del potencial de carga negativa de la membrana mitocondrial (150-170 mV) (53). En el cáncer, la membrana celular y el potencial de membrana de las mitocondrias es aún más negativa que en las células normales, debido a cambios en el metabolismo y el

desequilibrio redox (54-56). Esto hace que el uso de estos tipos de compuestos específicos sea útil como agentes quimioterapéuticos dirigidos.

En adición, recientes estudios demuestran en TNBC desregulación en la vía de señalización dependiente de kinasas RAF-MEK-ERK en TNBC, la cual promueve el crecimiento tumoral, convirtiéndola en un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de TNBC (57). Compuestos como Mito-CP, siendo un nitróxido mimético de la superóxido dismutasa dirigido a la mitocondria, similar a Mito-SG1, ha mostrado disminuir la fosforilación de ERK en carcinoma medular de tiroides (58), por ende, conociendo que Mito-SG1 tiene un mayor poder reductor que Mito-CP, se plantea como hipótesis que Mito-SG1 podría afectar la vía RAF-MEK-ERK, como mecanismo de inhibición de crecimiento tumoral.

De esta manera este trabajo tiene por objetivo estudiar los efectos citotóxicos del agente antioxidante mitocondriales (Mito-SG1) y sensibilizadores de insulina (Mito-Met) como alternativa de tratamiento en TNBC y comparar los resultados tanto en células de cáncer de seno receptor positivas, así como en células de epitelio mamario sano.

1.3 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.3.1 Cáncer de seno en el mundo

El cáncer de seno (CS) es la segunda causa de cáncer en el mundo Figura I- 2, la quinta causa de muerte relacionada y se constituye como el tipo de cáncer más prevalente en ambos sexos (GLOBOCAN 2012). En mujeres, el CS es de lejos, el cáncer más común con 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados en el 2012, lo que corresponde al 25% de todos los casos de cáncer a nivel mundial. El CS es el tipo de cáncer más común, tanto en países en vía de desarrollo (883.000 casos) como en las regiones más desarrolladas (794.000 casos), con una leve diferencia entre los dos. En mujeres, el CS constituye la principal causa de muerte en países en vía de desarrollo (324.000 muertes, 14.3% del total), y es ahora la segunda causa de muerte en países desarrollados (198.000 muertes, 15.4% del total) después del cáncer de pulmón.

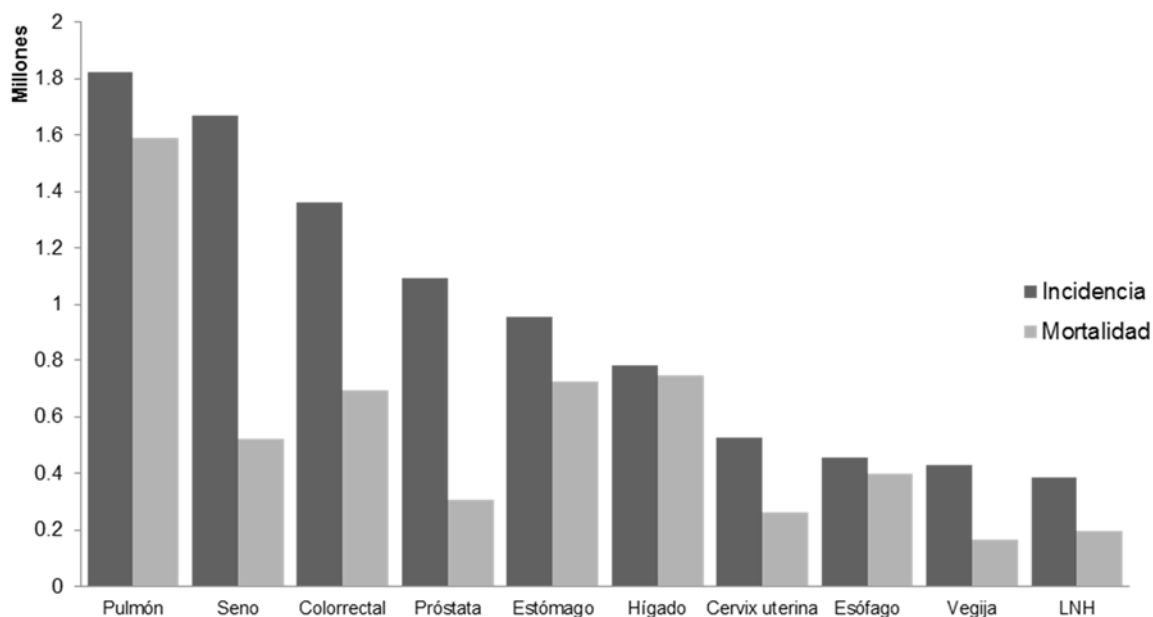


Figura I- 2 Incidencia y Mortalidad de cáncer en el mundo, excluyendo melanoma, ambos sexos, GLOBOCAN 2012.

LNH, Linfoma No- Hodking.

En Latinoamérica, la mayoría de los países están experimentando una transición epidemiológica, donde la carga por enfermedad está migrando de enfermedades infecciosas a condiciones crónicas, con un correspondiente crecimiento en las tasas de cáncer. Según informe de la PAHO (Pan American Health Organization) y la

WHO (World Health Organization), la mortalidad en las Américas está siendo liderado por el cáncer con 1.2 millones de muertes en el 2012.

En Colombia, el CS es la principal causa de muerte en mujeres Figura I- 3 y según informe técnico realizado por la Subdirección de Enfermedades No Transmisibles (ENT) del Ministerio de Salud y Protección Social en el 2014, se destaca el aumento del cáncer de seno en el país. En Colombia, esta enfermedad se perfila como un problema de salud pública debido a que por su causa anualmente fallecen 2.649 mujeres. Se estima que alrededor de 8.686 casos son detectado al año; los cuales, en su mayoría son registrados en Bogotá, Medellín, Cali, Barranquilla, Cartagena, Bucaramanga, Santa Marta y San Andrés. Así mismo, la ocurrencia de mayor mortalidad del cáncer de seno ocurre en las grandes ciudades del país, lo que plantean podría ser explicado por la presencia de factores de riesgo comunes en las ciudades, relacionada con la urbanización y el desarrollo. “La edad tardía al primer embarazo, la baja paridad, la no práctica de lactancia materna y el uso de anticonceptivos orales; sumados a otros factores de riesgo como una menor prevalencia de la práctica de actividad física y una mayor prevalencia de la obesidad en el contexto urbano son consecuencias de lo que estamos viendo en el país frente a esta patología”.

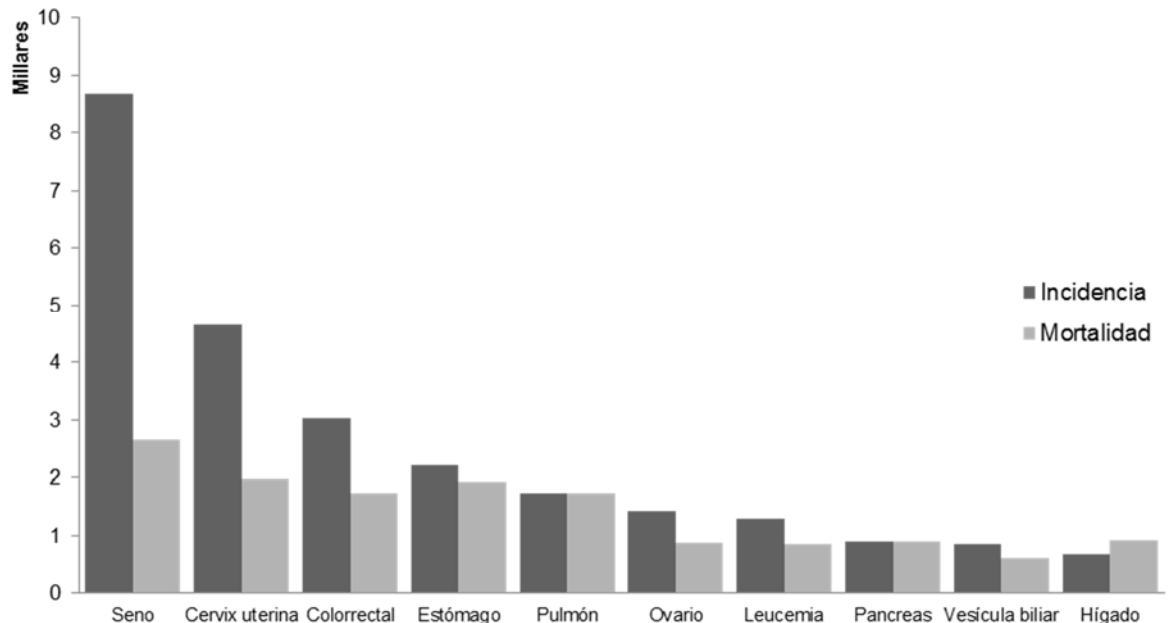


Figura I- 3 Incidencia y Mortalidad de cáncer en Colombia, excluyendo melanoma, sexo femenino, GLOBOCAN 2012.

A nivel mundial podemos decir que el CS es más prevalente en mujeres no hispanas de raza blanca, sin embargo las menores tasas de sobrevivencia son reportadas en mujeres de raza negra e hispanas (59). Esta correlación puede ser dada al acceso a los sistemas de salud y al estatus socioeconómico, así como, la incidencia y mortalidad entre estos grupos étnicos puede también estar asociada a una

predisposición genética. Cerca de un 25% de CS presentan mutaciones en dos genes autosómicos dominantes de susceptibilidad para cáncer de seno, BRCA1 y BRCA2, generando un riesgo para el portador de desarrollar a lo largo de su vida, cáncer de seno en un rango que oscila entre el 24% al 84% (60-65), lo que nos demuestra la fuerte correlación entre estos genes y el desarrollo de cáncer de seno. Sin embargo, el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, es ser mujer (con un ratio de incidencia hombre a mujeres de 1:100). Lo cual es atribuido a los efectos hormonales del ovario y es correlacionado con estudios donde se evidencia que a mayor exposición a estrógenos se aumenta el riesgo de CS (66).

Los esfuerzos para minimizar la incidencia y mortalidad de esta enfermedad se han enfocado en estrategias gubernamentales para la prevención y la detección temprana, así como se ha avanzado en los mecanismos diagnósticos (67-71), sin embargo, a pesar de los avances de los países desarrollados en la detección temprana y en los tratamientos, el porcentaje del total de muertes relacionadas se mantiene en el 15.4% vs un 14.3% de los países en vías de desarrollo.

1.3.2 Clasificación del cáncer de seno

El cáncer de seno no es una sola enfermedad, es un desorden que se presenta con diversas patologías y manifestaciones clínicas. El reconocimiento de esta diversidad lidera la clasificación sistemática basada en la localización inicial del tumor, etapa, grado y más recientemente, los perfiles moleculares. Si las células anormales se encuentran dentro de los conductos del seno, el tumor recibe el nombre de carcinoma ductal DCIS (72), siendo este el tumor no invasivo más frecuente, uno de cada 5 casos nuevos de cáncer será DCIS. El carcinoma ductal invasivo o infiltrante, presente en 8 de cada 10 cánceres, comienza en el conducto lácteo del seno, penetra a través de la pared de conducto y crece en el tejido adiposo del seno, donde tiene la posibilidad de hacer metástasis utilizando el sistema linfático. Si el carcinoma comienza en las glándulas productoras de leche, se conoce como carcinoma lobulillar invasivo, y al igual que el carcinoma ductal invasivo, puede hacer metástasis a otras partes del cuerpo, presente en aproximadamente 1 de cada 8 casos nuevos. Existe otro tipo de cáncer menos frecuente, conocido como cáncer de seno inflamatorio, representa del 1 al 3% de todos los casos nuevos de cáncer de seno. Por lo general este tipo de cáncer no se presenta como un solo tumor, sino que es evidente por el color de la piel del seno, la cual se ve rojiza y se siente acalorada, haciendo que sea confundido en sus primeras etapas como una mastitis.

La clasificación por etapas se refiere al tamaño del tumor y si el mismo, ha invadido el tejido continuo u órganos distantes. Las etapas se conocen desde el rango 0 al IV. La etapa 0 se describe como un tumor que no ha invadido al tejido adyacente, tal como el DCIS, mientras la etapa I, se refiere a un tumor no mayor a 2 cms que ha invadido el tejido adyacente (72). En la etapa II son clasificados los tumores que

han hecho metástasis a los nódulos linfáticos o los tumores que miden más de 2 cms pero que no se han propagado a los nódulos linfáticos. La etapa III se refiere a tumores invasivos que son mayores a 5 cms ó a cualquier célula tumoral que sea encontrada en un nódulo linfático cerca de la clavícula. La etapa IV, agrupa los tumores invasivos que han realizado metástasis a órganos distantes del seno. Adicionalmente, estas etapas a su vez están subdivididas de acuerdo con el tamaño (T), invasión a nódulos linfáticos (N) y lugar de metástasis (M). El grado del tumor se clasifica de 1 a 3, de acuerdo con el sistema de Bloom-Richardson, basados en la vascularización del tumor, el índice mitótico y la morfología celular (73).

El perfil molecular, un gran avance de la investigación de cáncer de seno, identifica los tumores de acuerdo con la expresión de receptores de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y/o del receptor del factor de crecimiento epidérmico HER2. El perfil molecular también utiliza tecnología de microarrays de ADN y jerarquización de clústeres generando una única firma molecular por tipo de tumor. Para la clasificación por perfil molecular nos basaremos en la conferencia realizada en el 2013 en St Gallen, que reúne expertos mundiales en cáncer de seno (74-76):

- *Luminal A y luminal B:* Los tipos Luminal son positivos para receptores de estrógeno y negativos para HER2. Los patrones de expresión genética de estos cánceres son similares a las células normales que recubren los conductos y las glándulas del seno (el interior de un conducto o glándula es llamado su lumen). Los cánceres “*luminal A*” son de bajo grado, suelen crecer con bastante lentitud, y tienen el mejor pronóstico. Los cánceres *luminal B* generalmente crecen con un poco más de rapidez que los *luminal A*, y el pronóstico no es tan favorable.
- *Tipo HER2:* Estos cánceres tienen copias adicionales del gen HER2 y algunas veces otros genes. Por lo general, estos cánceres tienen una apariencia de alto grado cuando son observados con el microscopio. Estos cánceres tienden a crecer más rápidamente y tienen un peor pronóstico, aunque a menudo pueden ser tratados exitosamente con terapias dirigidas a HER2, las cuales se administran usualmente con quimioterapia.
- *Tipo basal:* La mayoría de estos cánceres son del tipo triple negativo, lo que significa que carecen de los receptores de estrógeno o progesterona y no expresan receptor para el factor de crecimiento epidérmico HER2, sin embargo, no todos los cánceres de tipo *basal* son triple negativo. Los patrones de expresión genética de estos cánceres son similares a las células en las capas basales más profundas de los conductos y las glándulas del seno. Este tipo es más común entre las mujeres con mutaciones genéticas BRCA1. Por razones que no son bien entendidas, este cáncer también es más común entre las mujeres jóvenes de raza negra.

El pronóstico y desenlace también se correlacionaron con las diferentes clasificaciones moleculares de cáncer de seno. Sorlie et al (34), realizó análisis de supervivencia usando el método de Kaplan-Meier, con tres cohortes independientes y verificando la clasificación con clúster de genes definidos para cada subtipo de cáncer. Como se puede observar en la Figura I- 4, la probabilidad de progresión libre de enfermedad fue significativamente diferentes entre los subtipos, evidenciado que el tipo Luminal A tiene un mayor tiempo sin desarrollar metástasis, mientras que el basal y HER2+, muestran un menor tiempo libre de enfermedad. Se evidencia que tanto la tasa de supervivencia, como el tiempo libre de enfermedad en el subtipo basal y HER2+, nos indican que son los subtipos de peor pronóstico, sin embargo, el tipo HER2+, ha respondido a terapias contra inhibidores dirigidos a HER2 como Trastuzumab.

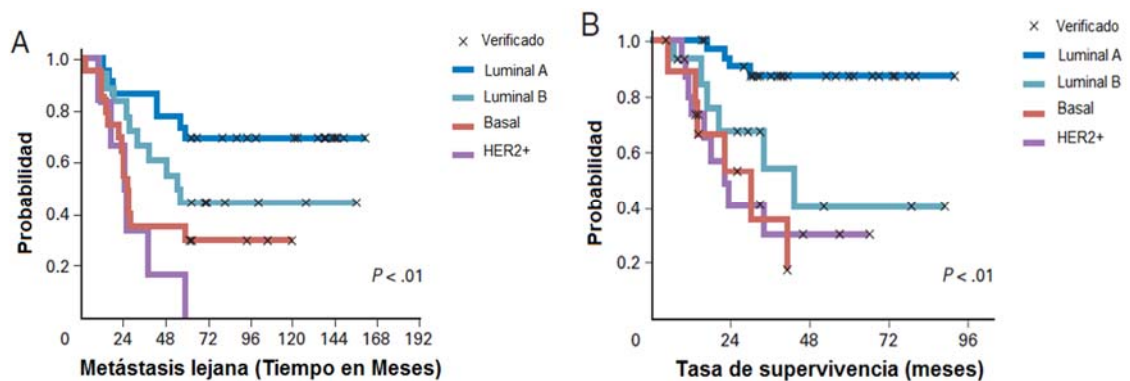


Figura I- 4 Desenlace y tasa de sobrevida en cohortes independientes.

(A) Desarrollo de metástasis a distancia en la cohorte van't Veer Et al. (B) Tasa de supervivencia cohorte Noruega.

Fuente: Adaptado de Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.

1.3.3 Cáncer de seno triple negativo TNBC

En el mundo cerca de un 20% de los casos de cáncer de seno diagnosticados corresponde a la clasificación TNBC, y contrariamente de los significantes avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de seno, el TNBC sigue siendo incurable con los compuestos disponibles en la actualidad.

A pesar de las numerosas similitudes del TNBC con el subtipo *Basal*, no se deben considerar estos dos términos sinónimos (77). En efecto, la mayoría de cáncer de seno triple negativo tiene un fenotipo de tipo *Basal*, así como la mayoría de tumores que expresan marcadores del tipo *basal*, son triple negativos (78, 79), sin embargo, únicamente el 71% de TNBC es de tipo *basal* dado su perfil de expresión genético, y únicamente el 77% de los tumores de tipo *Basal* son triple negativos (33, 80, 81).

Es de resaltar, que los tumores triple negativos que no expresan un fenotipo de tipo *basal*, tienen un mejor pronóstico que los TNBC de tipo *basal* (81). Recientemente se identificó un subtipo de cáncer de seno conocido como de baja expresión de genes de Claudina, lo cual es importante para la adhesión célula a célula, además de estar frecuentemente presentes en células madres y en la características de la transición epitelial-mesenquimal (82, 83). Se han identificado recientemente al menos 6 subtipos moleculares diferentes de TNBC, incluyendo 2 de tipo *Basal* (BL1 y BL2), y 4 subtipos con diferentes expresión de genes, tales como aquellos involucrados en proceso de inmunidad celular (IM), genes relacionados con la movilidad celular, diferenciación celular, y con las vías de receptores que interaccionan con la matriz extracelular (M), otro subtipo que comparte las características de M, pero con señalización de factores de crecimiento y enriquecido con genes asociados a la transición epitelial-mesenquimal (MSL) y por último, un subtipo con genes relacionados con la señalización del receptor de andrógenos (LAR) (84, 85).

- ***TNBC es más sensible a la inhibición de la glicólisis que otros subtipos de cáncer de seno.*** La mayoría de los cánceres son conocidos por basar la generación de energía en la vía glicolítica más que en la fosforilación oxidativa (FosOx), lo que es conocido como el efecto Warburg (86). Estudios del MD Anderson, demostraron recientemente que líneas celulares de TNBC son particularmente más dependientes de la glicólisis dada su baja tasa de respiración en comparación con líneas celulares receptor-positivas (45). Se ha observado que las líneas celulares de TNBC que crecen en medios de cultivo con alto contenido de glucosa ($3,15 \text{ g.L}^{-1}$) exhiben una proliferación acelerada con incrementos de 4 a 8 duplicaciones al día 4. Esta tasa de duplicación es más lenta al disminuir la concentración de glucosa a 1 g.L^{-1} . Estas células fallan en crecer o presentan una reducción en el número celular cuando la glucosa es reemplazada por galactosa, mientras que la línea celular MCF7 (receptor positiva), mantiene su viabilidad y crece moderadamente en medios con baja glucosa (1 g.L^{-1}) ó con sólo galactosa (45). Lo que demuestra la dependencia glicolítica de TNBC y la afectación en la respiración mitocondrial.

Otros estudios corroboran este hallazgo, al demostrar que TNBC tiene una mayor toma de F-deoxiglucosa, que otros tipos de cáncer de seno, lo que puede ser explicado por su elevada utilización de la glucosa (87). De la misma manera, se demostró que las células de TNBC son más sensibles a inhibidores glicolíticos como 2DG y 3-BrOP comparados con otros subtipos de células de cáncer de seno (45). Pelicano y colaboradores, proponen que como resultado de la inhibición de la glicólisis, se crea estrés celular, que las células sanas pueden compensar, utilizando mecanismos de activación de la vía mTOR, lo que lidera una inducción de la fosforilación de p70S6K y por consiguiente la regulación positiva en la utilización de los nutrientes para sobrevivir a dicho estrés. Sin embargo, TNBC dado que presenta una disminución significativa en la expresión de p70S6K, no es capaz de contrarrestar efectivamente esta

inhibición. Otros autores han propuesto que el aumento de la glicólisis en TNBC está relacionado con la sobre-expresión del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (por sus siglas en inglés Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), dado que, al estimular líneas celulares de TNBC con factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés Epidermal Growth Factor, EGF) se genera un aumento de la glicólisis sin generar aumento de FosOx (88). En la actualidad existen ensayos clínicos que ha demostrado la efectividad de inhibidores de EGFR sólo en un sub grupo de pacientes con TNBC, lo cual puede ser explicado debido a que TNBC no depende exclusivamente de esta vía de señalización (89). Sin embargo, el efecto final de la inhibición de EGFR es la supresión de la glicólisis, por lo que las células buscan compensar por otra vía, para mantener la generación de intermediarios metabólicos que soporten el crecimiento tumoral. Por otra parte, estudios realizados en biopsias de diferentes subtipos de TNBC, demostraron que el fenotipo metabólico más común es glicolítico en el subtipo *basal* (70% de los subtipos de TNBC, son basales), y no-glicolítico en el subtipo no-basal (90). Sin embargo, el alto metabolismo glicolítico no es principalmente para la generación de energía, dado que este mecanismo solo produce 2 moles de ATP por mol de glucosa, en comparación con FosOx donde se producen 32 moles de ATP. Una gran proporción de glucosa es utilizada para la producción de lactato, el cual, reduce el pH en el microambiente local haciendo a las células malignas más propensas a prosperar en ambientes hipóxicos y ácidos, dándoles una gran ventaja competitiva. Dado que TNBC no es sensible a fármacos dirigidos a los receptores hormonales por la no expresión de los mismos, el metabolismo glicolítico adquiere una especial relevancia como posible blanco metabólico para este subtipo de cáncer de seno, tanto para la inhibición de la proliferación como de su poder metastásico.

- **Respiración mitocondrial en TNBC.** Para entender los cambios en la respiración mitocondrial presentes en TNBC, es necesario recordar lo que sucede en células sanas. Bajo condiciones fisiológicas normales, la mayoría del ATP celular es generado por procesos de combustión de: carbohidratos, grasas y péptidos, a través de las vías mitocondriales de oxidación de ácidos grasos, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la FosOx. Esta última, consiste en el transporte de electrones, desde las formas reducidas de NADH y FADH (producidos a partir de otras reacciones catabólicas, entre ellas el TCA) al oxígeno molecular, por medio de 4 complejos proteínicos (complejos I al IV). La energía que se libera en la transferencia sistemática de los electrones es usada para bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna, creando de esta forma un gradiente químico y eléctrico (el gradiente eléctrico generado es de aproximadamente -200 mV y depende del tipo de célula). Tanto el gradiente químico como el eléctrico componen lo que se conoce como Fuerza Protón-Motriz (FPM). La FPM es la encargada de dar la energía necesaria al quinto complejo mitocondrial (ATP sintasa), para generar un cambio conformacional y permitir la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, en un proceso que se conoce como respiración acoplada. La ATP sintasa dependiendo de la

concentración de ADP que sensa en el citosol, regula la actividad de la cadena transportadora de electrones para aumentar la producción de ATP. El ATP atraviesa la membrana mitocondrial interna, por medio de un transportador de nucleótidos de adenina (TNA), y la membrana mitocondrial externa, por medio del canal aniónico dependiente de voltaje (CADV), para ser de esta forma llevado al citosol. Estos dos transportadores juegan un papel central al ser parte del poro de transición de la permeabilidad (PTP) envuelto en los procesos fisiológicos de muerte celular.

Otra menor fuente de ATP es la glucosa vía glicólisis, la cual, bajo condiciones fisiológicas normales, es convertida a piruvato. La glicólisis se produce en el citosol, y puede darse en presencia o ausencia de oxígeno, siendo la principal ventaja, que se pueda dar en ausencia de oxígeno y su desventaja, la baja cantidad de energía que se genera, en comparación con FosOx. En células malignas se observa un aumento de la glicólisis y una disminución en el uso de FosOx para la producción de ATP, en presencia de oxígeno, conocido como efecto Warburg. Sin embargo, este aumento en la toma de glucosa por la célula genera un aumento en la producción de lactato generando la acidificación del micro-ambiente celular. Warburg sugería que este cambio de FosOx por glicólisis, se daba debido a falla en la respiración mitocondrial y que constituía la mayor vía energética para la célula tumoral (91, 92). Hoy en día está en discusión este aspecto, dado que se ha demostrado que, dependiendo del tipo de cáncer, la respiración mitocondrial a pesar de estar disminuida no presenta alteraciones en la expresión de los complejos mitocondriales, y que la preferencia por la glicólisis se puede explicar mejor, por la posibilidad que esta vía genera para la producción de intermediarios metabólicos que sirven para mantener la tasa de crecimiento acelerada, que por la producción de ATP. Adicionalmente, la glicólisis permite mantener una ratio NADH^+/NAD positivo, por medio de la utilización de la vía Pentosa Fosfato, lo que permite mantener la producción de antioxidantes y de esta forma establecer un equilibrio por el aumento de ROS, generado principalmente por la cadena transportadora de electrones (CTE).

En estudio reciente publicado por el MD Anderson Cancer Center, en cabeza de la Ph.D Pelicano, se evidenció que las líneas celulares de TNBC presentan menor FosOx y mayor glicólisis, tal como se explicó anteriormente en células malignas, lo que se puede interpretar específicamente en estas líneas celulares a partir del ratio de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) sobre la tasa de acidificación extracelular (ECAR) Figura I- 5. Sin embargo, en el estudio se presenta que al inhibir la producción de ATP con oligomicina (10 ng/ml) la disminución en el OCR correspondiente a la respiración acoplada fue de aproximadamente el 50%, similar a lo presentado por otras líneas de cáncer de seno. Es decir que, a pesar de mantener una menor tasa de respiración, mantienen un potencial metabólico oxidativo, que prefiere no utilizar por razones aún desconocidas. También se observa en TNBC que la capacidad de reserva

(SRC, por sus siglas en inglés Spare respiratory capacity), esta disminuida en comparación con los otros subtipos de cáncer de seno que fueron analizados. Con relación al estado redox, se evaluó la producción de superóxido mitocondrial, encontrando que, tanto por el ensayo con MitoSOX™ Red como en posterior confirmación con dihidro etidio (DHE), que las células de TNBC presentaban mayor producción de superóxido mitocondrial que las células receptoras positivas analizadas. En concordancia con estos resultados, también encontraron elevado el radio NADH/NAD⁺, lo que indica una menor oxidación de NADH a NAD⁺ por el compromiso del complejo mitocondrial I y una mayor conversión de NAD⁺ a NADH por la glicólisis aumentada.

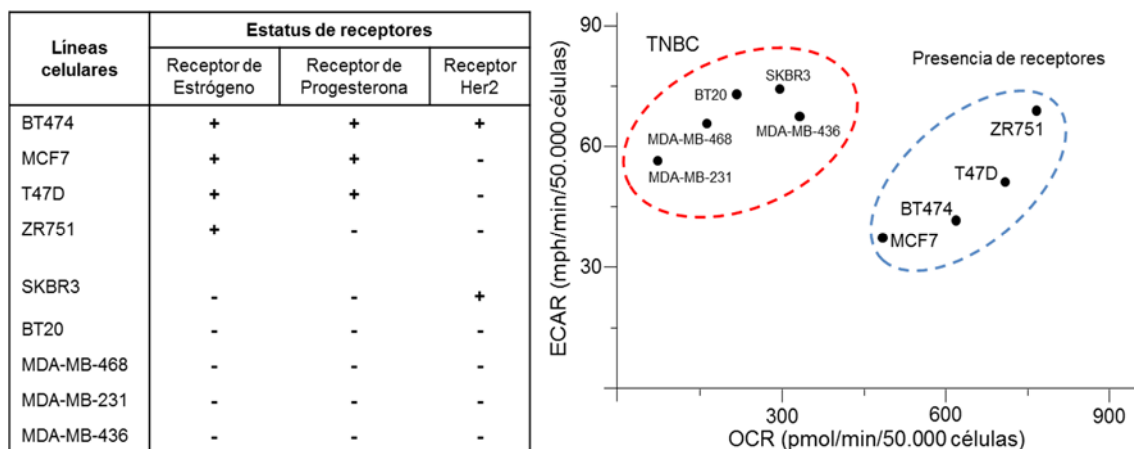


Figura I- 5 Perfil bioenergético mitocondrial según estatus de receptores en líneas celulares de cáncer de seno.

Fuente: Adaptado de Pelicano H, Zhang W, Liu J, Hammoudi N, Dai J, Xu RH, et al. Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Res.* 2014 Sep 11;16(5):434.

En resumen, TNBC presenta dos principales alteraciones metabólicas, disminución en la respiración mitocondrial y aumento en la producción de ROS. Pelicano y colaboradores, evaluaron la expresión de las diferentes proteínas de los complejos mitocondriales, comparando líneas celulares de TNBC con líneas celulares receptoras positivas, observando una disminución en la expresión de las proteínas de los complejos mitocondriales I y III, lo que podría explicar la deficiencia en la respiración mitocondrial, así como el incremento en la producción de ROS. La mitocondria es el mayor sitio generador de ROS, lo cual ocurre principalmente en los complejos I y III de la cadena respiratoria, debido a la fuga de electrones a partir de estos complejos. Una disminución en los componentes de esta cadena conlleva a una disfunción en el transporte de electrones, liderando un incremento en la fuga de los mismos y la producción de ROS. Sin embargo, también podríamos atribuir el aumento de ROS a un incremento en la actividad NOX en esta líneas celulares (93). Es importante resaltar que una elevada generación de ROS en células tumorales esta

correlacionado con la agresividad de los tumores y un mal pronóstico (94). Por otra parte, se observa que el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es más alto en líneas celulares de TNBC que en receptoras positivas, sugiriendo que a pesar de los efectos sobre la cadena respiratoria, se conserva la integridad de la membrana (45).

1.3.4 Bioenergética Mitocondrial como blanco terapéutico

La principal función de la mitocondria es la producción de ATP, por lo cual ha sido llamada “la fuente energética celular”, así como, la mitocondria es clave en el control de la regulación de importantes vías de señalización tanto de supervivencia como de muerte celular (95). En la mitocondria el metabolismo energético coexiste con la regulación de la muerte fisiológica celular. Evidentemente, varias proteínas contribuyen al metabolismo energético, así como a la muerte celular, y cualquier mutación que afecte a estos factores y a sus reguladores, puede, por lo tanto, conferir alteraciones funcionales a ambos procesos. En estados fisiológicos normales, la mitocondria es la encargada de liderar las adaptaciones metabólicas a los cambios del microambiente celular. Es el caso de una célula en estado proliferativo comparado con una célula en reposo, donde se observa un cambio del metabolismo para soportar las reacciones anabólicas, evidenciado en la disminución de la respiración celular y el favorecimiento de la glicólisis. En condiciones de reposo, con una alta carga de energía en las células, la demanda para la síntesis de ATP se limita, y aunque la FPM esta alta, la ATP sintasa al sentir un mayor ratio ATP/ADP limita el flujo de protones hacia la matriz mitocondrial, y de esta forma minimiza el tránsito de electrones a través de la CTE. En condiciones de demanda energética, el ATP es consumido y disminuye el ratio ATP/ADP lo que activa la ATP sintasa, que en respuesta genera una descarga de protones hacia la matriz mitocondrial, lo que a su vez aumenta el flujo de electrones para mantener el potencial electroquímico del espacio intermembranal. Este intercambio de estados energéticos a su vez esta seguido de un aumento o disminución del catabolismo o anabolismo celular, para regular la homeostasis metabólica de acuerdo con las necesidades celulares.

Como podemos observar en la Figura I- 6 tomada y adaptada de Vander Heiden (2009), en presencia de oxígeno el tejido no proliferativo (diferenciado), metaboliza en primera instancia la glucosa a piruvato por medio de la glicólisis, y finaliza la completa oxidación del piruvato a CO_2 en la mitocondria durante el proceso de FosOx. El oxígeno es esencial para este proceso, debido a que es requerido como aceptor final de electrones para la completa oxidación de la glucosa. Cuando existen bajas concentraciones de oxígeno, las células pueden redireccionar el piruvato generado por la glicólisis, para generar lactato (glicólisis anaerobia). Esta generación de lactato durante la glicólisis anaerobia permite que la glicólisis continúe, gracias a la oxidación de NADH a NAD^+ , pero resulta en una mínima producción de ATP cuando esta es comparada con la producción generada por FosOx. Otto Warburg observó que las células cancerosas tienden a convertir la

mayoría de la glucosa en lactato independiente de la presencia de oxígeno (glicólisis aeróbica).

Esta propiedad es compartida con el tejido sano en estado proliferativo. La mitocondria se mantiene funcional, y la FosOx trabaja en una menor proporción tanto en tejido proliferativo como en cáncer. Sin embargo, la glicólisis aeróbica es menos eficiente para la generación de ATP que la FosOx.

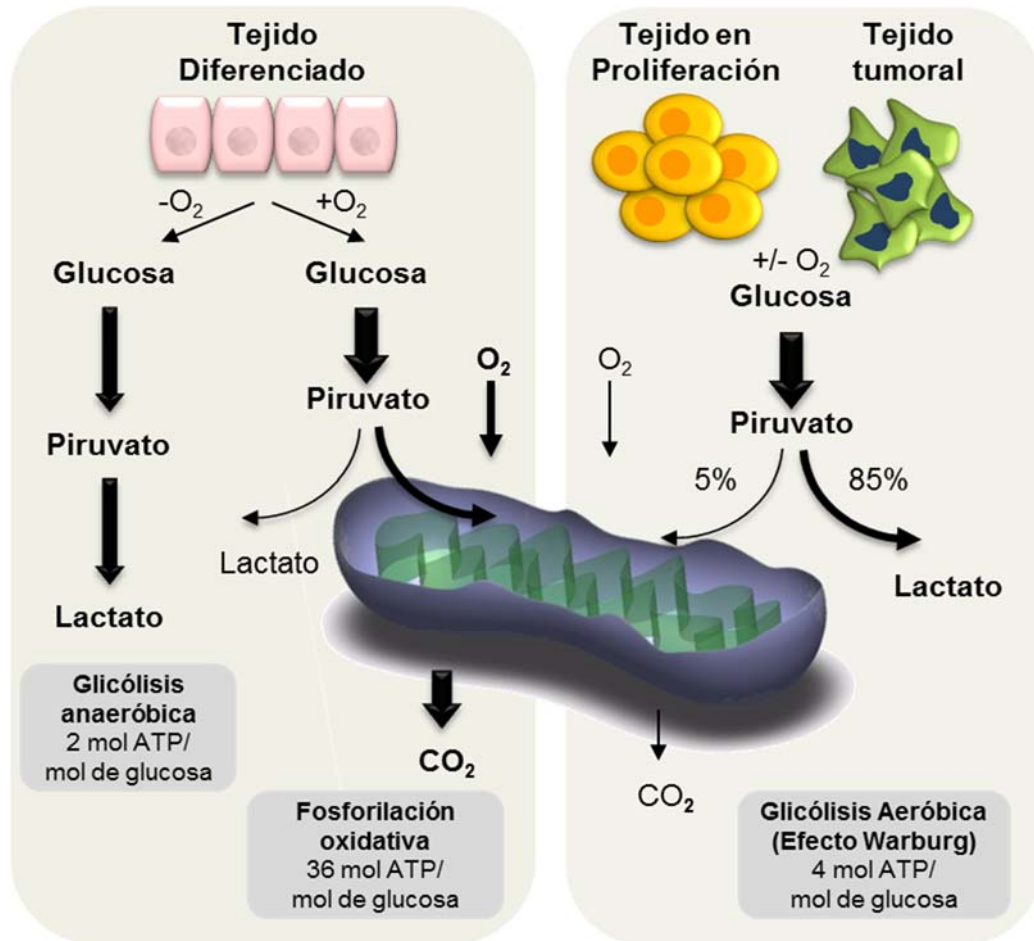


Figura I- 6 Representación esquemática de las diferencias entre la fosforilación oxidativa, glicólisis anaeróbica y glicólisis aeróbica (Efecto Warburg).

Fuente: Tomado y adaptado de Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 2009 May 22;324 (5930):1029-33

En células en estado proliferativo, aproximadamente un 10% de la glucosa es desviada hacia vías de biosíntesis que regulan positivamente la producción de piruvato (96). Incluso, en presencia de oxígeno, las células cancerosas realizan glicólisis, no FosOx. Aunque esta glicólisis aeróbica se postuló originalmente como alguna forma de disfunción mitocondrial específica del cáncer, ahora es evidente

que en su lugar se trata de una adaptación altamente regulada y muy beneficiosa para las células tumorales (96). Este cambio de FosOx a glicólisis permite que el lactato y sus metabolitos se utilicen para la producción más eficiente de lípidos y otros bloques de construcción moleculares, necesarios para el crecimiento rápido de las células. Además, muchos genes de cáncer promueven el cambio a la glicólisis aeróbica. Estas alteraciones incluyen los receptores tirosin-quinasa, AKT, PTEN, TP53 y MYC, que inhiben FosOx y promueven la actividad de las vías metabólicas glicolíticas y relacionadas, que apoyan el rápido crecimiento de los cánceres (45, 97-102).

Teniendo presente que la mitocondria es el centro del metabolismo energético para el mantenimiento de la tumorigénesis, además de que en ella converge el mecanismo de muerte especializado que no desencadena daño tisular sano como lo es apoptosis, y con la posibilidad de inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa como un punto de no retorno, la mitocondria se convierte en el blanco de interés para el desarrollo de prometedores tratamientos.

- **Sensibilizadores de insulina Metformina:** Nuevos enfoques incluyen el uso de sensibilizadores de la insulina como la metformina y las tiazolidinedionas, como la troglitazona. La metformina se ha conocido por activar AMPK, que a su vez regula positivamente el metabolismo de ácidos grasos (103-105). A su vez, es regulada por una baja de PPAR-gamma NF-kappa betta (106). Interesantemente, ambos provocan una inhibición dependiente de la concentración de la actividad del complejo I mitocondrial (107, 108). A pesar de su eficacia en inhibir el crecimiento tumoral y la proliferación, las concentraciones efectivas de trabajo son considerablemente altas, lo que lo hace inútil debido al desarrollo de la tolerancia. La metformina ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 o para pacientes con glicemia en el borde de aceptabilidad. Se sabe que se logran niveles bajos de glucosa por aumento de sensibilidad a la insulina, que conduce a un uso eficaz de la glucosa en el tejido. Estudios recientes demuestran la metformina suprime la gluconeogénesis por medio de la inhibición de la glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial (109). Por otra parte, se conoce que activa la AMPK (103) y reduce los niveles de ROS mediante la activación de factor de transcripción forkhead 3 (FOXO3) (110). Los estudios realizados por Gotlieb et. col. han demostrado que la metformina tiene actividad antineoplásica en cáncer de ovario (111). Esta actividad es dependiente de la concentración y el tiempo. Además, se ha informado de que la metformina ejerce una regulación positiva de la actividad de AMPK. La AMPK ejerce una regulación negativa sobre p70S6K y la fosforilación de la quinasa S6, conocidas por la disminución de la traducción mRNA y disminución de la síntesis de proteínas, explicando posiblemente el efecto anti-tumoral de la droga (104).

En contraste, Hattori et al. col. encontraron que las células endoteliales expuestas a la metformina tienen la regulación de la actividad de AMPK, el NF

kappa-beta, Ik-beta y el IKK. Se llegó a la conclusión de que la metformina a través de la activación de la AMPK atenúa la fosforilación de Ik-beta y la IKK inhibiendo su degradación. Entonces, la inhibición de IKK resulta en la supresión de la activación NF-kappa beta (105). NF-kappa beta es un factor de transcripción que regula varios procesos, incluyendo la proliferación celular, el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis (106). En adición, otro estudio evidenció que la metformina induce un aumento en la apoptosis de las células beta en ratas a través de la vía AMPK-JNK-cJun-activación de la caspasa-3 (112).

La función antioxidante de la metformina también ha sido investigada en el tratamiento del cáncer mediante la supresión de ROS. Los estudios han demostrado que este fármaco disminuye los niveles de ROS suprimiendo la actividad del complejo I mitocondrial (113). En un estudio realizado en músculo esquelético e hígado de rata, se encontró que la metformina inhibe la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria, causando una disfunción mitocondrial así como, una supresión de ROS (113). Este efecto fue acompañado por un aumento en el transporte de glucosa y en el almacenamiento de glucógeno, dada la urgente necesidad de carbohidratos para producir anaeróbicamente ATP (108). Además, Piwkowska et. col. demostró la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa en los podocitos de ratas después del tratamiento con metformina (114). En general, la metformina es un fármaco ampliamente utilizado en la terapia contra el cáncer debido a que disminuye el crecimiento de las células cancerosas, posiblemente entre otros mecanismos, a través de la regulación negativa de ROS.

- ***TNBC y metformina:*** La Metformina ha sido reconocida como un prometedor adyuvante en el tratamiento para el cáncer de seno triple negativo (115-118). Diferentes mecanismos han sido propuestos para entender como metformina, induce apoptosis en TNBC. Se ha observado que metformina produce cambios en la activación de Stat3, clivaje de caspasas, escisión de PARP y en la expresión de la ciclina D1 reduciendo el crecimiento celular y promoviendo la apoptosis. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual, metformina inactiva Stat3 en TNBC (119). Se ha observado efectos directos sobre el metabolismo celular, específicamente inhibiendo las enzimas hexoquina I y hexoquinasa II (120), sin embargo, no todos los estudios muestran que metformina induce apoptosis y arresto del ciclo celular en TNBC, lo que ha sugerido que los efectos de metformina pueden ser modulados dependientes de la concentración de glucosa (115). Estudios demuestran que metformina significativamente inhibe el crecimiento de MDA-MB-231 cuando las células son cultivadas en condiciones normoglicémicas, adicionalmente, en cultivos en concentraciones normales de glucosa y no hiperglicémicos, metformina induce una fuerte activación de AMPK (115). La inhibición dependiente de AMPK, de múltiples vías moleculares es conocida como un mecanismo de control de la síntesis proteica y de la proliferación celular. Se ha demostrado que en líneas

celulares de TNBC tratadas con metformina se produce también una regulación negativa en los genes de la sintasa de ácidos grasos (FASN), luego de 24 horas de tratamiento, con una posterior disminución en la expresión de la proteína FASN. FASN juega un rol crítico para la síntesis de novo de ácidos grasos y por ende es importante para la sobrevivencia de TNBC, pudiendo ser un mecanismo por el cual se facilite la apoptosis inducida por metformina (121).

- **Especies reactivas de oxígeno:** La mitocondria es la mayor fuente de ROS cuando se lesiona una célula. En tejidos sanos, se ha demostrado que el 90% del oxígeno que entra a las células es consumido por la CTE, mientras que del 1 al 4% es usado en la generación de ROS (122). La limpieza de ROS del sistema se realiza por el sistema de defensa antioxidante que consiste en agentes como la glutatión y la vitamina E, así como de enzimas como el superóxido dismutasa SOD, catalasa y glutatión peroxidasa. La mitocondria tiene su propia reserva de glutatión que es mantenida independiente de la glutatión del citosol, y es vital en el proceso de apoptosis (123).

Mantener el balance redox es fundamental para prevenir el estrés oxidativo, daño macromolecular (per-oxidación de lípidos de membrana entre otros) y alteraciones del ADN. En las células tumorales, los estudios han demostrado que las especies reactivas del oxígeno que son generadas a partir de las mitocondrias están aumentadas y son esenciales para la progresión del tumor (124). Se ha encontrado delecciones y aberraciones de los puntos de control (por ejemplo, en p53), que permiten continuar con el ciclo celular a pesar del estrés celular, contrario a lo que pasaría en una célula quiescente. El daño en el ADN puede, acumularse, contribuyendo a una tasa de mutaciones mayor, como se observa en las células tumorales (125). La proximidad del ADN mitocondrial a los sitios de producción de ROS, favorecen el daño oxidativo, lo cual en parte, explica la presencia de mutaciones somáticas observadas en cáncer (126, 127). Las mutaciones en el ADN mitocondrial afectan la expresión de genes que codifican para las unidades de la cadena de transporte de electrones que provocan un aumento de los niveles de ROS. La inhibición o la deficiencia de unidades mitocondriales, causa fugas de electrones que reaccionan rápidamente con el oxígeno disuelto, generando superóxido (128). Interesantemente, se ha observado que las células cancerosas tienen un desequilibrio redox mayor que las células normales. Esto provoca un aumento en el metabolismo mitocondrial que desencadena la proliferación celular, la generación de mutaciones y la resistencia a la terapia contra el cáncer (129). También las células cancerosas presentan una regulación negativa de la actividad de SOD (130).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el metabolismo mitocondrial y ROS son esenciales para la carcinogénesis mediada por Kras y la proliferación tumoral (8). Adicionalmente, la sobreexpresión de Ras provoca la activación de Rac que conduce a la generación de NADPH oxidasa, que induce a la célula

cancerosa a producir mayores niveles de superóxido que las células normales. Se ha demostrado que el superóxido y el desequilibrio redox ayuda a las células cancerosas a mantener su estado transformado (131).

Estos resultados corroboran la afirmación de que ROS sirve como moléculas de señalización para la progresión del ciclo celular (132), ya sea por la interacción directa con un receptor específico o la promoción de la oxidación de moléculas implicadas en la transducción de señales de crecimiento (133) y tirosin-quinazas (129). Además, ROS ha demostrado tener un efecto sobre la función de la proteína p53, que desempeña un papel clave en el ciclo celular, en la supresión de tumores. Zhao et. col. (134) utilizó un modelo de desarrollo de carcinogénesis en piel, y se encontró que la sobreexpresión de Mn-SOD disminuye el estrés oxidativo, lo que suprime la formación de tumores por inhibición de la vía JNK/AP-1.

- **Mito-nitróxidos en Cáncer:** Conocido el rol de ROS mitocondrial en el mantenimiento de la proliferación y supervivencia de las células tumorales, nuevos enfoques terapéuticos han surgido con el uso de miméticos de la SOD, tales como nitróxidos unidos a un catión de trifenil fosfina. Estas estrategias dirigidas a la mitocondria inhiben la proliferación tumoral en parte, por la mitigación de los niveles intracelulares de ROS, así como, recientemente demostrado, por la afectación directa sobre los mecanismos reguladores energéticos como AMPK, generando inhibición en la respiración acoplada y por ende en la producción de ATP (135). AMPK reprime la expresión del factor de transcripción FOXM1, por la vía de señalización AKT/FOXO3 liderando regresión del crecimiento celular de cáncer cervical (136). Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con Mito-CP inhibe FOXM1 en cáncer de pulmón (137). Kalyanaraman, propone una posible vía de acción de los mito-nitróxidos como Mito-CP, en la cual se activa AMPK y se disminuye la expresión de FOXM1, subrayando la importancia de la vía AKT/FOXO3/FOXM1 como potencial blanco terapéutico (138).

Existen varios reportes donde los Mito-nitróxidos inhiben la proliferación celular de múltiples tipos de cáncer (139), sin embargo, el mecanismo molecular por el cual ocurre dicha inhibición no es claro. Un estudio reciente propone que los nitróxidos catiónicos dirigidos a la mitocondria inhiben la proliferación celular del tumor por un mecanismo en su mayoría, independiente de su capacidad antioxidante, y señalan que la modulación bioenergética así como los mecanismos sensores de la energía celular serían los responsables de los efectos antiproliferativos en las células tumorales (138).

1.3.5 Estado del arte: Blancos terapéuticos

TNBC es una enfermedad agresiva, con una incidencia anual estimada de 1.67 millones de casos en el 2012. Como su nombre lo implica, no posee receptores de

estrógenos, progesterona ni HER2, siendo insensible a la mayoría de las terapias disponibles para cáncer de seno, incluyendo terapias dirigidas a HER2 (como trastuzumab), y endocrinas (tales como tamoxifen e inhibidores de aromatasas). La media de supervivencia es de 6-13 meses y la media de supervivencia libre de progresión es de 3 a 4 meses. Actualmente no hay una quimioterapia estándar para tratar los pacientes con metástasis refractaria o recidivante. Es muy común una rápida recidiva, con metástasis visceral o cerebral.

Las quinasas han sido reconocidas como buenos blancos para el tratamiento del cáncer debido a su manejabilidad y los importantes roles que juegan en la regulación del crecimiento celular, diferenciación, migración y supervivencia. Actualmente se cuenta con 28 inhibidores de quinasas aprobados por la FDA (140), así como otras moléculas en diferentes etapas de estudio en ensayos clínicos. Los ensayos clínicos exitosos con inhibidores de quinasa en pacientes con cáncer han sido dirigidos a quinasas que están mutadas o sobre-expresadas y donde existe evidencia preclínica que demuestra que la quinasa objetivo es suficiente para conducir la patología de la enfermedad.

- ***Inhibidores de quinasas:*** A pesar de la aprobación de la FDA para las terapias dirigidas para los subtipos luminal y HER2 enriquecidos, el cáncer de seno se mantiene liderando la tasa de mortalidad relacionada en el género femenino. La expresión de los receptores de estrógeno y progesterona en los subtipos A y B proveen dianas terapéuticas entre las que se incluyen el tamoxifen, que bloquea la habilidad del receptor de interactuar con los estrógenos y los inhibidores de aromatasas, que bloquean la producción de estrógenos. En el caso del subtipo HER2 enriquecido, se utilizan anticuerpos monoclonales como trastuzumab o pertuzumab, o pequeñas moléculas inhibidoras como el lapatinib, para bloquear la activación de HER2 y de otros receptores tirosin-quinasas (RTK por sus siglas en inglés, tirosin kinase receptor) de la familia ErbB (familia compuesta por 4 RTK, estructuralmente relacionados con EGFR). Sin embargo, dado que TNBC no expresa ninguno de estos receptores, en la actualidad no existen terapias aprobadas con inhibidores de quinasas para este subtipo de cáncer. Sin embargo, según el análisis genómico de TNBC realizado por Miller ***Inhibidores tirosin quinasa:*** Existen muchos otros RTKs que han sido identificados como moduladores de la progresión de la enfermedad en los diferentes subtipos de cáncer de seno. Estos RTKs también tienen el potencial de activar vías de señalización alternativas que pueden conducir a resistencia en tratamientos con un solo tipo de inhibidor., se puede observar desregulación en las vías de señalización que promueven el crecimiento, por sobreexpresión o amplificación de varias quinasas, incluyendo la vía RAF-MEK-ERK, lo que ofrece un potencial blanco terapéutico.
- ***Inhibidores de la vía MAPK:*** La vía de protein-quinasa activados por mitógenos, conocida como MAPK, juega un papel esencial en la proliferación

normal celular y la diferenciación, y la desregulación de esta vía conlleva al desarrollo de diferentes tipos de cáncer. En cáncer de seno, existen mutaciones en diferentes miembros de la vía MAPK, generando una sobre expresión o amplificación, particularmente en TNBC, una sobreexpresión de KRAS y BRAF ***Inhibidores tirosin kinasa:*** Existen muchos otros RTKs que han sido identificados como moduladores de la progresión de la enfermedad en los diferentes subtipos de cáncer de seno. Estos RTKs también tienen el potencial de activar vías de señalización alternativas que pueden conducir a resistencia en tratamientos con un solo tipo de inhibidor.. La quimioterapia se mantiene como la única terapia aprobada por la FDA para los pacientes con TNBC. Por ende, es necesario el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos para TNBC.

La sobre expresión de KRAS y BRAF en TNBC puede estimular la activación de la vía MAPK, e inhibidores de kinasas efectoras de esta vía podrían convertirse en blancos terapéuticos con prometedores resultados. Muchos ensayos clínicos están estudiando los beneficios del tratamiento con inhibidores de MEK de pacientes con TNBC en etapas avanzadas, entre los que se incluyen trametinib (Clinical trial: NCT01964924), selumetinib (Clinical trial: NCT02685657) y binimetinib (Clinical trial NCT01337765). Los estudios preclínicos sugieren que al combinar la inhibición de la vía MAPK con la vía PI3K/mTOR, podría ser benéfico para los pacientes al potencialmente prevenir la resistencia cuando se una única terapia inhibitoria (141). Diferentes ensayos han sido realizados para evaluar la seguridad de este tipo de terapias en las que se busca una inhibición combinada de MEK y PI3K, o AKT en diferentes tipos de cáncer (NCT01138085, NCT01476137, NCT01562275, NCT01363232) y en la actualidad se llevó a cabo el estudio NCT01390818 para evaluar sus efectos en cáncer de seno (a la fecha no se han publicado los resultados).

- ***Inhibidores tirosin kinasa:*** Existen muchos otros RTKs que han sido identificados como moduladores de la progresión de la enfermedad en los diferentes subtipos de cáncer de seno. Estos RTKs también tienen el potencial

de activar vías de señalización alternativas que pueden conducir a resistencia en tratamientos con un solo tipo de inhibidor.

Estudios preclínicos han definido quinasas amplificadas o activadas como blancos adicionales en TNBC, incluyendo EGFR, VEGFR, PDGFR, y la familia de quinasas SRC. EGFR se encuentra sobre-expresado en el 19% del cáncer de seno tipo basal, lo cual sugiere que este tipo de tumor puede ser sensible a inhibidores de EGFR, pero los ensayos clínicos iniciales con este tipo de inhibidor no han tenido buenos resultados. Una explicación potencial de estos resultados es la deficiencia en la identificación de los pacientes que realmente tienen amplificado EGFR, dado que no todos los subtipos “basal” lo llevan sobre-expresado. Otros ensayos clínicos han evaluado terapias que combinan múltiples inhibidores de RTK en pacientes con cáncer de seno metastásico.

Un estudio fase II encontró un pequeño efecto aditivo al combinar un inhibidor de VEGFR (bevacizumab) con erlotinib, pero dicho estudio fue realizado en pacientes que no fueron seleccionados de acuerdo al estatus de VEGFR (142). Diferentes quinasas inhibitoras de VEGFR han sido estudiadas para el tratamiento de múltiples subtipos de cáncer de seno. VEGFR es un regulador esencial de la angiogénesis, lo cual es necesario para soportar el crecimiento del tumor. La angiogénesis es también necesaria para la progresión de la metástasis, haciendo al VEGFR un potencial blanco terapéutico. Muchos ensayos clínicos han investigado la eficacia de adicionar el anticuerpo monoclonal anti-VEGFR bevacizumab, a la quimioterapia estándar en pacientes negativos para receptores hormonales (143-146). Los resultados de los estudios son variados, en ensayo clínicos iniciales se muestra una significativa mejoría en

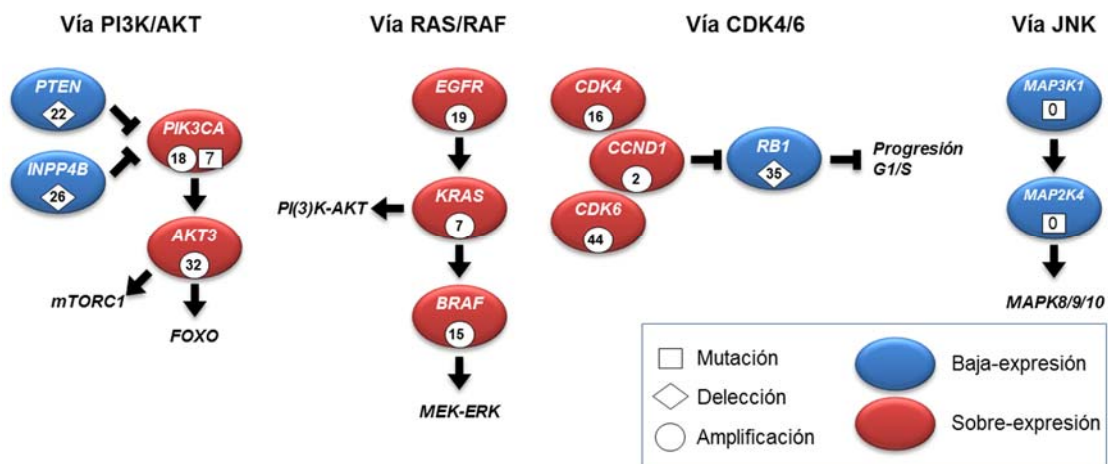


Figura I- 7 Frecuencia de las mutaciones en las quinasas que modulan las vías de señalización en cáncer de seno subtipo basal.

Las frecuencias de las mutaciones fueron calculadas usando la data de secuenciación de todo el genoma en el estudio TCGA y la clasificación PAM5 disponible en el Portal cBio (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Cerami et al., 2012). La frecuencia de la sobreexpresión de mRNA, fue calculada usando dos veces la expresión del umbral de los resultados de la expresión del mRNA del estudio TCGA.

Fuente: Tomada y adaptada de Miller SM, Goulet DR, Johnson GL. Targeting the Breast Cancer Kinome. J Cell Physiol. 2017 Jan;232(1):53-60.

la progresión libre de enfermedad, sin embargo, estudios más recientes han fallado en mostrar una mejora en la sobrevida en cohortes de pacientes negativas para receptores de estrógenos, generando que la FDA retirara la aprobación en última instancia de bevacizumab en cáncer de seno debido a la falta de eficacia comprobada y aumento de la toxicidad. Otras quinasas inhibitoras de VEGFR en TNBC siguen siendo evaluadas en ensayos clínicos, incluyendo inhibidores de amplio espectro como sunitinib (NCT00887575) y sorafenib (NCT00825734, NCT00544167).

1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.4.1 Hipótesis

El cáncer de seno triple negativo es una enfermedad agresiva, con una incidencia anual estimada de 1.67 millones de casos en el 2012. Como su nombre los implica, no posee receptores de estrógenos, progesterona ni HER2, siendo insensible a la mayoría de las terapias disponibles para cáncer de seno, incluyendo terapias dirigidas a HER2 (como trastuzumab), y endocrinas (tales como tamoxifen e inhibidores de aromatasas). La media de sobrevida es de 6-13 meses y la media de supervivencia libre de progresión es de 3 a 4 meses. A la fecha no existe un tratamiento estándar aprobado por la FDA, siendo la quimioterapia la única opción. Sin embargo, no hay una quimioterapia estándar para tratar los pacientes con metástasis refractaria o recidivante. Es muy común una rápida recidiva, con metástasis visceral o cerebral.

Nuevas alternativas de tratamiento son necesarias, siendo el metabolismo celular el blanco terapéutico ideal, dado que soporta el crecimiento acelerado y la metástasis. Teniendo presente que la mitocondria es el centro del metabolismo energético para el mantenimiento de la tumorigénesis, además de que en ella converge el mecanismo de muerte especializado que no desencadena daño tisular sano como lo es apoptosis, y con la posibilidad de inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa como un punto de no retorno, la mitocondria se convierte en el blanco de interés para el desarrollo de prometedores tratamientos.

Nuestro laboratorio ha sido pionero en el desarrollo de nuevos agentes mitocondriales con actividad antitumoral en modelos de cáncer de seno. El agente mitocondrial mimético de SOD, Mito-CP (nitroxido carboxi proxilo enlazado a un catión lipofílico de trifenilfosfina), ha demostrado que ejerce efectos citotóxicos selectivos en células de cáncer de seno, pero no en células epiteliales mamarias normales. De la misma manera, sintetizamos dos nuevos agentes dirigidos a la mitocondria, Mito-met, basado en la biguanida metformina unida a un catión de TPP^+ , y Mito-SG1, el cual tiene una menor capacidad de reducción que Mito-CP y en estudios preliminares demostró efectos apoptóticos en concentraciones submicromolares en células de hepatocarcinoma y cáncer de seno. Trasladando nuestros resultados previos, tenemos como hipótesis que la Mito-Met y el Mito-SG1, deberían ejercer un efecto citotóxico selectivo en células de TNBC atacando a la bioenergética mitocondrial.

1.4.2 Objetivo General:

Evaluar los efectos de agentes dirigidos a la bioenergética mitocondrial Mito-SG1 y Mito-Met en líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7 y T47D) así como, en células de epitelio mamario sano (MCF10A).

1.4.3 Objetivos Específicos

- Evaluar los efectos citotóxicos y selectividad de los agentes Mito-SG1 y Mito-Met en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7 y T47D) así como, en células de epitelio mamario sano (MCF10A).
- Determinar los efectos apoptóticos de Mito-SG1 en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7).
- Examinar los efectos de Mito-SG1, sobre el potencial de membrana mitocondrial, el estrés oxidativo y la bioenergética mitocondrial en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7).
- Valorar los efectos sinérgicos de Mito-SG1 con doxorubicina y 2DG en líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468).

1.5 METODOLOGIA

El presente estudio evaluó los posibles efectos mitocondrio-tóxicos selectivos de los agentes antioxidantes mitocondriales (Mito-SG1) y derivados de sensibilizadores de insulina (Mito-Met) en líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7 y T47D) así como, en células de epitelio mamario sano (MCF10A). La metodología de este proyecto es de tipo Experimental, los experimentos se realizaron por triplicado con mínimo 3 réplicas. La diferencia se consideró estadísticamente significativa con valores de $p \leq 0.05$.

1.5.1 Desarrollo Objetivo 1

Evaluar los efectos citotóxicos y selectividad de los agentes Mito-SG1 y Mito-Met en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7 y T47D) así como, en células de epitelio mamario sano (MCF10A).

Para determinar los efectos citotóxicos y de selectividad, las células de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7 y T47D) así como, en células de epitelio mamario sano (MCF10A) fueron cultivadas bajo las condiciones recomendadas por la ATCC. La viabilidad y muerte celular, se evaluó en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de: Mito-Met y Mito-SG1, así como de sus respectivos compuestos parentales: metformina, SG1 y TPP a las 24 y 48 horas posteriores al tratamiento de acuerdo con el tipo de ensayo, usando la técnica de MTT y ensayo de SYTOX® Green. La inhibición del crecimiento fue evaluada por el ensayo de inhibición de la proliferación celular con azul de tripán y formación de colonias, así como se evaluó la migración celular mediante el ensayo de wound healing.

1.5.1.1 Síntesis de los mitocompuestos:

Los mitocompuestos SG1, Mito-SG1 y Mito-Met, fueron sintetizados y caracterizados por los doctores Micael J. Hardy y Olivier Ouari del laboratorio SREP de la Universités Aix-Marseille, Francia. Se presenta a continuación la síntesis resumida de los compuestos.

Mito-Met:

La síntesis del compuesto fue publicada por Cheng, 2016 (147). En resumen, se disolvió una porción de 0.2 g de bromuro de (10-aminodecil) trifenilfosfonio (0.4 mM) en CH_2Cl_2 (3 mL) y la mezcla se enfrió a 0°C . Se añadió gota a gota una porción de 500 μL de una solución de 1 M de HCl en éter dietílico (0.5mM). Después de

una hora a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a vacío y se añadió dicianidamida (0.034 g, 0.4mM) en BuOH (2mL). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche, después de lo cual el disolvente se evaporó y el residuo se purificó por HPLC para dar Mito-Met de 10 carbonos (0.060 g, 30%). ^{31}P NMR, (400.13): δ 23.77. ^1H NMR, (400.13 MHz): δ 7.91-7.73 (15H, m), 3.42-3.33 (2H, m), 3.25-3.20 (2H, m), 1.69-1.51 (6H, m), 1.40-1.21 (10H, m). HRMS calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{P}$ $[\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{P}]^+$ 502.3094, encontrado 502.3094.

Síntesis de N-tert-butil-1-dietilfosfono-2, 2-dimetilpropil-nitróxido (SG1):

El nitróxido SG1 fue sintetizado de acuerdo a los procedimientos establecidos por el grupo de nuestros colaboradores de la Aix Marseille Université, en Marsella, Francia (148). La síntesis de SG1 se realiza en un proceso de tres pasos como se muestra en la Figura I- 8, que envuelve la formación de la imina, la fosforilación y la oxidación de pivalaldehído y t-butilamina.

En resumen, 10 moles de pivalaldehído son cargados en un reactor Schott equipado con un agitador, un embudo de goteo, un controlador de temperatura, un condensador de reflujo enfriado con agua, una chaqueta de calentamiento y un sistema para establecer un ambiente inerte con nitrógeno. Al introducir el pivalaldehído, se establece el ambiente inerte bajo nitrógeno y se enfría a 10°C. Luego, 10 moles de t-butilamina se añaden gota a gota por 1 h manteniendo la temperatura a 10°C. Después la mezcla es calentada a 40°C y se dejó reaccionando por 2 h. Seguidamente, la reacción se termina y se deja asentar para dejar que se separe la fase acuosa. Esta fase acuosa se recupera y se saca del reactor y se descarta.

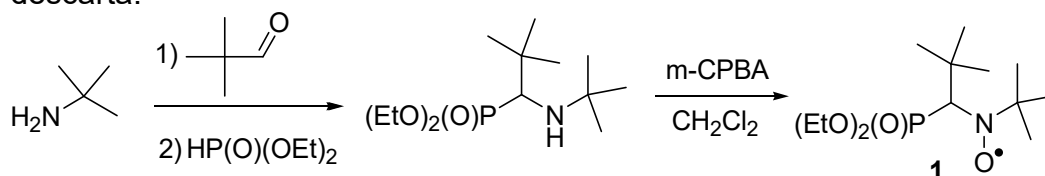


Figura I- 8 Síntesis de SG1

En la segunda etapa, al residuo que quedó en el reactor, se le añaden gota a gota, 15 moles de dietilfosfita por aproximadamente 1 h. Luego, la reacción se mantiene a temperatura ambiente, con agitación por 19 h. Al finalizar esta etapa se recupera un crudo del producto de la reacción con el aminofosfonato con un rendimiento de aproximadamente un 68% dando un producto líquido color amarillo. Este posteriormente se purifica con un tratamiento con ácido/base. En la purificación con ácido, una solución al 5% con HCl en agua se usa para acidificar el crudo a un pH de 3.0, manteniendo la temperatura a 10°C. Debido a que la reacción es exotérmica el enfriamiento se mantiene en todo momento con hielo. Las impurezas orgánicas son extraídas con diclorometano. Una fase acuosa sin color, que contiene el

clorhidrato del aminofosfonato, se recupera y se rebasifica con una solución saturada de KHCO_3 a un pH de 7.8.

El aminofosfonato es nuevamente extraído con diclorometano. La fase orgánica de esta extracción se seca con sulfato de sodio y se concentra en un rotoevaporador a presión reducida. El producto es un líquido sin color de aminofosfonato que se recupera con una pureza de más de 99%. El rendimiento de la reacción es de 66% con respecto al pivalaldehído introducido inicialmente.

En la tercera etapa, se prepara el SG1, oxidando el aminofosfonato con ácido metacloroperbenzoico (mCPBA). Para esta etapa, 1.21 moles de mCPBA en diclorometano en el mismo reactor de la primera etapa. Después que todo el perácido disuelve, la fase acuosa se separa luego que la reacción se deja asentar. Luego la solución orgánica de mCPBA, se seca con mediante adsorción en tamiz molecular. Luego, 0.769 moles del aminofosfonato, de la primera etapa, son añadidos gota a gota al medio de reacción, que se mantiene a 10 °C. Después la mezcla se deja reaccionar por 2 h. Al finalizar el tiempo, la mezcla es neutralizada con KHCO_3 acuoso saturado a temperatura ambiente. La fase orgánica se aísla, luego se lava con agua y después se concentra a presión reducida. El producto, de color marrón amarillo, es el nitróxido SG1 **[1]** Figura I- 8, que se obtiene con una pureza de 77% y un rendimiento de 71% con respecto al aminofosfonato.

Mito-SG1:

La síntesis del Mito-SG1 o N-tert-butil-1-dietilfosfono-2, 2-dimetilpropil-nitróxido (SG1) enlazado a 10-aminodeciltrifenilfosfina, fue preparado en una secuencia de siete pasos como se muestra en la Figura I- 9.

Las primeras seis etapas se realizaron para preparar una versión de SG1 con un grupo succinimidil carbonato para facilitar su enlace en condiciones suaves al 10-aminodeciltrifenilfosfina. En la primera etapa, el compuesto **[2]** se obtiene de la protección del alcohol por tertibutildimetilsilil. Luego, la segunda etapa es la aminofosforilación del compuesto **[2]** en presencia de pivalaldehído y dietilfosfita para obtener el aminofosfonato **[3]**. Después, como en SG1, el compuesto **[3]** es oxidado con m-CPBA para obtener el derivado del nitróxido SG1 **[4]**. El compuesto **[4]** es desprotegido usando fluoruro de tetrabutilamonio, para posteriormente activar el alcohol con el disuccinimidil carbonato para obtener el SG1 succinimidil carbonato **[6]**. Ya en este punto, para obtener Mito-SG1, el 10-aminodeciltrifenilfosfina se reacciona con el compuesto **[6]** en presencia de trietilamina.

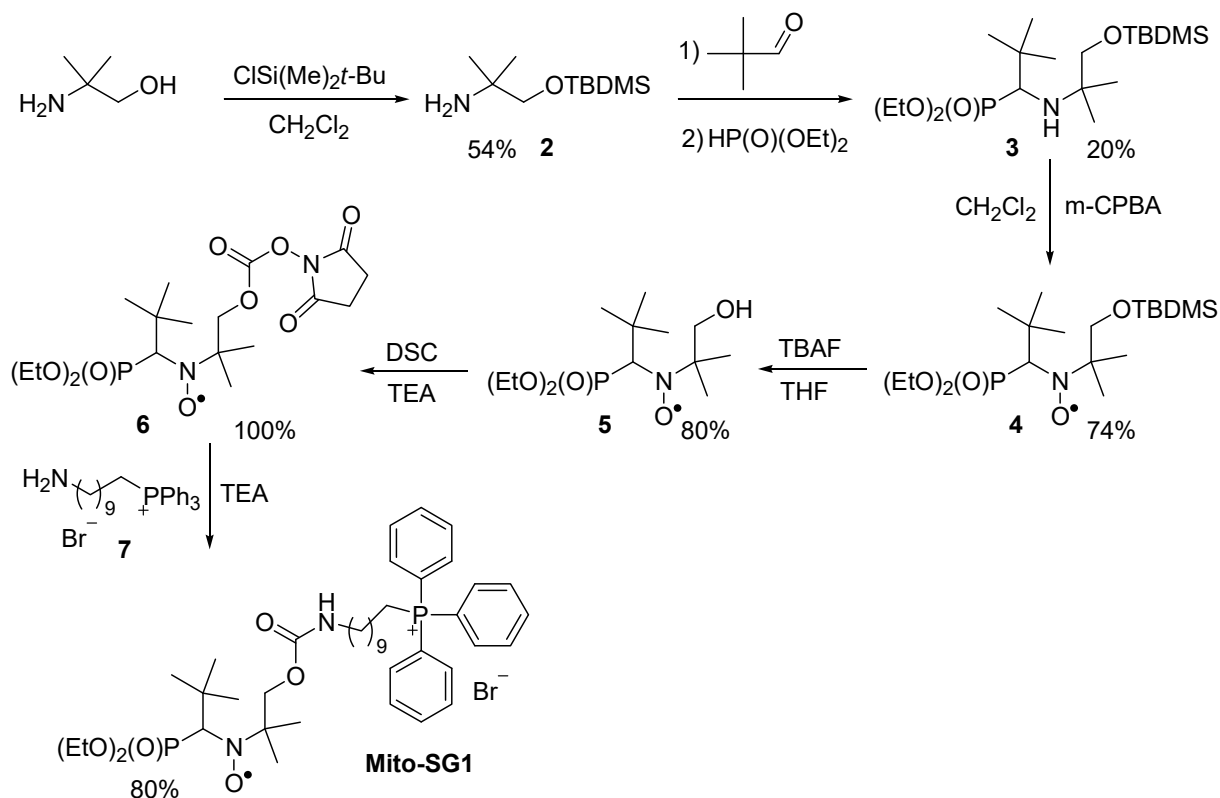


Figura I- 9 Síntesis de Mito-SG1

1.5.1.2 Líneas celulares y condiciones de cultivo:

Todas las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF-7 y T47D) así como, las células de epitelio mamario sano (MCF10A) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Todas las líneas celulares se utilizaron máximo 6 meses después de su descongelamiento, verificando que no hubiera cambios en su fenotipo, y evitando confluencias mayores al 80% para los subsecuentes pases. MDA-MB-231 y MDA-MB-468 son líneas celulares hormono-independientes de mayor uso en la investigación de cáncer de seno, que presentan un potencial metastático elevado, siendo unas de las líneas celulares más utilizadas en los estudios de cáncer de seno. Se aislaron por primera vez en 1974 y 1977, respectivamente, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de seno que falleció de esta enfermedad (149, 150). Ambas líneas presentan un crecimiento extraordinariamente rápido en cultivos poco enriquecidos, en parte por una regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio. MCF7 y T47D son líneas

celulares hormono-dependiente, siendo MCF7 una de las líneas celulares de mayor uso en la investigación en cáncer de seno. MCF7 fue aislada por primera vez en 1970 y T47D en 1979, sin embargo, antes de obtener la línea celular MCF7, no era posible obtener líneas celulares mamarias que fueran capaces de sobrevivir en cultivo más de algunos meses. La línea celular no tumorigénica de epitelio mamario MCF10A, aislada e inmortalizada por el Michigan Cancer Foundation, fue utilizada como control de células normales de seno.

1.5.1.2.1 MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) Figura I- 10:

Células epiteliales humanas de cáncer de seno (adenocarcinoma), de tipo adherente, aisladas de una mujer de raza caucásica de 51 años, extraídas de un derrame pleural metastásico. Presentan mutado el gen TP53, conocido como el guardián del genoma, el cual codifica el factor de transcripción p53 conocido como la más importante proteína supresora de tumores. La proteína p53 tiene importantes funciones como la detención del ciclo celular, la activación de enzimas de reparación del ADN, iniciación del proceso de senescencia, así como la activación de apoptosis. Esta línea celular también presenta mutado el inhibidor de quinasa 2 dependiente de ciclina (CDKN2A) el cual es un gen supresor de tumor, que sirve como inhibidor de la quinasa CDK4, siendo capaz de inducir arresto celular en la fase G1 del ciclo celular. Adicionalmente MDA-MB-231 presenta mutación en *Ras*, presentando la proteína KRAS, una mutación de baja frecuencia en cáncer de seno. Las proteínas RAS activan corriente-abajo efectores tales como, AKT y ERK, afectando el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia. Mutaciones en el gen *RAS* están asociadas a una pobre respuesta a las terapias actuales, especialmente a aquellas que van dirigidas a una inhibición de EGFR.

ATCC Number: **HTB-26™**
Designation: **MDA-MB-231**

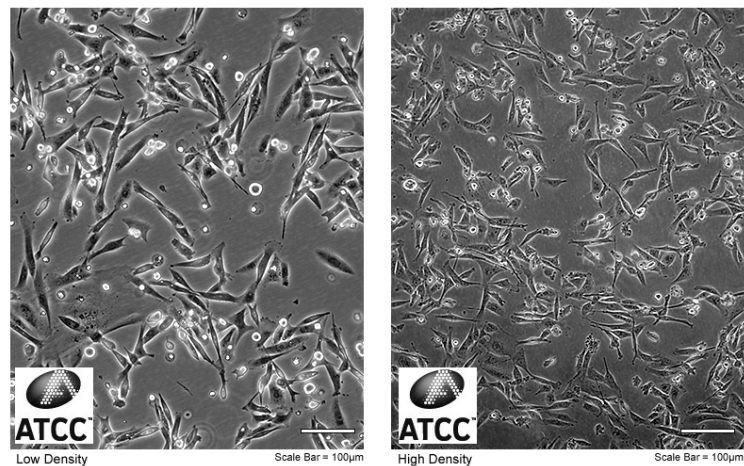


Figura I- 10 Línea celular MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™.
Fuente: ATCC®.

Esta línea celular también presenta mutado el proto-oncogén *BRAF*, el cual codifica la proteína B-RAF, una serina/treonina quinasa de la familia RAF, que actúa corriente abajo en la vía RAS y corriente arriba en MEK en la vía de señalización MAPK/ERK. Mutaciones en B-RAF lideran una excesiva proliferación celular y

potencian la supervivencia celular. Presenta expresión del oncogén *WNT7B*. MDA-BM-231 no expresan los receptores de estrógenos y progesterona, así como presenta una muy baja o nula expresión del gen *HER2*, por lo cual esta línea celular es considerada como TNBC. Esta línea celular expresa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor transformante de crecimiento alfa (TGF α).

La línea celular fue replicada a una confluencia de 70% para su almacenamiento en crioviales de 1 ml de medio completo, suplementado con 5% de Dimetil sulfóxido DMSO (CODE: N182-5X10ML Amresco®). El medio de cultivo completo estaba compuesto de: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium DMEM (Cat. No. 90-113 PBR, Corning®), suplementado con 5,5 mM de D-glucosa (Ref. 108337, Merck), 2 mM de L-glutamina (Ref. 25030-081, Gibco by Life Technologies), 1 mM de piruvato de sodio (Cat. No. 25-000-CI, Cellgro, Corning®), 3,7 g de bicarbonato de sodio (CAS 144-55-8, Fisher scientific), 1% de penicilina/estreptomicina (Ref. 30-002-CI, Cellgro), 10% de suero bovino fetal SBF (Cat. No. 35-015-CV, Cellgro, Corning®) y pH de 7,8 +/- 0,5. Para los experimentos con galactosa, no se utilizó glucosa en el medio, la cual fue reemplazada por galactosa (CAS 59-23-4, Ref. G0625-500G, Sigma-Aldrich®) a una concentración de 10 mM.

1.5.1.2.2 MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™) Figura I- 11:

Células epiteliales humanas de cáncer de seno (adenocarcinoma), de tipo adherente, aisladas de una mujer de raza negra de 51 años, extraídas de un derrame pleural metastásico. Presentan mutaciones del gen *PTEN*, que codifica el supresor tumoral PTEN. PTEN actúa como una proteína fosfatasa de doble especificidad. Defosforila los residuos tirosina, serina y treonina. También actúa como una lípido-fosfatasa, actividad crítica para su

función supresora de tumores, actuando como un antagonista de la ruta de señalización PI3K-AKT/PKB. También tiene actividad reguladora en el ciclo celular. MDA-MB-468 presenta mutación del gen supresor tumoral *RB1* que codifica una proteína reguladora de la proliferación celular por control en la progresión del ciclo celular a través del punto de control del ciclo celular en la fase G1. El gen supresor tumoral SMAD4 también se encuentra mutado en esta línea celular. Este gen

ATCC Number: **HTB-132™**
Designation: **MDA-MB-468**

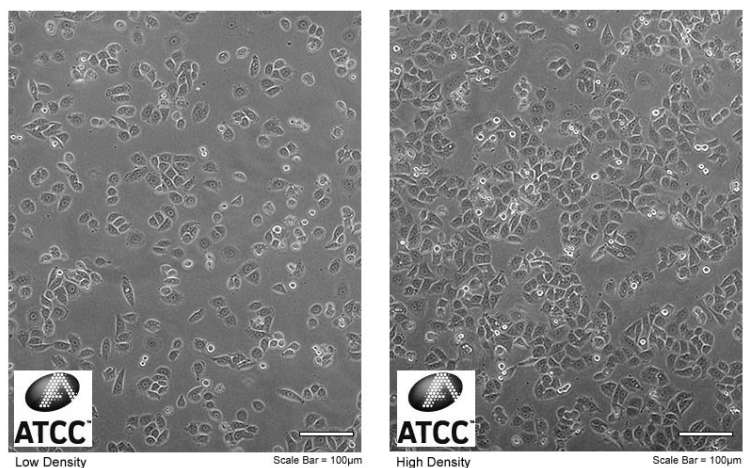


Figura I- 11 Línea celular MDA-MB-468 ATCC® HTB-132™.
Fuente: ATCC®.

codifica efectores corriente abajo en la vía de señalización del TGF β , afectando la diferenciación celular, el desarrollo embrionario y la apoptosis. Al igual que MDA-MB-231, MDA-MB-468 presenta mutación en el gen *TP53*. Al igual que MDA-MB-231, MDA-MB-468 no expresan los receptores de estrógenos y progesterona, así como presenta una muy baja o nula expresión del gen *HER2*, por lo cual esta línea celular es considerada como TNBC. Esta línea celular expresa EGF y TGF α .

La línea celular fue replicada a una confluencia de 70% para su almacenamiento en crioviales de 1 ml de medio completo, suplementado con 5% de DMSO. El medio de cultivo completo estaba compuesto de: DMEM, suplementado con 5.5 mM de D-glucosa, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 3.7 g de bicarbonato de sodio, 1% de penicilina/estreptomicina, 10% de SBF y pH de 7.8 +/- 0.5. Para los experimentos con galactosa, la glucosa fue cambiada por galactosa a 10 mM.

1.5.1.2.3 MCF7 (ATCC® HTB-22™) Figura I- 12:

Células epiteliales humanas de cáncer de seno (adenocarcinoma), de tipo adherentes, aisladas de una mujer de raza caucásica de 69 años, extraídas de un derrame pleural metastásico. MCF7 presenta mutación en el gen (*PIK3CA*), encargado de codificar PI3K. PI3K opera como parte de la vía PI3K/AKT/mTOR para mediar la proliferación celular, supervivencia, migración y tráfico vesicular. Sin embargo, esta línea presenta baja actividad de AKT. Presenta expresión del oncogen *WNT7B*. Al igual que MDA-MB-231, MCF7 presenta mutación en *CDKN2A*. MCF7, es la única línea celular de cáncer de seno, que no presenta mutación en *TP53*. Esta línea celular presenta receptores para estrógenos, no presenta sobre expresión de *HER2* y sólo presenta actividad tumorigénica en ratones, cuando es suplementada con estrógenos. MCF7 mantuvo muchas características del epitelio mamario diferenciado, incluyendo la habilidad de procesar estradiol a través de receptores de estrógenos citoplasmáticos y la capacidad de formar cúpulas.

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**

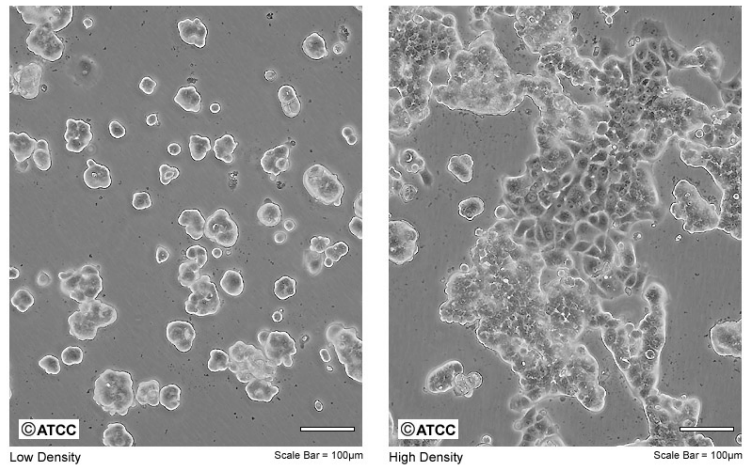


Figura I- 12 Línea celular MCF7 ATCC® HTB-22TM.
Fuente: ATCC®.

La línea celular fue replicada a una confluencia de 70% para su almacenamiento en crioviales de 1 ml de medio completo, suplementado con 5% de DMSO. El medio de cultivo completo estaba compuesto de: DMEM, suplementado con 5.5 mM de glucosa, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 3.7 g de bicarbonato de sodio, 1% de penicilina/estreptomicina, 10% de SBF y pH de 7.8 +/- 0.5. Para los experimentos con galactosa, la glucosa fue cambiada por galactosa a 10mM.

1.5.1.2.4 T47D (ATCC® HTB-133™) Figura I- 13:

Células epiteliales humanas de cáncer de seno (carcinoma ductal), de tipo adherentes, aisladas de una mujer de 54 años, extraídas de un derrame pleural metastásico. T47D presenta al igual que MCF7 mutación en el gen (*PIK3CA*). T47D también presenta mutación en *TP53*. Esta línea celular presenta expresión de receptores de estrógenos, progesterona, andrógenos y glucocorticoides. Presenta expresión del oncogen *WNT7B*.

ATCC Number: **HTB-133**
Designation: **T-47D**

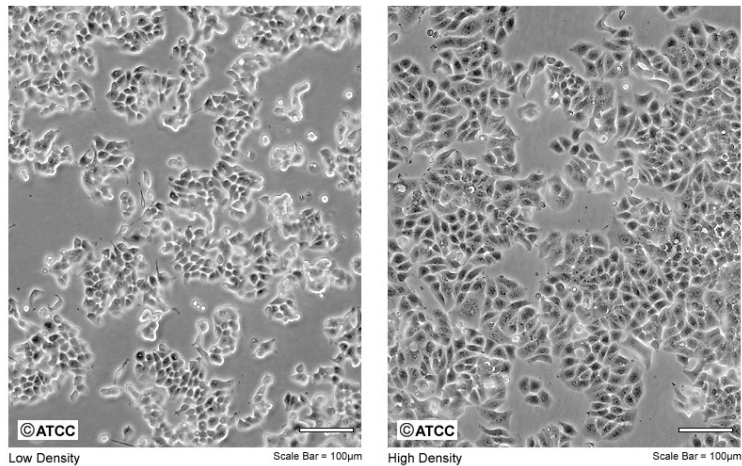


Figura I- 13 Línea celular T47D ATCC® HTB-133™.
Fuente: ATCC®.

La línea celular fue replicada a una confluencia de 70% para su almacenamiento en crioviales de 1 ml de medio completo, suplementado con 5% de DMSO. El medio de cultivo completo estaba compuesto de: RPMI 1640 (Ref. 50-020-PBR, Corning®), suplementado 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de SBF.

1.5.1.2.5 MCF 10A (ATCC® CRL-10317™) Figura I- 14:

Células epiteliales mamarias humanas, adherentes, aisladas de una mujer de raza caucásica de 36 años, que presentaba enfermedad fibroquística de las mamas. La línea celular MCF 10A es inmortalizada, no es tumorigénica, y no presenta signos de diferenciación terminal o senescencia. Esta línea celular responde a insulina, glucocorticoides, entero-toxina de cólera y EGF. Por microscopia electrónica se evidencia que las células presentan características de células de ductales lumbinales pero no de células mioepiteliales. También expresan antígenos específicos de mama, detectados por anticuerpos monoclonales como MFA-Breast y MC-5. El contenido de calcio ejerce un fuerte efecto sobre la morfología celular.

MCF 10A celular fue replicada a una confluencia de 70% para su almacenamiento en crioviales de 1 ml de medio completo, suplementado con 7.5% de DMSO. El medio de cultivo completo estaba compuesto de: DMEM:F12 50:50 (Ref. 90-091-PBR, Corning®) suplementado con 5% de suero de caballo (Cat. No. 35-030-CV, Cellgro), 20 ng.ml⁻¹ de EGF humana (Cat. AF-100-15, PeproTech, INC), 0.5 mg.ml⁻¹ de hidrocortisona (Cat. No. 3867, Calbiochem®), 100 µg.ml⁻¹ de toxina de cólera (Biological Laboratories, Inc), 10 µg.ml⁻¹ de insulina recombinante humana (Cat. No. 407709-50MG, Calbiochem®) y 1% de penicilina/estreptomicina (Ref. 30-002-CI, Cellgro). El medio de ensayo no fue suplementado con EGF, y la concentración de suero de caballo usada fue del 2%.

ATCC Number: CRL-10317
Designation: MCF-10A

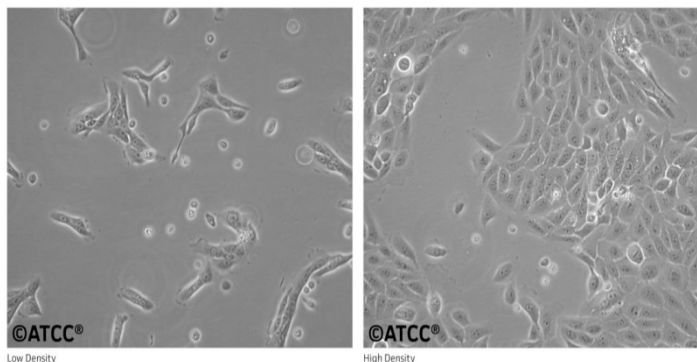


Figura I- 14 Línea celular MCF 10A ATCC® HTB-10317TM.
Fuente: ATCC®.

1.5.1.3 Ensayo MTT:

El ensayo colorimétrico MTT se basa en la determinación de la viabilidad y citotoxicidad celular, por medio de la reducción de la actividad metabólica del tetrazolio MTT (Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio). El

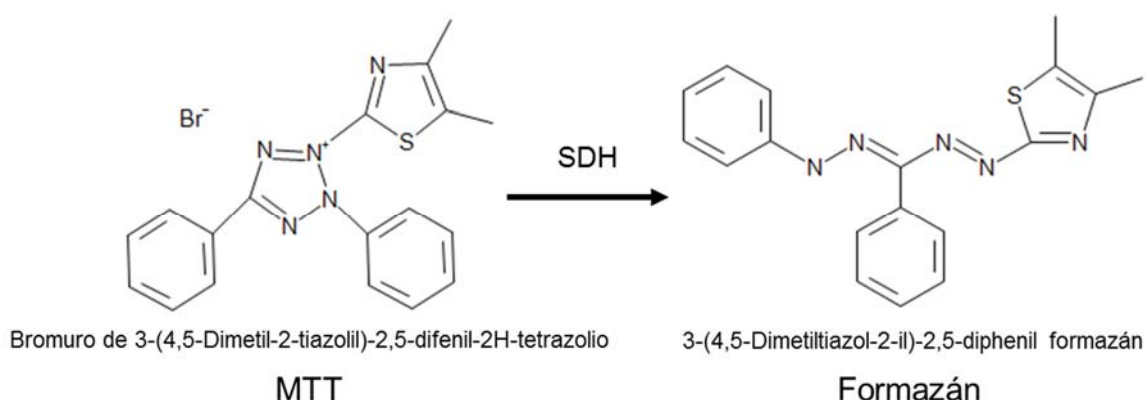


Figura I- 15 Fundamento del ensayo MTT.

El MTT (Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) es permeable a la membrana celular y en la mitocondria es reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial (SDH), a cristales de formazán (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-diphenilformazan).

tetrazolio es permeable a la membrana celular y en la mitocondria es reducido a cristales insolubles de formazán (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-diphenil formazán) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa Figura I- 15. Los cristales de formazán son de color púrpura y debe ser solubilizados con DMSO para cuantificar su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Se considera que la cantidad de formazán que se produce en un cultivo es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

Las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 y T47D fueron cultivadas al 70% de confluencia en flaks de 75 cc. Las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas con 4 ml de Tripsina 0.05% en EDTA y cuantificadas con azul de tripán para sembrar a una densidad celular de acuerdo con la línea celular (MDA-MB-231 y T47D a 1×10^4 células por pozo y MDA-MB-468 y MCF7 a 5×10^3 células por pozo) en placas de 96 pozos. Las células fueron incubadas a 37°C, a una concentración de CO₂ del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1, Mito-Met que oscilaron entre 0.01 μ M y 30 μ M, así como de sus respectivos compuestos parentales SG1, metformina y TPP. En cada ensayo se utilizó medio de cultivo como control libre de tratamiento. Pasadas 24 y 48 horas de incubación, el medio fue reemplazado con tetrazolio (CAS 298-93-1, Alfa Aesar) disuelto en medio de cultivo a una concentración de 0.5 mg.ml⁻¹. Las células fueron incubadas por 1 hora. El medio fue reemplazado por 100 μ L de DMSO grado ACS (CODE: 0231-500ML, Amresco®) por pozo. La formación de formazán se determinó por la lectura de la absorbancia a 595 nm, usando un lector de placa Varioscan Flash. Los resultados fueron normalizados con la absorbancia de los pozos controles libres de tratamiento.

1.5.1.4 Ensayo SYTOX® Green:

SYTOX® Green es una cianina con alta afinidad por los ácidos nucleicos y fácilmente penetra las células con compromiso en la membrana plasmática, así como es impermeable a las células vivas, dado la integridad de sus membranas Figura I- 16. El complejo SYTOX® Green/ADN tiene una excitación y emisión máxima a 504 nm y 523 nm respectivamente. Este ensayo tiene por utilidad la determinación de muerte celular en tiempo real. A mayor presencia de fluorescencia, mayor muerte celular.

Las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 y MCF 10A fueron cultivadas al 70% de confluencia en flaks de 75 cc. Las células fueron tripsinizadas y cuantificadas con azul de tripán para sembrar a una densidad celular dependiente del tipo de célula (MDA-MB-231 a 3×10^4 células por pozo, MDA-MB-468 y MCF7 a 2×10^4 células por pozo y MCF10A a 1.5×10^4 células por pozo) en placas de 24 pozos. Las células fueron incubadas a 37°C, a una concentración de CO₂ del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1, SG1 Y TPP que oscilaron entre 0.1 μ M y 10 μ M diluidas en medio de cultivo, no se utilizó Mito-Met ni metformina, por los resultados

obtenidos en el MTT. En cada ensayo se utilizó medio de cultivo como control libre de tratamiento. Pasadas 48 horas de incubación, el medio fue reemplazado por medio de cultivo libre de suero, con SYTOX green (Ref. S7020, Molecular probes®) a una concentración final de 300 nM y se incubó durante 20 minutos. La fluorescencia se evaluó a través de un microscopio invertido Nikon Eclipse TiS y la cuantificación se realizó con el software NIS-Element Advanced Research 3.2.

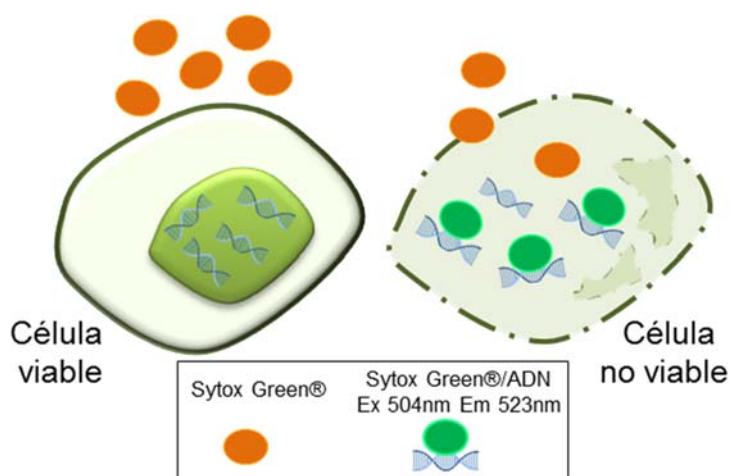


Figura I- 16 Fundamento Ensayo Sytox green®

Sytox green® es una cianina que no es permeable a células viables. En células con compromiso de la membrana celular, característica de las células muertas, Sytox green ingresa a la célula y debido a su alta afinidad por el ADN, se intercala y emite una fluorescencia 500 veces más fuerte, a comparación de la molécula no unida a ADN con un espectro de emisión y excitación de 523/504 nm respectivamente.

1.5.1.5 Ensayo de proliferación celular con azul de tripán:

La proliferación celular fue evaluada mediante la observación manual del número de divisiones de las líneas celulares utilizando la coloración con azul de tripán. El azul de tripán, es un coloide azoico que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana de forma que aquellas que adquieren un color azul son consideradas células no viables Figura I- 17. El número de células vivas, capaces de excluir el colorante, se determina al microscopio usando un contador manual y una cámara de Neubauer.

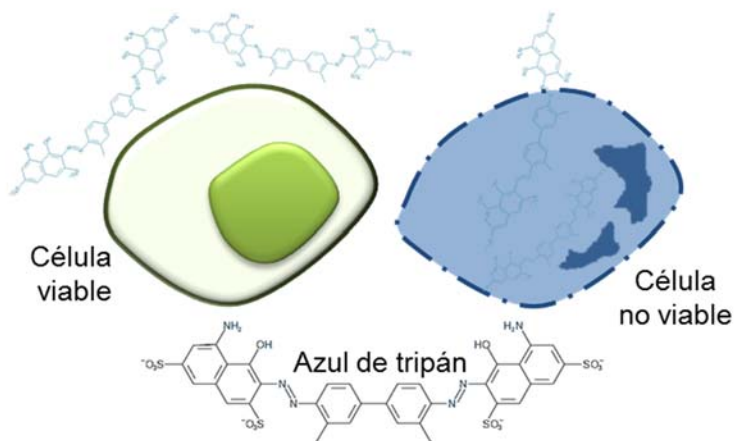


Figura I- 17 Fundamento del ensayo de exclusión del colorante azul de tripán.

El azul de tripán es un coloide azoico que no penetra en membranas celulares de células viables. En células no viables cuyas membranas celulares presentan roturas el colorante penetra generando una coloración azul visible por microscopía óptica convencional.

Las líneas celulares MDA-MB-231 en representación de las líneas celulares TNBC y MCF7 en representación de las líneas celulares no-TNBC fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente. Se utilizó una densidad celular de 1.5×10^5 por pozo, para cultivo en placas de 6 pozos. Las células fueron incubadas a 37°C, a una concentración de CO₂ del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 y SG1 diluidas en medio de cultivo, no se utilizó Mito-Met ni metformina, por los resultados obtenidos en el MTT. En cada ensayo se utilizó medio de cultivo como control libre de tratamiento. Pasadas 24, 48 y 72 horas se tripsinizaron tres muestras por concentración de tratamiento, y se realizó el conteo de células viables con la coloración de azul de tripán al 0.4%, utilizando una cámara de Neubauer.

1.5.1.6 Ensayo de formación de colonias:

La inhibición del crecimiento fue evaluada por el ensayo de formación de colonias (151). En ensayo de formación de colonias fue establecido hace más de 50 años, el primer artículo original que describe la técnica fue en 1956 (152). El ensayo se basa en la habilidad de una célula para crecer y formar una colonia. La colonia es definida como un grupo formado por 50 células o más. Este ensayo es el método de elección para determinar la muerte por inhibición de la reproducción celular después del tratamiento con radiaciones ionizantes, pero también puede ser usado para determinar la efectividad de otros agentes citotóxicos. Únicamente una fracción de las células sembradas retiene la capacidad de producir colonias. Antes o después del tratamiento las células son sembradas en una dilución apropiada para generar colonias entre 1 y 3 semanas. Las colonias son fijadas con glutaraldehído (Paraformaldehído, P6148, 500G, Sigma-Aldrich®) a una concentración del 6.0% v/v, coloreadas con cristal violeta (CODE: 0528-100G, Amresco®) a una concentración de 0.5% p/v y contadas usando un estereoscopio o sistemas de captura de imágenes, para posteriormente realizar el cálculo de la eficiencia de formación de colonias (PE, por sus siglas en inglés Plating Efficiency) y con el PE, se calcula la fracción superviviente (SF, por sus siglas en inglés Surviving Fraction).

Las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente. Se utilizó una densidad celular de 300 células por pozo para cultivo en placas de 6 pozos. Las células fueron incubadas a 37°C, a una concentración de CO₂ del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 y SG1 que oscilaron entre 0.1 μ M y 10 μ M diluidas en medio de cultivo, no se utilizó Mito-Met ni metformina, por los resultados obtenidos en el MTT. En cada ensayo se utilizó medio de cultivo como control libre de tratamiento. A las 24 horas posteriores al tratamiento se realizó cambio de medio de cultivo y se incubaron las placas de 8 a 10 días, dependiendo de la velocidad de cada línea celular para formar colonias visibles (mayor de 15 células por colonia). Para el recuento de colonias, las células

se lavaron con PBS, se fijaron y tiñeron con glutaraldehído al 6% y cristal violeta al 0.5% durante 30 minutos en agitación. Posteriormente, las células se lavaron con agua tipo II y se secaron a temperatura ambiente. Las colonias fueron contadas con el equipo VersaDoc™ imaging systems, posteriormente se realizó el cálculo de la PE y SF, de acuerdo a la ecuaciones (I.1) y (I.2) respectivamente (151).

$$PE = \frac{\text{Número de colonia promedio}}{\text{Número de células sembradas}} \times 100 \quad (I.1)$$

$$SF = \frac{PE \text{ del tratamiento}}{PE \text{ del control}} \times 100 \quad (I.2)$$

1.5.1.7 Ensayo de migración celular:

Para la evaluación de la migración celular se utilizó el ensayo de cierre de herida, más conocido como “*wound healing assay*”. Este ensayo se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células que previamente se le ha realizado una brecha o “herida”. Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la herida. Este experimento permite analizar tanto la migración de la monocapa como el movimiento de células individuales.

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente. Las células fueron incubadas a 37°C, a una concentración de CO₂ del 5% en placas de 24 pozos. Cuando las células lograron el 90% de confluencia, se realizó un lavado con PBS a 37°C, y se procedió a realizar la herida manualmente con puntas amarillas estériles (con capacidad de 10 µL a 200µL). Se procedió nuevamente a lavar las células con PBS a 37°C, para retirar las células sobrenadantes y detritus generados al realizar la herida. Posteriormente se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 que oscilaron entre 0.5 µM a 3 µM diluidas en medio de cultivo, no se utilizó Mito-Met ni metformina, por los resultados obtenidos en el MTT. En cada ensayo se utilizó medio de cultivo como control libre de tratamiento. A las 24 horas posteriores al tratamiento se realizó la captura de imágenes utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TiS. Las imágenes fueron analizadas con el software libre TScratch (CSElab, Zurich, Switzerland) Figura I- 18 (153).

El software TScratch se basa en dos conceptos, área abierta de la imagen (open image área) y porcentaje de la herida abierta (Open wound área). El área abierta de la imagen es dada como el porcentaje de la imagen que no se encuentra ocupada por las células por el algoritmo. TScratch tiene dos modalidades de análisis, directorio individual (single directory mode) y secuencia de data (Time-course) Figura I- 18D. En el modo secuencia de data se puede calcular el porcentaje de herida abierta

Figura I- 18E, la cual se define como la fracción del área de la imagen abierta a un determinado tiempo, con relación al área de la imagen abierta en el tiempo cero. En la Figura I- 18 se pueden observar las principales consideraciones para tener en cuenta para el uso del software.

El grupo CSELab permite el uso del software TScrath a científicos de instituciones sin ánimo de lucro y con propósitos no comerciales. A continuación, se incluye la página oficial del grupo como requisito explícito para el uso del software: <http://www.cse-lab.ethz.ch>.

1.5.2 Desarrollo Objetivo 2

Determinar los efectos apoptóticos de Mito-SG1 en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7).

La apoptosis fue determinada por la caracterización morfológica de los cambios nucleares, evaluada mediante microscopía de fluorescencia con DAPI, cambios a

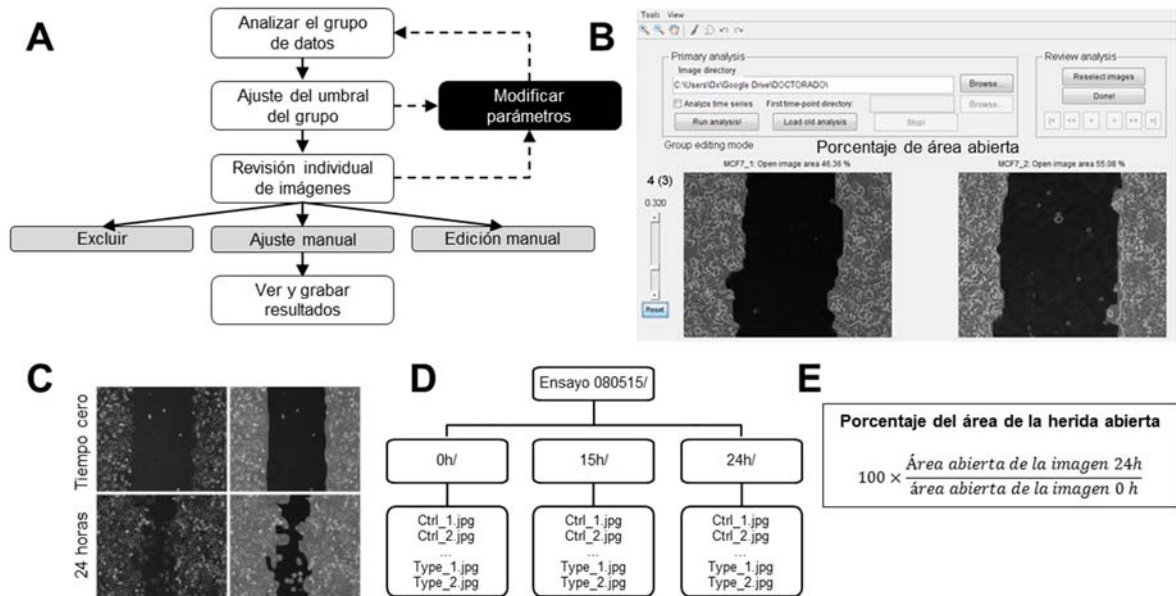


Figura I- 18 TScrath Software.

Se presenta en la imagen una guía rápida para el uso del software, con el objeto de permitir al lector replicar el análisis del ensayo de migración. A) Flujoograma básico de uso del software. B) Pantalla principal, utilizada para subir la data a analizar y calcular el porcentaje de área abierta. C) Ejemplo de ensayo Time-Course, donde se compara el tiempo cero con la migración a las 24 horas. Se observa al lado izquierdo las fotos tomadas en el ensayo, y a lado derecho, el área que selecciona el software como área abierta. D) Ejemplo de cómo se debe organizar el directorio de la data y los archivos en el modo Time-Course. E) Cálculo del porcentaje de la herida abierta, en ensayos Time-course.

Fuente: Tomado y adaptado de Geback T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. TScrath: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques*. 2009 Apr;46(4):265-74.

nivel de membrana citoplasmática medidos por la traslocación de la fosfatidil-serina por citometría de flujo con el kit de Anexina V, la activación de caspasas 3/7 por citometría de flujo y la liberación de citocromo C y activación de ERK mediante la técnica de western blot.

1.5.2.1 Alteraciones en la morfología nuclear:

Las alteraciones en la morfología nuclear ocurren tanto en células necróticas como apoptóticas, y pueden ser evaluadas con el uso de coloraciones fluorescentes observadas por microscopia. Las células sanas muestran una coloración difusa del núcleo. En las células lesionadas el tipo de morfología celular observada depende tanto del tipo célula como del compuesto utilizado, pero generalmente confluye en tres tipos de patrones (Figura I- 19): 1) Condensación de la cromatina: marginación de la cromatina sin condensación nuclear; 2) Fragmentación nuclear: marginación de la cromatina con condensación nuclear; 3) Condensación nuclear: disminución del tamaño del núcleo sin marginación de la cromatina. La marginación hace referencia al agrupamiento de la cromatina al borde o periferia de la membrana, resultante en una pérdida de tinción en otras partes del núcleo. Condensación nuclear se refiere a una disminución en el tamaño del núcleo en comparación con los núcleos de control. La condensación puede estar presente en ambas células apoptóticas y necróticas. La condensación nuclear que ocurre durante la necrosis coincide con la pérdida de la integridad de la membrana, a diferencia de la que ocurre en apoptosis, donde todavía no hay pérdida de la membrana. La fragmentación nuclear que es comúnmente asociada con apoptosis también puede observarse en la necrosis. La condensación de la cromatina es típica de las células apoptóticas y a menudo precede la fragmentación nuclear.

Para evaluar estos cambios de la morfología nuclear se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). DAPI, es un colorante nuclear fluorescente, que se basa en la fijación de la región adenina-timina en secuencias del ADN de doble cadena tanto en células vivas como en células fijadas. La tinción DAPI al ser excitada con luz UV en el microscopio fluorescente, emite un color fuerte azul

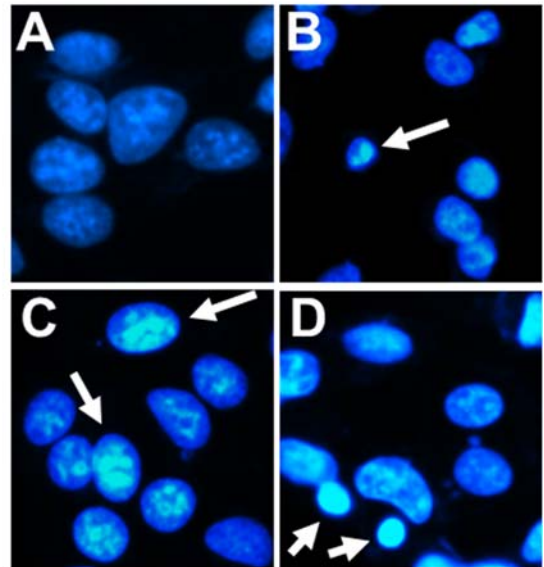


Figura I- 19 Cambios morfológicos nucleares visualizados con DAPI.

La línea celular MCF-7 fue tratada por 48 horas con MitoSG1 a una concentración de 5 μ M. A) Morfología nuclear normal. B) Se indica con la flecha blanca, la fragmentación nuclear. C) Se indica con la flecha blanca, la condensación de la cromatina. D) Se indica con la flecha blanca, la condensación nuclear.

fluorescente cuando se encuentra adherido al ADN bicatenario en una absorción de longitud de onda de 461nm.

Las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente. Se utilizó una densidad celular de 2.5×10^5 para cultivo en placas de 6 pozos. Las células fueron incubadas a 37°C, a una concentración de CO₂ del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1, y pasadas 48 horas se lavaron las células con PBS, se fijaron con etanol absoluto, se permeabilizaron con Triton al 0.1% y se colorearon con DAPI a una concentración de $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ por 15 minutos en oscuridad. Las placas fueron lavadas con PBS y se observaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse TiS. Se contaron un mínimo de 200 núcleos por muestra. El total de núcleos alterados se dividió por el total de núcleos contados y se multiplicó por 100. Para la condensación nuclear, se compara con el tamaño del núcleo de las células del control. La condensación debe ser menor al 50% del núcleo control. La fragmentación nuclear es el cambio más evidente de los tres parámetros a evaluar, dado que debe presentar las dos características: condensación nuclear y marginación de la cromatina. La condensación de la cromatina es caracterizada por un incremento de la coloración del ADN a los lados, periferia o el núcleo sin disminución en el tamaño del núcleo en comparación con los núcleos control. Las imágenes fueron analizadas con el software NIS Elements AR Advanced Research 3.2 (Nikon) para calcular el área, la circularidad, el factor de forma, la intensidad media de fluorescencia y la variación de la intensidad de fluorescencia, los parámetros obtenidos fueron clasificados en excel para determinar el tipo de cambio morfológico y la significancia fue calculada en GraphPad Prism 5.

1.5.2.2 Ensayo de Anexina V:

Cuando se desea diferenciar la apoptosis de la necrosis, se hace indispensable la evaluación de los cambios a nivel de membrana citoplasmática, como lo es la translocación de la fosfatidil-serina (FS) localizada en la superficie citoplasmática, hacia la cara externa de la membrana plasmática, convirtiéndola en un marcador de superficie de apoptosis. La FS se identificó como marcador de la superficie de los leucocitos que entran en apoptosis, permitiendo que sean reconocidos por los macrófagos y, por ende, puedan ser fagocitados. El anticoagulante Anexina V, es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca²⁺ que tiene una alta afinidad por la FS. De esta forma, al marcar la Anexina V con un fluoróforo, se pueden identificar las células apoptóticas por la unión a la FS expuesta en la cara externa de la membrana plasmática Figura I- 20.

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente en el objetivo 1. Se utilizó una densidad celular de 2.5×10^5 para cultivo en placas de 6. Las células fueron incubadas a 37°C , a una concentración de CO_2 del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 por

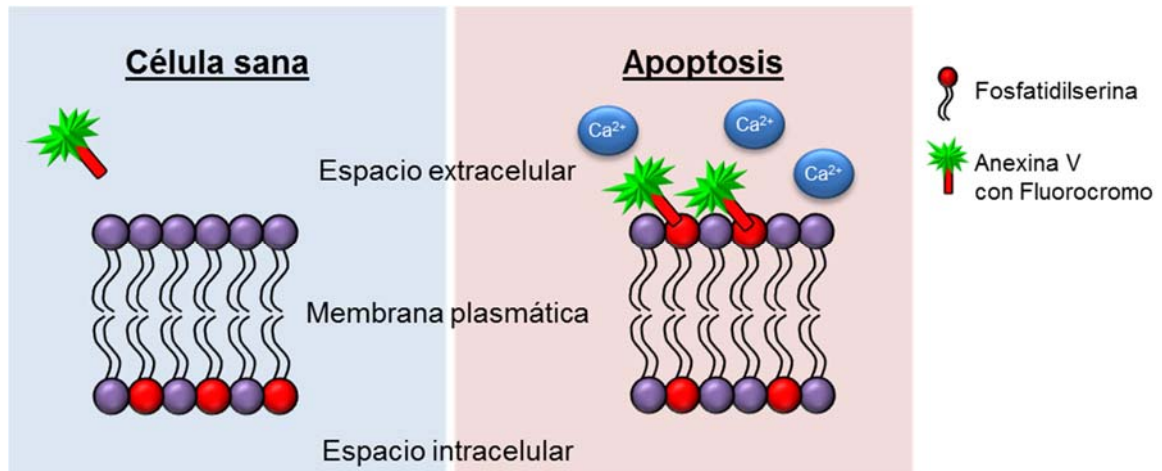


Figura I- 20 Fundamento ensayo de Anexina V

El ensayo de anexina V se basa en la alta afinidad en presencia de Ca^{2+} que tiene el anticoagulante Anexina V por la fosfatidilserina (FS). La FS se encuentra en células sanas en la cara interna de la bicapafosfolipídica hacia el espacio intracelular, y en células apoptóticas se ha traslocado a la cara externa de la bicapafosfolipídica, quedando expuesta al espacio extracelular y permitiendo su unión con la Anexina V. La Anexina V viene conjugada con un fluorocromo permitiendo su detección por citometría de flujo.

un periodo de 24 horas y 48 horas, utilizando como control positivo Estausporina a $5 \mu\text{M}$ 3 horas previas a la lectura y como control negativo durante todo el experimento, medio de cultivo. Se utilizó el kit FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI, for Flow Cytometry (Cat. No. V13242, molecular probe®, Invitrogen), el cual tiene anexina V marcada con fluoresceína y se utiliza el Ioduro de propidio (PI) como contraste de muerte celular, dado que el PI impermeable a membranas celulares integrales. Lo anterior permite evaluar 4 poblaciones: células viables (Anexina V-/PI-), apoptosis (Anexina V+/PI-), Apoptosis tardía/necrosis (Anexina V+/PI+) y necrosis (Anexina V-/PI+). El ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, con una captura mínima de 10.000 eventos en un citómetro FACS CANTO BD system.

1.5.2.3 Ensayo de activación de caspasas 3/7:

Las caspasas son proteasas claves en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por diversos estímulos. Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son traslocadas a

compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre éstos se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales, factores de transcripción, entre otras. Existen 2 vías de activación de la apoptosis Figura I- 21: vía extrínseca, cuando los receptores de muerte son reconocidos por su ligando específico, o en su defecto se presenta una supresión de los factores de crecimiento u hormonales; y la vía intrínseca, por activación de la vía mitocondrial por daño al citosol o núcleo. Uno de los mecanismos ampliamente usados para evaluar apoptosis, es detectar la activación de las caspasas efectoras 3 y 7, dado que ambas vías confluyen en su activación (142).

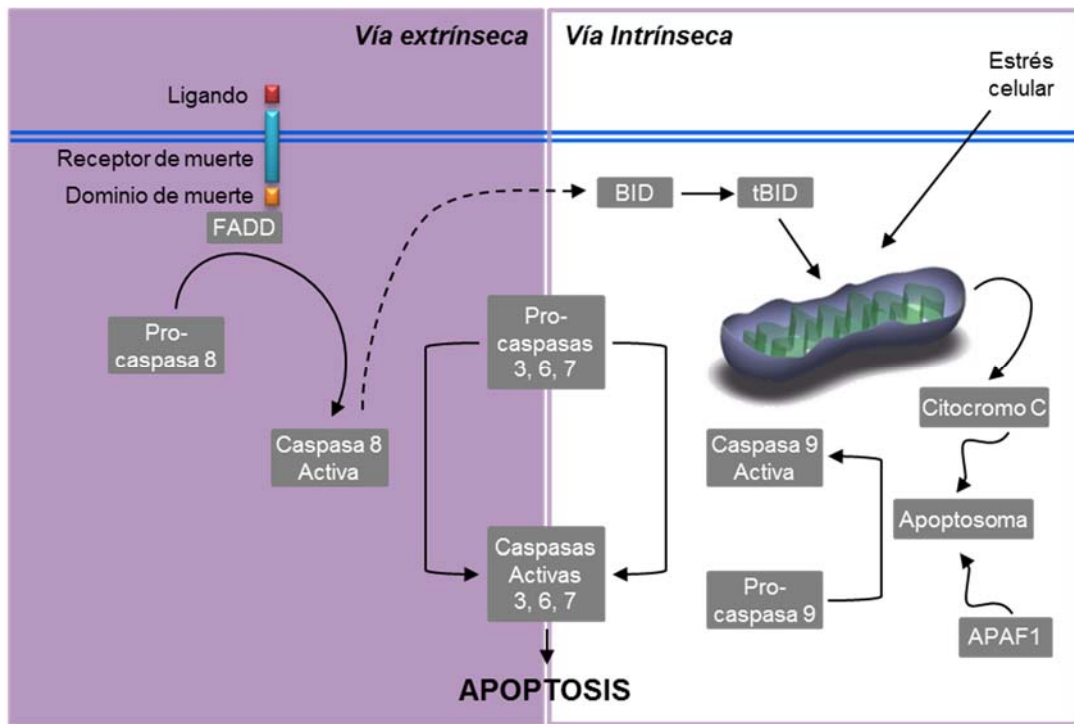


Figura I- 21 Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

La vía de apoptosis extrínseca se activa a través de la unión de un ligando a un receptor de muerte, lo que a su vez conduce, a que las proteínas adaptadoras (FADD/TRADD), ayuden al reclutamiento, dimerización y activación de la caspasa-8. La caspasa-8 activa inicia la apoptosis directamente por escisión de las pro-caspasas ejecutoras (3, 6, 7), o activa la vía apoptótica intrínseca a través de la escisión del BID para inducir la muerte celular. La vía de la apoptosis intrínseca o mitocondrial puede ser activada a través de estrés celular que conducen a la liberación del citocromo C de las mitocondrias y a la formación del apoptosoma, compuesto por APAF1, citocromo c y ATP. El apoptosoma se encarga de la activación de la caspasa 9, quien inicia la apoptosis por escisión de las pro-caspasas ejecutoras (3, 6, 7).

Fuente: Tomado y adaptado de McIlwain DR, Berger T, Mak TW. *Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Apr 01;5(4):a008656.

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente en el objetivo 1. Se utilizó

una densidad celular de 2.5×10^5 para cultivo en placas de 6 pozos. Las células fueron incubadas a 37°C , a una concentración de CO_2 del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 por un periodo de 24 horas, utilizando como control positivo Staurosporina a $5 \mu\text{M}$ 3 horas previas a la lectura y como control negativo durante todo el experimento, medio de cultivo. Se utilizó el kit Magic Red® Caspase-3/7 Assay Kit (Referencia 935, ImmunoChemistry Technologies). Este kit permite monitorear *in vitro* la apoptosis por la actividad intracelular de caspasas 3 y 7. El sustrato Magic Red- Ácido aspartil-glutamil-valanil-aspartico, denominado en el kit como sustrato MR-(DEVD)₂, que consiste en una molécula de violeta de cresilo unida a dos copias del sustrato DEVD (4 secuencias de amino ácidos, considerados el blanco óptimo para las caspasas 3 y 7). Cuando el MR-(DEVD)₂ está intacto, la fluorescencia es aplacada o apagada. Cuando el MR es cortado del DEVD por las caspasas activas, este se acumula en los lisosomas y emite una fuerte fluorescencia roja. De esta manera es detectado por citometria de flujo.

El ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, en resumen, una vez las células son recolectadas para su análisis, se ajusta la densidad celular a una concentración entre 1×10^5 y 1×10^6 células/mL. Se transfieren 300 μL de la suspensión celular a tubos de citometria, y se adiciona el sustrato MR-(DEVD)₂ a una dilución de 1:30 con relación a la suspensión celular que para este caso son 10 μL . Se incubó por 30 minutos a 37°C , y debido a que el sustrato no presenta interferencia con el canal verde/FITC, se procedió a realizar un análisis de doble color usando Sytox green® a una concentración de 300nM por 15 minutos como colorante vital para y poder identificar 4 poblaciones celulares: células viables MR-(DEVD)₂(-)/Sytox green(-); Apoptosis temprana MR-(DEVD)₂(+)/Sytox green(-); Apoptosis tardía MR-(DEVD)₂(+)/Sytox green(+); y Necrosis MR-(DEVD)₂(-)/Sytox green(+). Se realizó una captura mínima de 10.000 eventos en citómetro FACS CANTO BD system.

1.5.2.4 Extracción y cuantificación de proteínas citosólicas y mitocondriales:

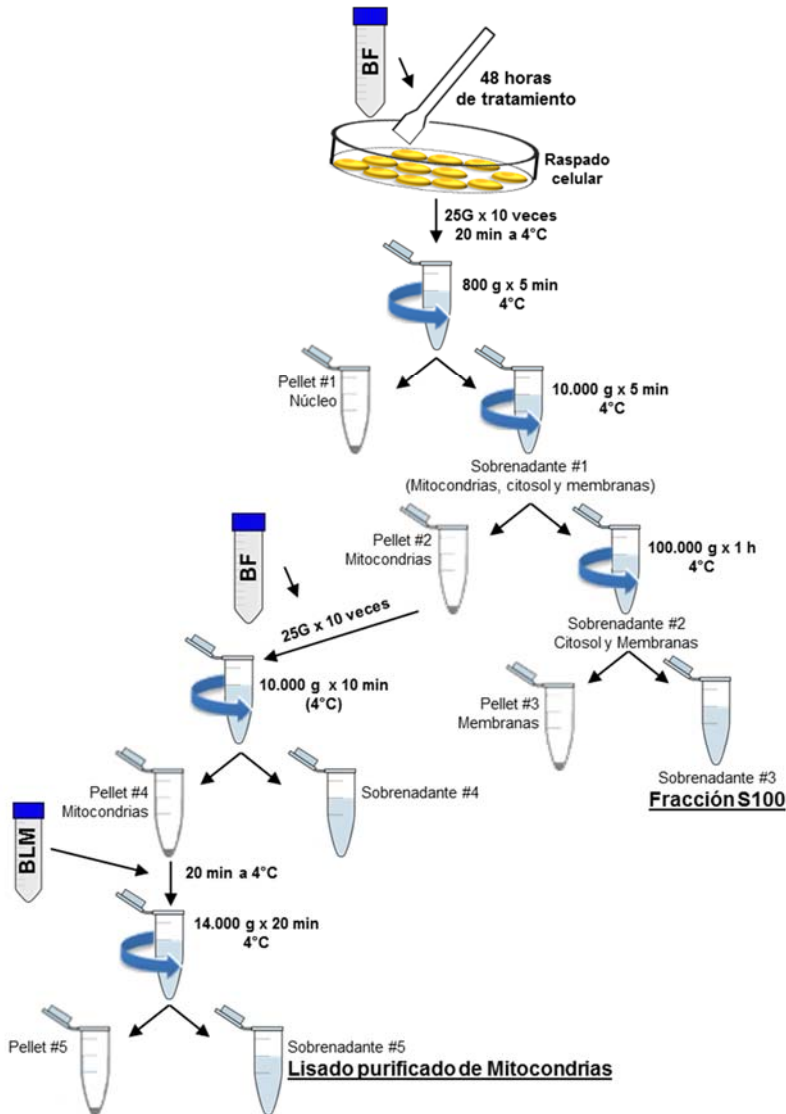
Para la extracción de proteínas citosólicas y mitocondriales a partir de cultivos celulares, las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7 fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente. Se utilizaron 3 cajas de Petri de 100 mm para el cultivo del control y concentraciones bajas del tratamiento, y 4 o 5 cajas de Petri de 100 mm para las concentraciones altas del compuesto, debido a la disminución de la viabilidad celular y por ende de la proteína obtenida. Las células fueron incubadas a 37°C , a una concentración de CO_2 del 5% hasta obtener una monocapa del 60% de confluencia. Se realizó un lavado con PBS 1X (Cat No. 70011044, Gibco) a 37°C y se adicionó el tratamiento con Mito-SG1 a diferentes concentraciones de acuerdo con el IC_{50} del compuesto en la respectiva línea celular. Pasadas 48 horas de cultivo, se retiró el medio y las células fueron lavadas con PBS frío, y se inició la lisis celular.

A partir de este momento, todo el proceso se realizó en frío (temperatura entre 0°C y 8°C), se procedió a adicionar 300 µL de buffer de fraccionamiento celular el cual fue preparado con Hepes 20 mM pH 7.4 (Ref. 15630-080, Gibco), KCL (Cas No 7447-40-7, Sigma-Aldrich®) 10 mM, MgCL₂ 2mM (Cas No 7791-18-6, Fisher scientific), EDTA 1mM (Cas No 60-00-4, Sigma-Aldrich®). Se disuelve con la adición de NaOH 1 N y se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1N), EGTA 1 mM (Code 00732-10G, Amresco®), DTT 1mM (Code 0281-5G, Amresco®) en agua desionizada, suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas 1X (Código M222-1ML, Amresco®) e inhibidores de fosfatasas: Ortovanadato de sodium 1Mm (Código 450243-10G, Sigma-Aldrich®) y floruro de sodio 3 mM (Ref. S6776-100G, Sigma-Aldrich®). La separación de la Fracción S100 y del lisado purificado de proteínas mitocondriales se realizó como se detalla en la Figura I- 22.

La concentración de proteínas citosólicas se determinó mediante el método de Bradford. La dilución usada fue de 1:2, utilizando 10 µl de muestra más 10 µL de buffer de fraccionamiento, se adicionaron 300 µL del reactivo de Bradford (code E530-1L, Amresco®), se procedió a vortear y realizar lectura inmediata a 595 nm. La concentración de proteínas mitocondriales se determinó mediante el ensayo de BCA, utilizando el kit Pierce® BCA Protein Assay Kit (Prod # 23225, Thermo scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante para lectura en microplaca. Para ambos métodos se utilizó una curva de concentración conocida de BSA (Prod # 23225, Thermo scientific) como patrón de referencia disuelta en el buffer correspondiente de acuerdo con el método de extracción usado.

Figura I- 22 Flujograma de extracción y separación de proteínas citosólicas y mitocondriales.

Las células fueron recolectadas por raspado celular en tubos eppendorf de 2 ml, posteriormente fueron pasadas por aguja de 25 G 10 veces y se mantuvieron en hielo por 20 minutos. Luego se procedió a centrifugar a 800 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el pellet #1 que contenía los núcleos y el sobrenadante #1 fue trasvasado a nuevos tubos eppendorf, los cuales fueron centrifugados a 10.000 g a 4°C por 5 minutos. El pellet #2 contiene las mitocondrias, y el sobrenadante #2 contiene las proteínas citosólicas y membranas. Para obtener la fracción S100 (proteínas citosólicas), el sobrenadante #2 se transfirió a tubos de policarbonato y fue centrifugado a 100.000 g a 4°C por 1 hora (el pellet #3 fue descartado y el sobrenadante #3 el cual corresponde a la Fracción S100 fue alícuotado y almacenado a -70°C). Para obtener las proteínas mitocondriales, el pellet #2 que contiene las mitocondrias fue resuspendido en 250 µL de buffer de fraccionamiento, y se procedió a purificar el lisado de mitocondrias pasándolo 10 veces por aguja de 25 G para lisar las células que todavía se encuentren integras y centrifugar nuevamente a 10.000 g por 10 minutos. El sobrenadante #4 es descartado y el pellet #4 fue resuspendido en 100 µL buffer de lisis mitocondrial (Cat No 43-042, Millipore), en agitación constante por 20 minutos a 4°C. Se centrifugó a 14.000 g a 4°C por 20. El pellet #5 fue descartado y el sobrenadante #5 fue alícuotado y almacenado a -70°C. BF: Búfer de fraccionamiento, BLM: Búfer de lisado mitocondrial.



1.5.2.5 Fraccionamiento electroforético de proteínas y Western blot para determinación de liberación de Citocromo C al citosol:

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli (154). Se cargaron 40 µg de proteína por cada muestra en buffer de carga previamente denaturalizadas por 5 minutos a 90°C. La calibración de los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo con un marcador de peso molecular de 10kDa a 175kDa (Cat No G252 Opti-Protein Marker, ABM). Se utilizó una cámara de mini-electroforesis de biorad, con un tiempo aproximado de 70 minutos de corrida electroforética, a voltaje constante de 140 V. Se utilizó un gel de 16% para la corrida de citocromo C, dado su bajo peso molecular.

Se detallan a continuación la preparación de las soluciones utilizadas:

Tabla I-1 Búfer de carga desnaturizante

Reactivos	Concentración
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	25%
Glicerol	20%
SDS 10%	40%
2-Mercaptoetanol	10%
Azul de Bromofenol	Una pizca

Tabla I-2 Búfer de Corrida

Reactivos	Concentración (mM)
Tris Base	24.8
Glicina	191.8
SDS	3.5

Tabla I-3 Gel de Concentración

Reactivos	Cantidad dos (2) geles (µL)
H ₂ O Tipo I	3400
Bis/acriladamida 30%	920
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	1250
SDS 10%	60
APS 10%	120
TEMED	20

Tabla I-4 Gel de corrida al 16%

Reactivos	Cantidad dos (2) geles al 16% (μL)
H ₂ O Tipo I	2200
Bis/acrilamida 30%	5400
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2600
SDS 10%	100
APS 10%	50
TEMED	20

1.5.2.5.1 Tinción de proteínas:

Las proteínas resueltas en geles de poliacrilamida se tiñeron con una solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 (Ref 1610436, BioRad) durante 6-8 horas. La eliminación del exceso de colorante no unido a proteína se realizó mediante difusión de éste por 30 minutos en una solución decolorante fuerte compuesta por ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 50% (v/v), seguida de una incubación de 12-48h con una solución decolorante débil (Metanol 5%, Acético 10%) y conservándolo finalmente en solución de almacenamiento (Acético 1%) a 4°C. La tinción de proteínas se utilizó para validar la electroforesis, la resolución de las bandas, y determinar las condiciones óptimas de la corrida electroforética (Figura I- 23). No se utilizaron geles teñidos previamente con coomassie para para el western blot.

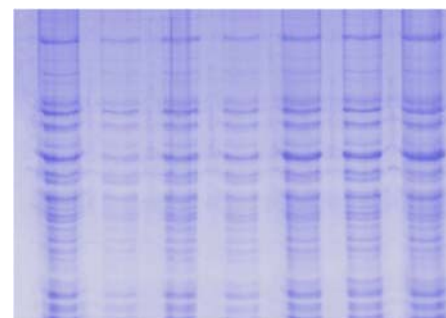


Figura I- 23 Tinción Coomassie.
Gel de poliacrilamida al 16%, lisado celular MCF7.

1.5.2.5.2 Western blot:

Las proteínas fraccionadas en geles por electroforesis fueron transferidas a membranas de PVDF de 0,2 μm (Prod # 88520, Thermo scientific) mediante electrotransferencia húmeda. Las membranas fueron previamente activadas y acondicionadas pasándolas 5 segundos por metanol absoluto, 5 minutos en H₂O Tipo I, y por último 20 minutos en búfer de transferencia en agitación constante. Para la transferencia húmeda se utilizó un equipo Mini Trans Blot® de Bio-Rad, empleando un voltaje constante de 100V durante 90 minutos, en búfer de transferencia con un rango de temperatura entre 8 y 10°C. A continuación, las membranas se sumergieron en solución de bloqueo durante al menos 2 horas con agitación y a temperatura ambiente. La incubación de la membrana con el anticuerpo primario de citocromo C anticuerpo monoclonal de ratón IgG_{2b} (Ref. sc-13560, Santa Cruz Biotechnology, 1:300), fue realizada a 4°C durante toda la noche. A continuación, las membranas se lavaron 5 veces durante 5 min en agitación

constante con TBS-Tween 20 (0,1%). Posteriormente las membranas se incubaron en anticuerpo secundario de cabra contra IgG de ratón (Ref. sc-2031, Santa Cruz Biotechnology, 1:50000), y anticuerpo secundario de cabra contra IgG de conejo (Ref. sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, 1:50000) conjugados a peroxidasa de rábano picante en solución de dilución de anticuerpos. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Ref. 34095, Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante, y se tomaron las fotos en el equipo VersaDoc™ imaging systems. La cuantificación y normalización de la intensidad de las bandas resultantes se determinó utilizando el software ImageJ.

A continuación, se detallan las concentraciones utilizadas para cada una de las soluciones empleadas:

Tabla I-5 Búfer de Transferencia

Reactivos	Concentración
Tris Base	24.8 mM
Glicina	191.8 mM
Metanol	4.7 M

Tabla I-6 Solución de Bloqueo

Reactivos	Concentración
BSA	3%
TBS	Aforar

Tabla I-7 Solución de Dilución de Anticuerpos

Reactivos	Concentración
BSA	0.3%
Tween 20	0.1%
TBS	Aforar

Tabla I-8 Solución de TBS

Reactivos	Concentración (mM)
NaCl	154
Tris HCl pH 7.4	50

1.5.3 Desarrollo Objetivo 3

Examinar los efectos de Mito-SG1, sobre el potencial de membrana mitocondrial, el estrés oxidativo y la bioenergética mitocondrial en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7).

El potencial de membrana fue determinado para evaluar la potencial despolarización mitocondrial. Para evaluar el estrés oxidativo se observó el efecto de Mito-SG1 sobre la producción de superóxido, por medio de la sonda de MitoSOX™ Red. Para todos los experimentos se utilizaron cultivos celulares con y sin tratamiento, los cuales fueron realizados según lo expuesto en el objetivo 1. Las pruebas para medir bioenergética mitocondrial en tiempo real se realizaron en el analizador de flujo extracelular XF^e24 (Seahorse Bioscience, part of Agilent).

1.5.3.1 Potencial de membrana mitocondrial:

Una característica temprana de la apoptosis es la disrupción de la mitocondria. La disrupción de la mitocondria incluye los cambios en el potencial de membrana y alteraciones del potencial de óxido-reducción de la mitocondria. Los cambios en el potencial de membrana pueden ocasionarse dado a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, permitiendo el paso de iones y pequeñas moléculas. El equilibrio resultante de los iones, lidera el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la liberación del citocromo c.

Un método convencional para evaluar el potencial de membrana es con el uso de sondas, las cuales se acumulan en la mitocondria dado su carga electronegativa. Los cambios en el potencial de membrana pueden ser medidos por una variedad de técnicas fluorescentes tales como citometría de flujo y microscopia. Para el presente proyecto, utilizamos el catión lipofílico citofluorométrico JC1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil bencimidazolilo carbocianina Ioduro), dado que presenta ventajas sobre las otras tintas catiónica, porque puede entrar selectivamente en la mitocondria y generar un cambio de color reversible de rojo-J-agregados (~590nm) a verde-monómeros (~529nm), correspondiente al potencial de membrana presente Figura I- 24.

En consecuencia, la despolarización mitocondrial está indicada por una disminución en la relación de intensidad de fluorescencia roja/verde. JC1 es más específica para evaluar el potencial de membrana mitocondrial en comparación con la membrana plasmática, y es más consistente en la respuesta a despolarización que otras tintas catiónicas como DiOC6(3) (3,3'-Dihexil oxacarbocianina Ioduro) y rodamina 123. El ratio de verde a rojo fluorescente depende únicamente del potencial de membrana y no de otros factores tales como el tamaño de la mitocondria, forma y densidad, los cuales pueden afectar la señal de fluorescencia de un solo componente.

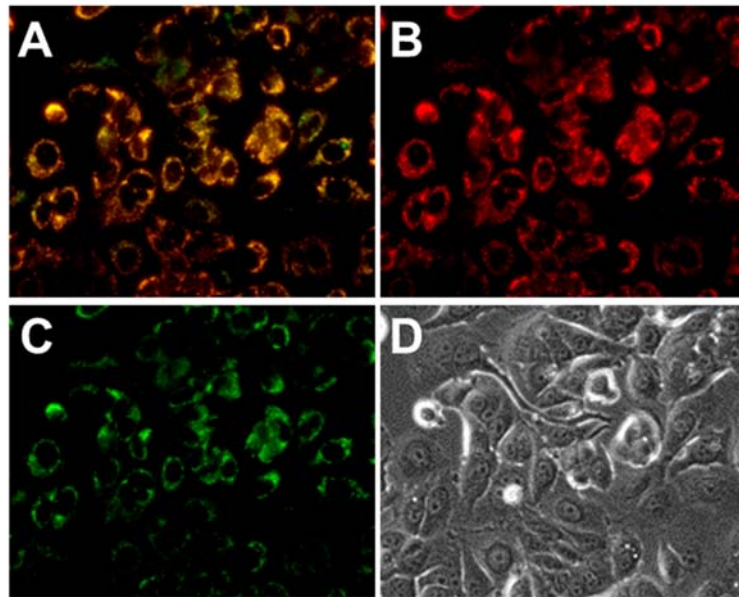


Figura I- 24 Evaluación del potencial de membrana con el uso de la sonda radiométrica JC1 en la línea celular MCF7.

La línea celular MCF-7 fue tratada por 24 horas con medio de cultivo como control. A) Co-localización de los dos canales rojo (~590nm) y verde (~529nm). B) Canal rojo. C) Canal verde. D) Contraste de fase.

Las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente. Se utilizó una densidad celular de 4×10^4 para cultivo en placas de 24 pozos para evaluación por microscopia fluorescente y placas de 6 pozos a una densidad celular de 2.5×10^5 células por pozo, para evaluación por citometría de flujo. Las células fueron incubadas a 37°C , a una concentración de CO_2 del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 por un periodo de 24 horas. Las placas fueron lavadas con PBS, y tratadas con una concentración de JC1 de $10 \mu\text{M}$ por 20 minutos y observadas en un microscopio invertido Nikon Eclipse TiS. Para la lectura por citometría de flujo las células fueron tripsinizadas previamente al tratamiento con JC1 y fueron analizadas en un citómetro FACS CANTO de BD system con un mínimo de 10.000 eventos, con lectura en los canales rojo y verde.

1.5.3.2 Estrés oxidativo:

El estrés oxidativo fue determinado por la producción de superóxido mitocondrial. Para determinar el superóxido se utilizó la sonda MitoSOX™ Red realizando la lectura en microscopio invertido Nikon Eclipse TiS, y cuantificando la fluorescencia con el software NIS-Elements AR 3.2. Los resultados fueron verificados por citometría de flujo usando un citómetro FACS CANTO BD system.

La sonda de MitoSOX™ Red, es permeable en células vivas y tiene afinidad selectiva por la mitocondria. Una vez dentro de la mitocondria la sonda es oxidada por el superóxido, pero no por otras especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno reactivas. La oxidación de la sonda es prevenida por el superóxido dismutasa. La sonda MitoSOX™ Red está compuesta por hidroetidina (HE) conjugada a un catión de hexil-trifenilfosfonio, y aunque tanto la HE como Mitosox pueden ser oxidados por el superóxido mitocondrial, únicamente mitosox puede ser usado para determinar la oxidación específica en la mitocondria, debido a su acumulación específica por la diferencia de carga Figura I- 25. La HE es oxidada por el superóxido

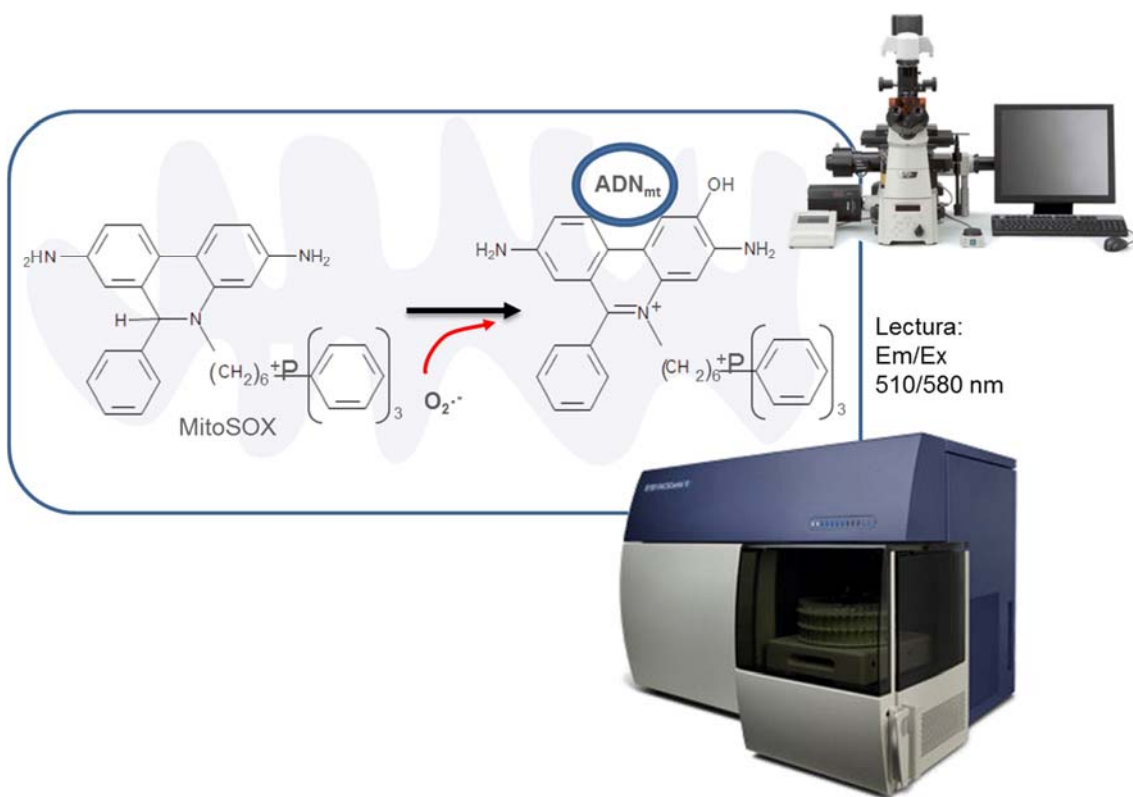


Figura I- 25 Ensayo de MitoSOX™ Red.

El ensayo de MitoSOX™ Red, se basa en la acumulación selectiva de la Hidroetidina en la mitocondria, debida a su enlace con trifetilfosfina. Una vez el MitoSOX™ Red se encuentra en la mitocondria, es oxidado por el superóxido. Los productos de la oxidación (etidio), son altamente atraídos por el ADN mitocondrial (ADN_{mt}), generando un espectro fluorescente con una emisión/excitación de 510/580 nm respectivamente. La señal se puede detectar tanto por microscopia de fluorescencia como por citometría.

a etidio, el cual tiene fuerte afinidad por los ácidos nucleicos (155), con la característica de emitir fluorescencia en un espectro de emisión y excitación de 510/580 nm respectivamente.

Las líneas celulares de MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7 se sembraron a una densidad de 4×10^4 células por pozo respectivamente, se incubaron por 24 horas, posteriormente se retiró el medio de cultivo, se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 por 24 horas y se utilizó medio de cultivo como control negativo. Posterior al tiempo de tratamiento las células fueron lavadas con PBS a 37°C y tratadas con MitoSOX™ Red a una concentración de 3 µM por 30 minutos. Las células fueron observadas con un microscopio invertido Nikon TiS con lámpara de fluorescencia de acuerdo con la longitud de onda de emisión/excitación de 510/580 nm respectivamente Figura I- 25.

Para la verificación por citometría de flujo, se utilizaron placas de 6 pozos con una densidad celular de 1.5 a 2×10^5 células por pozo. El tratamiento se realizó pasadas 24 horas de incubación, con diferentes concentraciones de Mito-SG1. Después de 24 horas de cultivo, se procedió a tripsinizar las células, el pellet fue lavado con PBS y tratado con 3 µM MitoSOX™ Red por 15 minutos a 37°C.

Dado la variabilidad de los resultados, se procedió a estandarizar la técnica fijando con glutaraldehído frío al 2% en hielo por 20 minutos. Las células se pasan a tubo de citometría y se centrifugan 5 minutos a 1450 rpm, el pellet es reconstituido en 500 µl de PBS 1X frío. La lectura se realiza en un citómetro de flujo FACS CANTO II BD system.

1.5.3.3 Wester blot de ERK p-ERK:

1.5.3.3.1 *Extracción y cuantificación de proteínas totales:*

Para la extracción de proteína total a partir de cultivos celulares, las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7 fueron cultivadas, lavadas, tripsinizadas y contadas como se describe anteriormente. Se utilizó una densidad celular de 2.5×10^5 para cultivo en cajas de Petri de 100 mm. Las células fueron incubadas a 37°C, a una concentración de CO₂ del 5% hasta obtener una monocapa del 70% de confluencia. Se realizó un lavado con PBS a 37°C y se adicionó el tratamiento con Mito-SG1 a diferentes concentraciones de acuerdo con el IC₅₀ del compuesto en la respectiva línea celular. Terminada la incubación por 48 horas con los respectivos tratamientos, las células fueron lavadas con PBS, y se adicionaron 400 µL de un buffer de lisis celular (Millipore) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas 1X e inhibidores de fosfatasa (Ortovanadato de sodio 1 mM y fluoruro de sodio 3 mM) Figura I- 26.

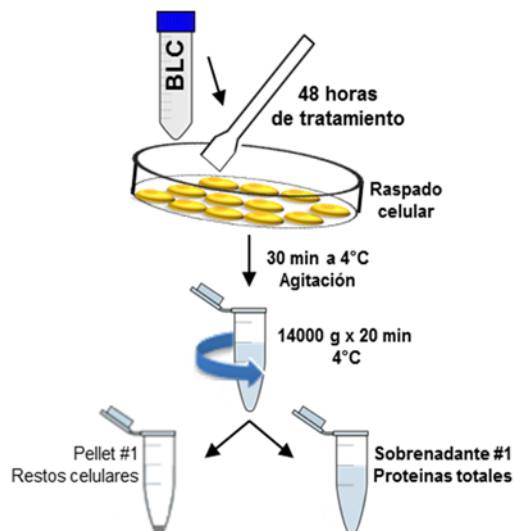


Figura I- 26 Flujograma de extracción y separación de proteínas totales.

Después de 48 horas de tratamiento con MitoSG1, las células fueron lavadas con PBS frío, y se adicionaron 400 μ L de Búfer de lisis celular (BLC). Se realizó raspado celular y el volumen obtenido fue envasado en un eppendorf de 2ml donde se mantuvo en agitación constante a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, se realizó centrifugación a 14.000 g por 20 minutos a 4°C. El pellet #1 corresponde a restos celulares, y el sobrenadante #1, corresponde a las proteínas totales.

Las células fueron recolectadas por raspado celular en tubos eppendorf de 2 ml, y mantenidas en agitación constante en agitador orbital por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron en ultracentrífuga refrigerada (4°C) a 14.000 g por 20 minutos. El sobrenadante, el cual contiene las proteínas totales, fue almacenado a -70°C. La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método de BCA siguiendo las instrucciones del fabricante usando una solución de concentración conocida de BSA como patrón de referencia.

1.5.3.3.2 Fraccionamiento electroforético de proteínas y Western blot para determinación de Erk1 y P-Erk1/2:

El fraccionamiento electroforético de proteínas y western blot se realiza según lo descrito en el ítem 1.5.2.6.2, con las siguientes variaciones: se utilizaron 20 μ g de proteína por línea en un gel de 14% de policrilamida Tabla I-9.

Tabla I-9 Gel de corrida al 14%

Reactivos	Cantidad dos (2) geles al 14% (μ L)
H ₂ O Tipo I	2800
Bis/acriladamida 30%	4800
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2600
SDS 10%	100
APS 10%	50
TEMED	20

El procedimiento de Western blot se realizó de la forma descrita en el ítem 1.5.2.5.2 de la metodología del objetivo 2, con las siguientes variaciones en los anticuerpos primarios utilizados: Erk1 anticuerpo policlonal IgG de conejo (Ref. sc-94, Santa Cruz Biotechnology, 1:2000), p-Erk1/2 (Thr 177) anticuerpo policlonal IgG de conejo (Ref. sc-16981-R, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), Actina (I-19) anticuerpo policlonal IgG de cabra (Ref. sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, 1:500). Los anticuerpos secundarios de ratón y cabra se utilizaron a una dilución de 1:20.000 debido a que el sustrato utilizado fue SuperSignal™ West Dura Extend Substrate (Ref. 34075, Thermo Fisher Scientific).

1.5.3.4 Bioenergética mitocondrial:

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la acidificación extracelular (ECAR) se realizó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA) Figura I- 27.

El instrumento mide en tiempo real el consumo de oxígeno, así como la extrusión de protones. Durante el ensayo, los niveles de analitos se miden hasta que la concentración de oxígeno desciende a 30 mmHg y el pH declina a 0.4 unidades de pH. Las medidas se realizaron en placas de 24 pocillos estériles especiales Figura I- 27B, utilizando un cartucho calibrador que permite el paso de dos biosensores fluorescentes (O₂ y pH) así como, suministra cuatro puertos diferentes por pocillo, útiles para permitir la inyección secuencial de diferentes compuestos Figura I- 27C.

Los biosensores del equipo se calibraron antes de cada experimento con el fin de asegurar una ganancia única del sensor basada en la señal proporcionada por la medida de la calibración con una solución de referencia con valores de oxígeno y pH conocido Figura I- 27A. Se utilizó el XF Cell Mito Stress Test Kit para evaluar la respiración mitocondrial, dado que permite la evaluación de 6 parámetros claves: respiración basal, máxima capacidad respiratoria, capacidad de reserva respiratoria, fuga de electrones, producción de ATP, y respiración no mitocondrial, por medio del uso de inhibidores específicos tales como, oligomicina A, carbonilo cianuro 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), antimicina A y rotenona.

En la Figura I- 28, se pueden observar los parámetros a evaluar de acuerdo con el tipo de compuesto utilizado. La inyección de oligomicina genera una disminución del consumo de oxígeno, el cual es debido a la inhibición que el compuesto realiza sobre el complejo V de la CTE (ATP sintasa), lo que permite evaluar la respiración mitocondrial que está asociada con la producción de ATP.

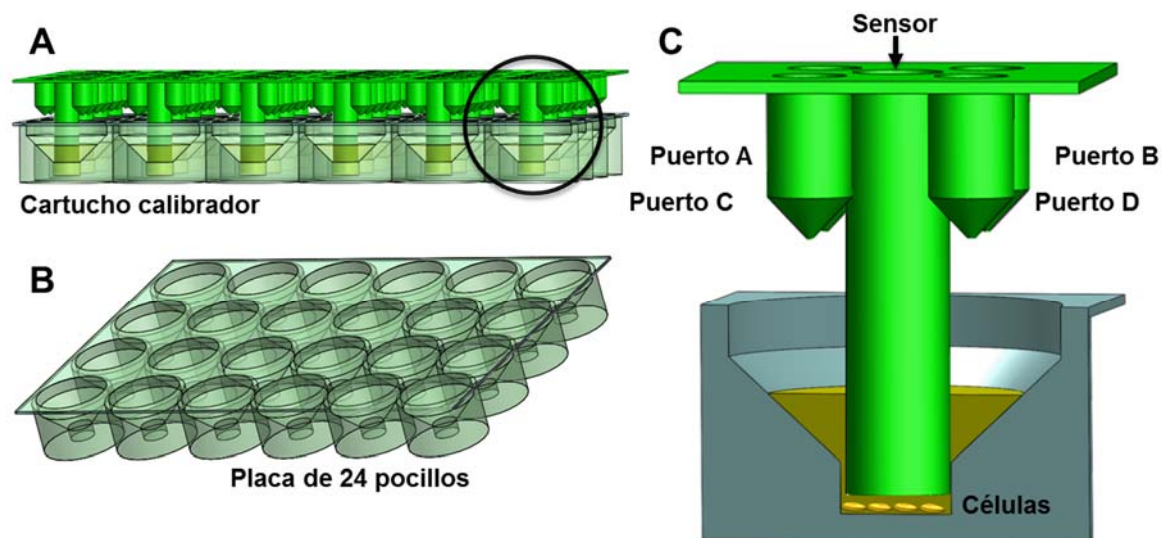


Figura I- 27 Esquema en 3D del funcionamiento del XF^e24 Seahorse Bioscience.

La figura proporciona una visión esquematizada en 3D, del funcionamiento del XF^e24 Seahorse Bioscience. A) Cartucho calibrador: el cual está compuesto la parte superior que contiene los puertos y los sensores, y una placa inferior que se utiliza para hidratar los sensores. B) Placa de 24 pocillos, cuya área de cultivo real es de 0.5 cm² (al igual que una placa de 96 pozos convencional). C) Imagen ampliada del cartucho calibrador el cual censa los cambios de consumo de oxígeno y acidificación extracelular generados por la línea celular que ha sido expuesta a las diferentes inyecciones de los puertos.

Basado en: XF^e24 Seahorse Bioscience, part of Agilent Technology.

Posteriormente la inyección con el FCCP desacopla el consumo de oxígeno de la producción de ATP, debido a la formación de un poro de translocación de los protones (protonóforo) del espacio intermembranal, generando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Como resultado, se pierde la inhibición del flujo de electrones a través de la CTE, y el oxígeno es consumido en su máxima capacidad por el complejo IV. El OCR estimulado por el FCCP puede ser usado para calcular la capacidad de reserva respiratoria, definida como la diferencia entre la máxima respiración y la respiración basal. Esta capacidad de reserva es la medida de la habilidad de la célula para responder a incrementos en la demanda energética. La tercera inyección es una mezcla de rotenona, un inhibidor del complejo I, y antimicina, un inhibidor del complejo III. Con esta última inyección se bloquea la respiración mitocondrial y permite el cálculo de la respiración no mitocondrial que es liderada por procesos externos a la mitocondria.

Se utilizó el XF Cell Glycolysis Stress Test Kit, para evaluar la función glicolítica en las células, por la medición directa del ECAR. Este kit provee un método estándar para evaluar parámetros claves en el flujo glicolítico tales como: glicólisis, capacidad glicolítica, reserva glicolítica, así como, acidificación no glicolítica. En la Figura I- 29, se pueden observar los parámetros a evaluar de acuerdo con el tipo de compuesto utilizado.

En el ensayo, las células son acondicionadas a un medio sin piruvato ni glucosa, luego las células son expuestas con la primera inyección, a concentraciones saturadas de glucosa. Las células catabolizan esta glucosa a través de la vía glicolítica a piruvato, produciendo ATP, NADH, agua y protones. La extrusión de protones al medio causa un rápido incremento de la ECAR. Esta respuesta inducida por la glucosa se reporta como la tasa de glicólisis bajo condiciones basales. La segunda inyección es oligomicina, la cual, es un inhibidor de la ATP sintasa. La oligomicina inhibe la producción de ATP mitocondrial, y cambia la principal fuente de energía a la glicólisis, con el subsecuente incremento en el ECAR, revelando la máxima capacidad glicolítica celular. La inyección final contiene 2DG (2-deoxi-glucosa), un análogo de la glucosa, que inhibe la glicólisis a través de la unión competitiva a la glucosa-hexokinasa, primera enzima en la vía glicolítica. La disminución significativa del ECAR confirma que el ECAR producido durante el experimento es dado a la glicólisis. La diferencia entre la capacidad glicolítica y la tasa de glicólisis se define como la reserva glicolítica. El ECAR previo a la inyección de glucosa, se referencia como el resultado de la acidificación no glicolítica, causado por procesos celulares diferentes a la glicólisis.

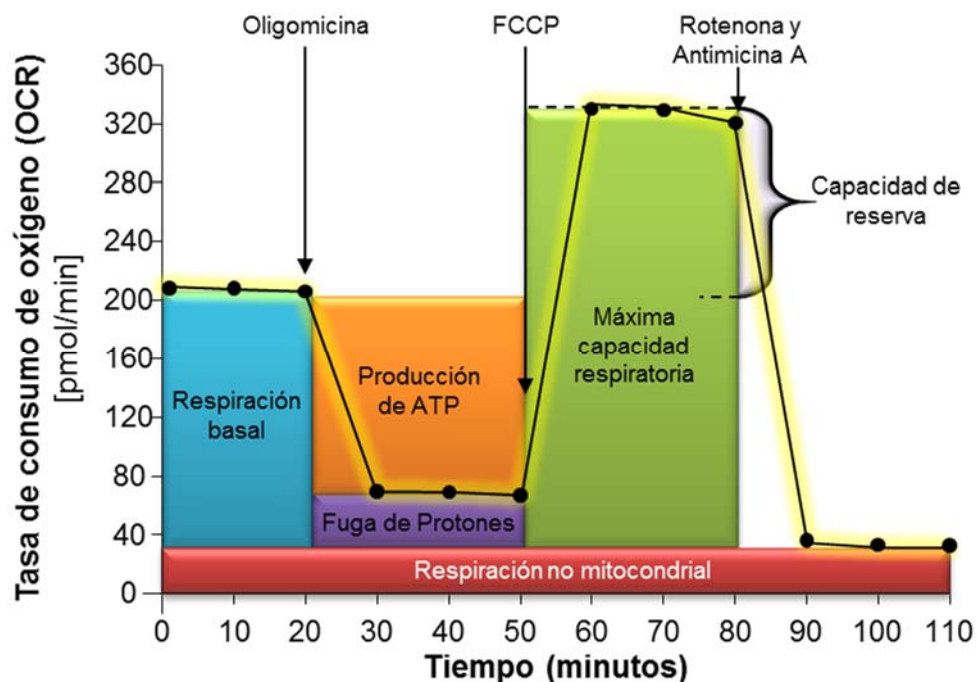


Figura I- 28 Parámetros de la función mitocondrial evaluados por medio del ensayo XF Cell Mito Stress Test Kit (Seahorse Bioscience).

Se observa en la figura un ejemplo ilustrativo del perfil de consumo de oxígeno de una línea celular tras la inyección de tres puertos (flechas verticales): Oligomicina A, FCCP y Rotenona+Antimicina A.

Fuente: Tomado y adaptado de Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol.* 2014;547:309-54.

Para la evaluación de las principales fuentes de carbono, se utilizó el XF Mito Fuel Flex Test Kit Figura I- 30. La mayor cantidad de energía producida por las células es derivada a partir de tres combustibles o fuentes de carbono: glucosa, glutamina y ácidos grasos. La dependencia y flexibilidad para usar cada una de estas fuentes de carbono, se puede evaluar al medir la disminución en la oxidación de cada fuente, lo que se determina por la disminución en la tasa de consumo de oxígeno bajo la adición de uno o más inhibidores Figura I- 30A.

Como podemos observar en la Figura I- 30A, el kit se compone de tres inhibidores: UK5099, BPTES y Etomoxir. El UK5099 es un inhibidor de la vía de oxidación de la glucosa, dado que bloquea el transportador del piruvato a la mitocondria. El BPTES, es un inhibidor de la oxidación de la glutamina, dado que actúa como inhibidor alostérico de la glutaminasa 1, impidiendo que la glutamina se convierta en glutamato, el cual a su vez es convertido a alfa-keto-glutarato, y de esta forma pueda ingresar al ciclo de ácido tricarboxílico. El Etomoxir, es un inhibidor de la vía de oxidación de los ácidos grasos de larga cadena, dado que inhibe la palmitoil-carnitina transferasa 1A, la cual es clave para la translocación de los ácidos grasos de larga cadena desde el citosol a la mitocondria para la beta-oxidación.

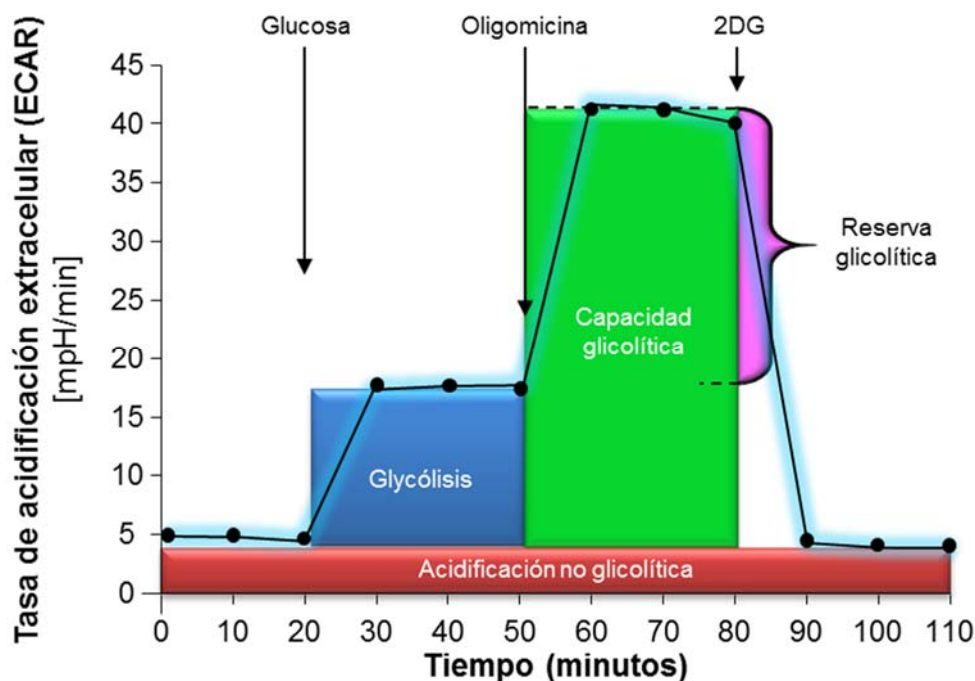


Figura I- 29 Parámetros de la glicólisis evaluados por medio del ensayo XF Cell Glycolysis Stress Test Kit (Seahorse Bioscience).

Se observa en la figura un ejemplo ilustrativo del perfil de acidificación extracelular de una línea celular tras la inyección de tres puertos (flechas verticales): Glucosa, Oligomicina A y 2DG.

Fuente: Tomado y adaptado de Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol.* 2014;547:309-54.

Este kit permite evaluar tres parámetros claves: dependencia, capacidad y flexibilidad. Inicialmente al inhibir una sola vía, se puede evaluar que tan dependiente, es la célula para mantener la OCR de la fuente de carbono inhibida Figura I- 30 XF Mito Fuel Flex Test Kit XF.B. La dependencia nos puede indicar que las células son incapaces de cubrir la demanda energética con el uso de las otras vías no inhibidas. Para evaluar la capacidad de una vía (A), se inhiben dos de las tres vías (B y C), y se determina que capacidad tiene la vía no inhibida para soportar toda la demanda energética, es decir, el mantenimiento del OCR Figura I- 30C. La flexibilidad por otra parte es la diferencia entre la capacidad y la dependencia, que se traduce en la habilidad de las células de aumentar la oxidación de una fuente de carbono, en orden de compensar la inhibición de las vías alternativas, y se calcula a partir de los valores obtenidos de la capacidad y la dependencia Figura I- 30D.

Las líneas celulares de MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se sembraron a una densidad de 50.000 células por pozo en placa especial (seahorse bioscience) de 24 pocillos con una superficie total de cultivo correspondiente a placas de cultivo de 96 pozos (0.5 cm²). La línea celular MCF7 se sembró a una densidad celular de 30.000 células por pozo. Para asegurar la correcta distribución de las células y el tratamiento con Mito-SG1 se realizó un protocolo especial de plaqueo en dos pasos como se describe en la Figura I- 31. El volumen de siembra para todas las líneas celulares fue de 100 µl, y el volumen final del pocillo fue de 250 µl.

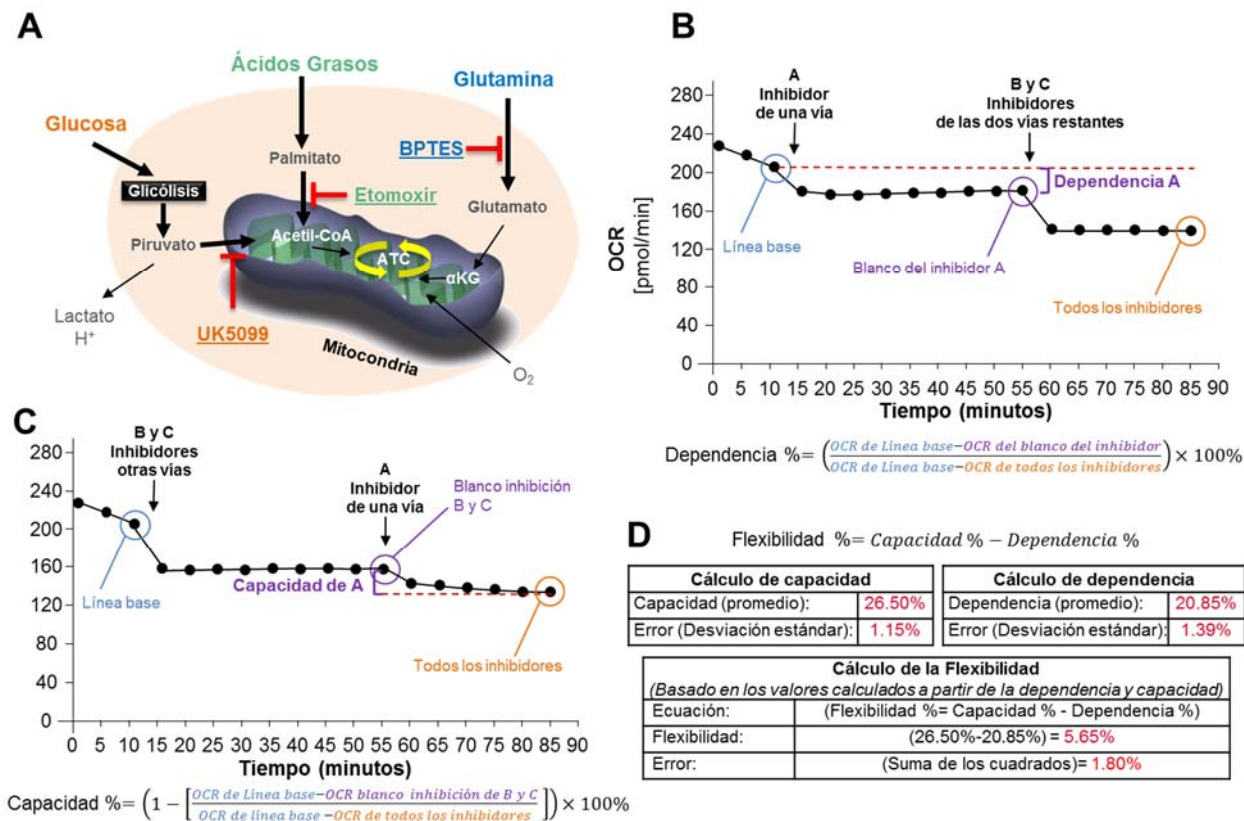


Figura I- 30 XF Mito Fuel Flex Test Kit XF.

El kit Mito Fuel permite la evaluación de las tres principales fuentes de carbono para la respiración celular, glucosa, glutamina y ácidos grasos. A) Se puede observar el principio del kit, el cual se basa en el uso de inhibidores específicos para las tres principales fuentes de carbono del ciclo de ácido tricarboxílico (ATC), y por ende, de la respiración celular. En la vía de la glucosa, la glucosa es convertida en piruvato por medio de la glicólisis. El piruvato es transportado del citosol a la mitocondria por un transportador mitocondrial de piruvato (TMP), en donde es convertido a Acetil-CoA. Una menor proporción del piruvato es convertido a lactato, responsable de la tasa de acidificación extracelular. El UK5099, es un inhibidor del TMP, impidiendo de esta forma que la glucosa sea completamente oxidada. En la vía de ácidos grasos de larga cadena, la beta-oxidación de los mismos es inhibida al impedir la traslocación del citosol a la mitocondrial, con el uso del Etomoxir, el cual es un inhibidor de la palmitoil-carnitina-translocasa. De esta forma el palmitato no puede ser oxidado disminuyendo la contribución de la CoA al ATC. En la vía de la glutamina, el uso del inhibidor alostérico de la glutaminasa, el BPTES, impide la conversión de la glutamina a glutamato, lo cual bloquea la contribución de alfa-keto-glutarato (αKG) al ATC. B) La dependencia es determinada por la inyección del inhibidor de la vía a evaluar (A), seguido posteriormente, previo la estabilización del OCR, de la inyección de los inhibidores B y C (de las vías no evaluadas). La disminución del OCR, debida a la inhibición de la vía, y determinada al calcular la línea base del OCR, y el OCR obtenido al utilizar todos los inhibidores, se expresa en porcentaje de OCR que depende de la vía evaluada. C) La capacidad es determinada, como el porcentaje de OCR que se mantiene cuando la vía a evaluar es la única que no se ha inhibido. Por ende, para su determinación, en la primera inyección se utilizan los inhibidores B y C, y en la segunda inyección el inhibidor de la vía a la que se desea evaluar la capacidad. D) La flexibilidad es calculada a partir de los valores obtenidos de dependencia y capacidad. Se puede observar en la figura un ejemplo del cálculo de flexibilidad.

Fuente: Tomado y basado en Seahorse XF Mito Fuel Flex Test Kit User Guide. Seahorse Bioscience a part of Agilent Technologies.

Las líneas celulares se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. El día del experimento el medio se sustituyó por el volumen apropiado de medio de ensayo sin tamponar. Las células se dejaron en incubación a 37°C sin CO₂ durante un tiempo no inferior a 1 hora con objeto de que, tanto la temperatura como el pH, alcanzasen el equilibrio. Los datos de consumo de oxígeno se expresaron como picomoles de oxígeno consumido por minuto y la acidificación extracelular en unidades de mili-pH por minuto. Los experimentos fueron normalizados por medio de la cuantificación de proteínas. Las células fueron lisadas con 20 µl de búfer de lisis (Tris 10 mM, 0.1% de Triton X100 en H₂O tipo I) y las proteínas fueron cuantificadas por el método Bradford y una curva de referencia con concentraciones conocidas de BSA.

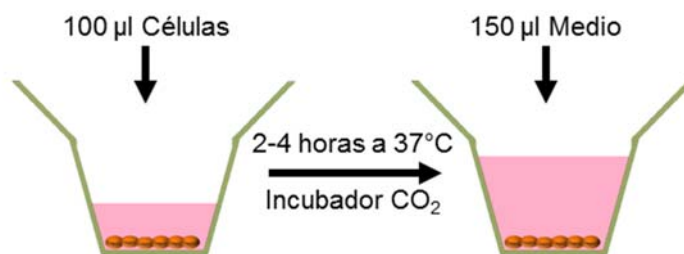


Figura I- 31 Protocolo de siembra.

Para asegurar la óptima distribución de las células se realiza un protocolo de siembra en dos pasos. En primer lugar, se plaquea la suspensión celular en un volumen de 100 µl, los cuales deben ser dispensados en una esquina del pozo. Se procede a incubar a 37°C y 5% CO₂ de 2 a 4 horas, dependiendo del tipo de línea celular. La incubación permite la correcta adhesión de las células a la placa. Finalmente se añaden 150 µl de medio de cultivo con la concentración adecuada del compuesto a analizar que permita obtener un volumen de 250 µl, donde la concentración final del compuesto sea la que se desea evaluar.

1.5.4 Desarrollo Objetivo 4

Valorar los efectos sinérgicos o aditivos, de Mito-SG1 con doxorrubicina y 2DG en líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468).

Se evaluó con este objetivo la potencialidad de efectos sinérgicos entre Mito-SG1 y el compuesto actualmente utilizado para el tratamiento de cáncer de seno, doxorrubicina. Las terapias actuales no son selectivas, dado que afectan de igual manera a células tumorales como células normales, por ende, era importante evaluar si al utilizar los mito-compuestos, se lograba un efecto similar a la terapia actualmente utilizada, pero con una menor concentración de los compuestos no selectivos, minimizando de esta forma, los efectos adversos de la terapia convencional. Adicionalmente debido a la preferencia glicolítica de TNBC, se evalúan los efectos de Mito-SG1 con 2-DG, un potente inhibidor de la glicólisis.

Para el cumplimiento de este objetivo, se realizó cultivo celular según lo expuesto en el objetivo 1, y por medio de la técnica de MTT se evaluaron las dosis IC₅₀ de doxorrubicina y 2DG. La sinergia de los mito-compuestos fue evaluada tratando las células cancerosas con concentraciones equimolares de doxorrubicina. Para el caso de 2-DG, debido a que las concentraciones efectivas son muy altas, no se

trabaja con concentraciones equimolares, por lo que se evalúa la capacidad de potenciar el efecto de 2-DG con diferentes concentraciones de Mito-SG1. Después del tratamiento, la viabilidad celular fue medida por el ensayo MTT y se calculó las curva de dosis respuesta y la sinergia usando el software Calcsyn (Dose-Effect Analyzer for Single and Multiple Drugs, Biosoft) (156, 157), siguiendo el método de Chou-Talalay (158).

En resumen, el método de Chou-Talalay para la evaluación de combinación de drogas, está basado en la ecuación de efecto-medio derivada del principio de ley de acción de masas. Este principio es considerado como una teoría unificada, que provee un link común entre una entidad singular y múltiples entidades. Esta ecuación general incorpora las ecuaciones de área de bioquímica y biofísica de Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch y Scatchard. El índice de combinación resultante (CI, por sus siglas en inglés Combination Index) del teorema de Chou-Talalay ofrece una definición cuantitativa para efecto aditivo (CI=1), sinergismo (CI<1) y antagonismo (CI>1) en combinaciones de drogas. El método del índice de combinación se puede resumir en la ecuación (1.3).

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} \quad (1.3)$$

Donde (D)₁ y (D)₂ corresponden a las concentraciones de droga 1 y droga 2, respectivamente, usados en combinación para obtener un x% de efecto de la droga sobre un sistema, (Dx)₁ y (Dx)₂ corresponden a las concentraciones de las drogas individuales para obtener el mismo efecto. Si la suma de estas dos fracciones es igual a 1, indica un efecto aditivo. Si el valor de CI es menor que 1, indica que el efecto es sinérgico, y si el valor de CI es mayor que 1, indica un efecto antagónico. De acuerdo al rango de CI, el efecto sinérgico por ejemplo, se puede definir como: leve (CI: 0.85-0.90), moderado (0.7-0.85), sinergismo (CI: 0.3-0.7), fuerte (CI:0.1-0.3), muy fuerte (CI<0.1) (158).

1.5.5 Análisis de los datos

Los análisis estadísticos se realizarán utilizando GraphPad prism 5 y Microsoft Excel 2016. Todos los datos serán presentados como la media ± error estándar de la media (ESM). La comparación de grupos fue analizada utilizando la prueba t de Student. Se determinó un valor de p≤0.05 como estadísticamente significativo.

1.5.6 Consideraciones éticas

Esta investigación no incluyó estudios en humanos ni animales por lo que su desarrollo no implicó ningún tipo de riesgo y por ende no le aplicaron las consideraciones de la Resolución 8430 de 1993. En el estudio no se hicieron

modificaciones genéticas, ni se infectaron las células con material de riesgo biológico, ni se generaron riesgos de tipo biológico. Las células fueron compradas a proveedores autorizados. El proyecto es clasificado como de bajo riesgo.

Para la realización de este proyecto se obtuvo aprobación del comité de ética de la Universidad del Valle.

RESULTADOS

2.1 OBJETIVO ESPECIFICO 1

Evaluar los efectos citotóxicos y selectividad de los agentes Mito-SG1 y Mito-Met en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7 y T47D) así como, en células de epitelio mamario sano (MCF10A).

Para el desarrollo del primer objetivo fue necesario determinar en primera instancia la citotoxicidad de los compuestos en las líneas celulares no-TNBC y TNBC, por medio de la técnica de MTT. Los resultados permitirían elegir cuál de los dos compuestos tenía un mayor potencial como tratamiento para el cáncer de seno y enfocar la investigación y los recursos de la manera más eficiente. Los efectos citotóxicos fueron evaluados por la capacidad que tenían los compuestos para generar muerte celular, inhibir la proliferación y el crecimiento celular, la habilidad de formación de colonias y la migración celular.

Los mitocompuestos fueron sintetizados y caracterizados por los doctores Micael J. Hardy y Olivier Ouari del laboratorio SREP de la Universités Aix-Marseille, Francia.

En la Figura II- 1 se observa la estructura química de los mitocompuestos evaluados, Mito-Met y Mito-SG1 (izquierda de la figura), y sus correspondientes compuestos parentales metformina y SG1 (derecha de la figura).

2.1.1 El compuesto Mito-SG1 es más citotóxico que Mito-Met en no-TNBC y TNBC.

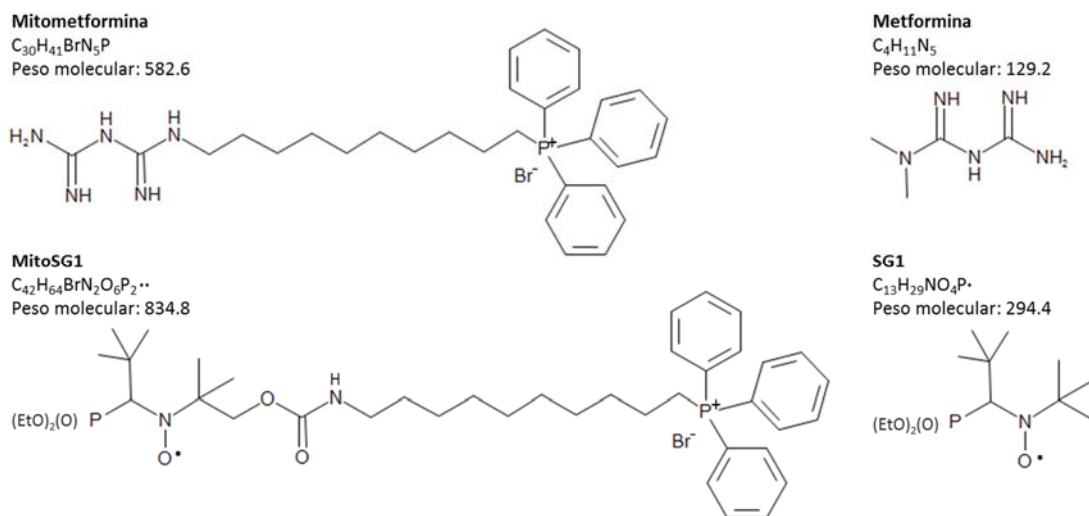


Figura II- 1 Estructura química de Mito-Met y Mito-SG1, con sus correspondientes compuestos parentales metformina y SG1.

A pesar de los buenos resultados publicados de Mito-Met en cáncer de páncreas (147) en donde se observó que la Mito-Met era 1000 veces más potente que la metformina para lograr la inhibición de la proliferación celular de células MiaPaCa-2, no se obtuvieron los mismos resultados de Mito-Met en las líneas celulares no-TNBC (MCF7 y T47D) como en las TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) utilizando el ensayo MTT. Las líneas celulares fueron cultivadas por 24 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente el medio de cultivo fue reemplazado por Mito-Met, Mito-SG1 y sus compuestos parentales metformina y SG1 respectivamente y TPP, en concentraciones de 0.03 a 30 µM en medio de cultivo. Dado que las soluciones stock de Mito-Met y Mito-SG1 fueron preparadas en DMSO, se verificó que la máxima concentración utilizada en los tratamientos presentara una concentración menor al 0.1% de DMSO con el objetivo de no afectar la viabilidad celular por el vehículo. Pasadas 24 y 48 horas de tratamiento, el medio fue reemplazado con tetrazolio disuelto en medio de cultivo a una concentración de 0.5 mg.ml⁻¹ e incubadas por 1 hora a 37°C. Los cristales de formazán fueron disueltos en DMSO por 20 minutos en agitación constante y se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Como podemos observar en la Figura II- 2, se encontró que Mito-SG1, más no Mito-Met en concentraciones micromolares, presenta un efecto dosis-dependiente sobre la viabilidad celular a las 48 horas de tratamiento.

Las líneas celulares de MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (Figura II- 2A), correspondientes a TNBC, así como T47D correspondiente a no-TNBC, requieren una mayor concentración de Mito-Met para lograr una afectación en la viabilidad celular en comparación con las líneas celulares MCF7 correspondientes a no-TNBC (Figura II- 2B). El menor IC₅₀ de Mito-Met obtenido fue en la línea celular MCF7 con un valor de 114.6 µM, a diferencia con los resultados reportados en cáncer de páncreas donde se obtiene un IC₅₀ de 1.1 µM en la línea celular MiaPaCa2 (147).

En el caso del compuesto Mito-SG1, se observó que tanto en líneas celulares de TNBC Figura II- 2C, como en no-TNBC Figura II- 2D, a concentraciones menores a 3 µM, se obtiene una disminución dosis dependiente de la viabilidad celular con 48 horas de tratamiento. Con el fin de determinar si el efecto obtenido se debía a las propiedades del mito-compuesto y no a efectos individuales de los compuestos parentales, se procedió a evaluar el efecto sobre la viabilidad celular de los compuestos metformina, SG1 y del catión de TPP por el ensayo de MTT. Como podemos observar Figura II- 3, los efectos de los mito-compuestos no se deben a efectos individuales de los compuestos parentales, sino a la interacción específica del catión de TPP, con el alquilo de 10 carbonos y el nitróxido SG1.

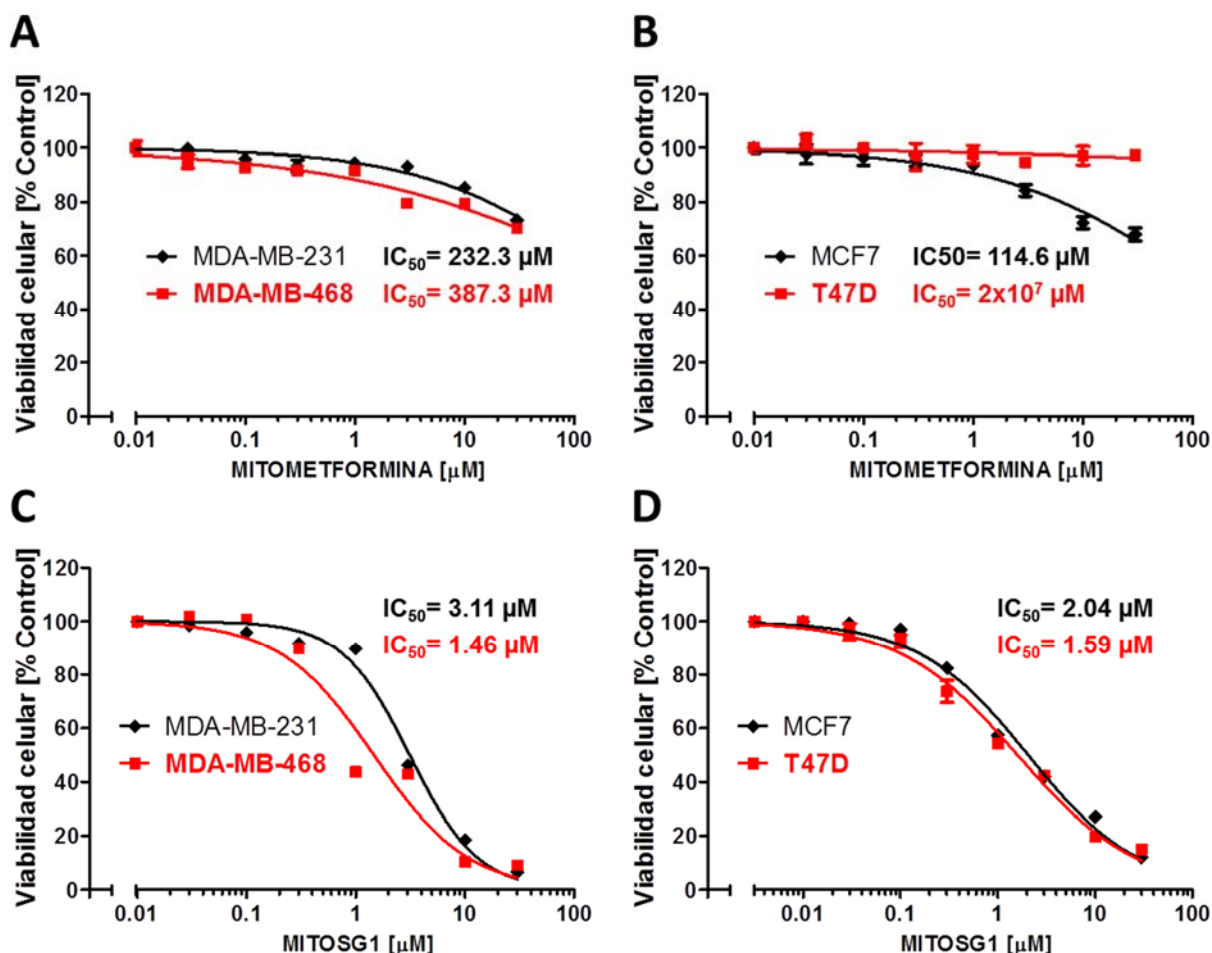


Figura II- 2 Efecto de Mito-Met y Mito-SG1 sobre la viabilidad celular en cáncer de seno.

Porcentajes de la viabilidad celular a las 48 horas de tratamiento con Mito-Met y Mito-SG1 evaluados por el ensayo de MTT en las líneas celulares no-TNBC (MCF7 y T47D) y TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468). A) Mito-Met en TNBC, B) Mito-Met en no-TNBC, C) MitoSG1 en TNBC y D) Mito-SG1 en no-TNBC. Los datos son presentados como la media $\pm$ ESM, n=6.

De acuerdo con las concentraciones de IC_{50} obtenidas, se elige el mitocompuesto Mito-SG1 por su alta citotoxicidad a dosis micromolares ($IC_{50}=1.46$ a $3.11 \mu M$) en comparación con Mito-Met ($IC_{50}=114.6$ a $2 \times 10^7 \mu M$), para continuar el presente proyecto dado que presenta una mayor posibilidad de efectividad a una menor dosis de tratamiento.

Dado que el ensayo de MTT no permite establecer si la disminución de la viabilidad celular es debida a muerte celular y/o por inhibición de la proliferación celular, se

procedió a realizar el ensayo de Sytox green® y el ensayo de inhibición de la proliferación celular a 72 horas.

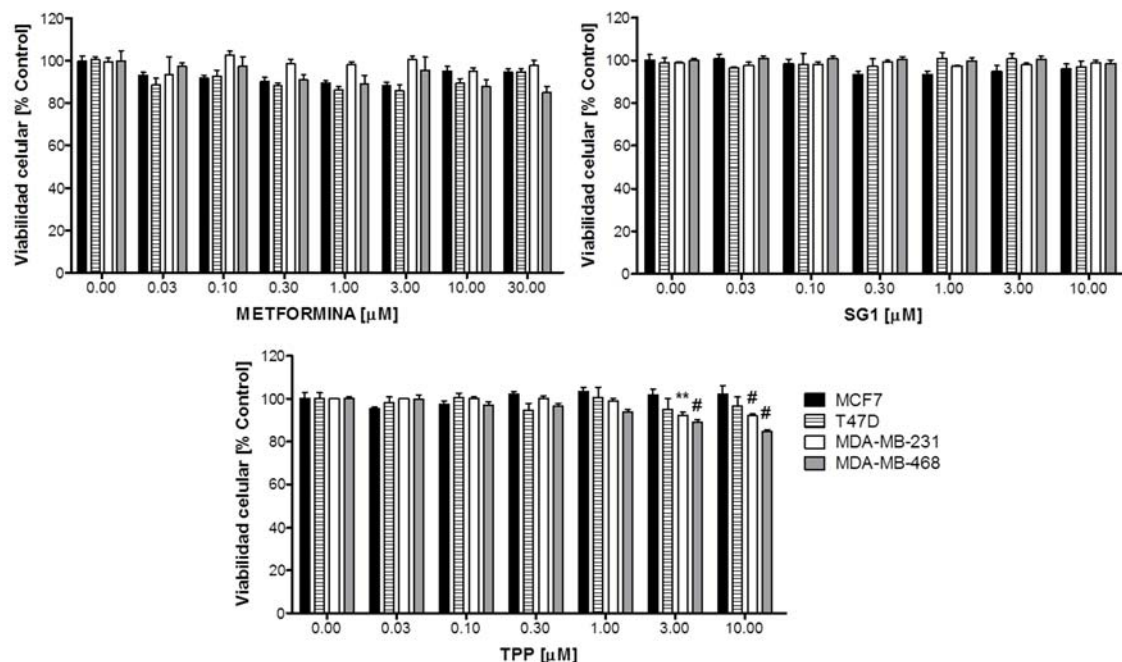


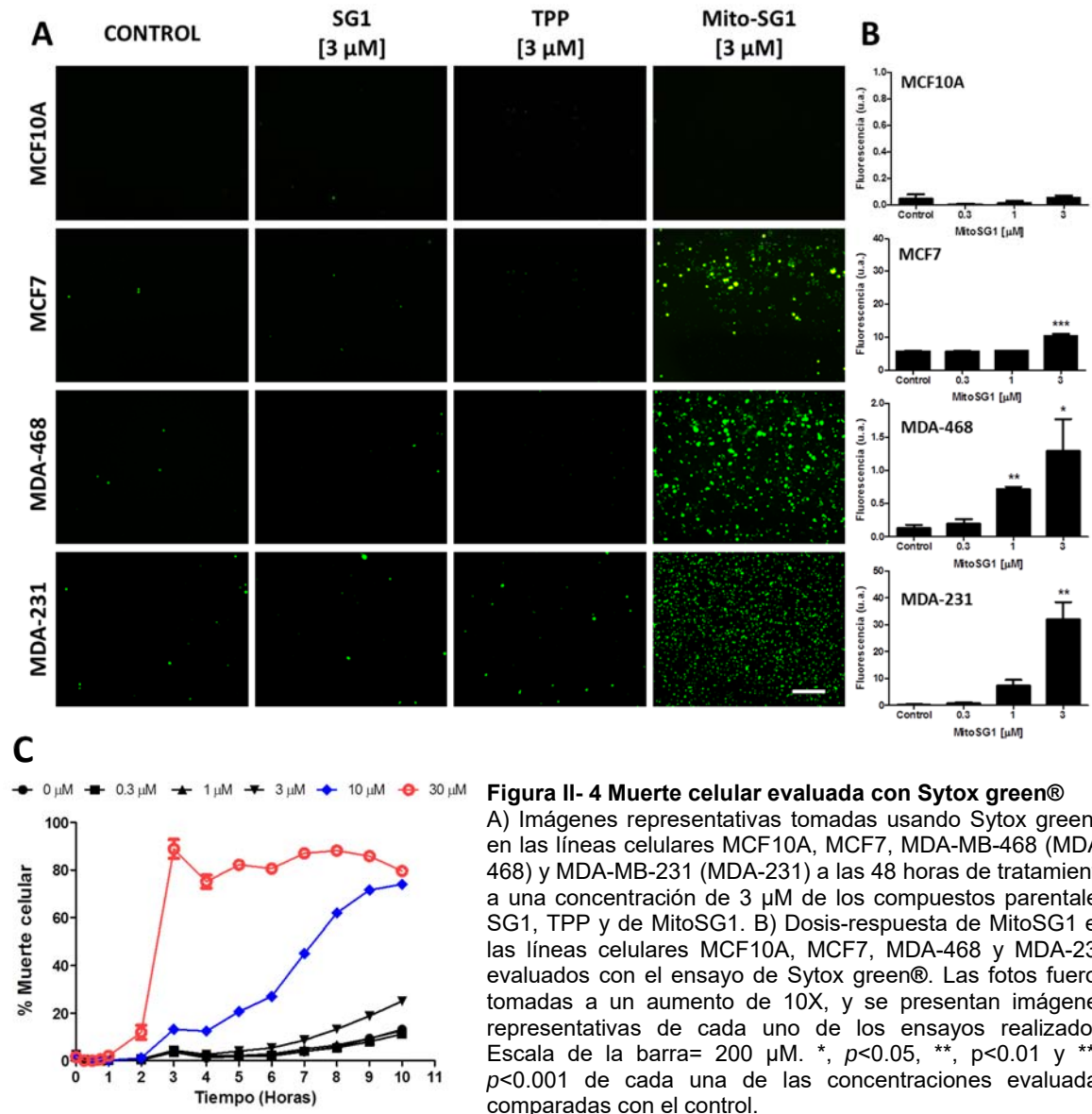
Figura II- 3 Evaluación de los compuestos parentales sobre la viabilidad celular en cáncer de seno. Porcentajes de la viabilidad celular a las 48 horas de tratamiento con los compuestos parentales metformina, SG1 y TPP evaluados por el ensayo de MTT en las líneas celulares no-TNBC (MCF7 y T47D), y TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468). Los datos son presentados como la media $\pm$ ESM, $n=6$. **, $p<0.01$ y #, $p<0.001$.

2.1.2 Mito-SG1 genera selectivamente muerte celular en las líneas celulares no-TNBC y TNBC.

Sytox green® es una cianina que no es permeable a células viables. En células con compromiso de la membrana celular, característica de las células muertas, Sytox green® ingresa a la célula y debido a su alta afinidad por el ADN, se intercala y emite una fluorescencia con un espectro de emisión y excitación de 523/504 nm respectivamente. El ensayo se realizó en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB468, MCF7, así como en la línea celular no transformada MCF10A.

Como se puede observar en la Figura II- 4A, en las diferentes líneas celulares evaluadas sólo el compuesto Mito-SG1 a una concentración de 3 μM genera muerte celular, excepto en la línea sana MCF10A. Los compuestos parentales a la misma concentración utilizada con Mito-SG1, no generan muerte celular. En la Figura II- 4B, se cuantifica la fluorescencia para determinar la dosis-respuesta evaluada con SYTOX Green® al tratamiento con Mito-SG1 por 48 horas. Se observa que en

MCF7 a partir de 3 μM existe diferencia significativa con relación al control. MDA-MB-468 debido a que presentó un IC_{50} menor con relación a MCF7 y MDA-MB-231, presenta muerte celular desde una concentración menor. Se puede resaltar que las líneas celulares TNBC presentaron una mayor muerte celular que MCF7 a la



concentración de 3 μM . Los anteriores resultados nos indican que Mito-SG1, más no sus compuestos parentales SG1 y TPP, inducen muerte celular en las líneas celulares no-TNBC y TNBC evaluadas, más no en la línea celular no transformada MCF10A.

Se procedió a evaluar en la línea celular MDA-MB-231 como era el comportamiento cinético de la muerte celular en las primeras horas de tratamiento, por medio de la cuantificación periódica de la muerte celular usando SYTOX Green® y un lector de placas.

Este experimento fue estandarizado basados en la publicación de Grootjans (159), donde, dada las características de SYTOX Green®, se realiza un pre-tratamiento con el fluorocromo, y a medida que el tratamiento con el compuesto genera muerte celular, la fluorescencia del compuesto va aumentando. Este experimento nos permite identificar que, a las dos horas de inicio del tratamiento, el compuesto ingresa a la célula y genera lesión de la membrana citoplasmática permitiendo el ingreso del fluorocromo y por ende el aumento de la fluorescencia.

2.1.3 Mito-SG1 inhibe la proliferación, el crecimiento celular y la migración en TNBC y no-TNBC

Los efectos antiproliferativos de Mito-SG1 fueron evaluados mediante la observación manual del número de divisiones de las líneas celulares utilizando la coloración con azul de tripán. El azul de tripán, es un coloide azoico que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana de forma que aquellas que adquieren un color azul son consideradas células no viables. El crecimiento celular fue determinado por el ensayo de formación de colonias, el cual se basa en la habilidad de una célula para crecer y formar una colonia. La colonia es definida como un grupo formado por 50 células o más. Este ensayo es el método de elección para determinar la muerte por inhibición de la reproducción celular después de un tratamiento determinado.

Las líneas celulares MCF7 (en representación de las líneas celulares no TNBC) y MDA-MB-231 (en representación de las líneas celulares TNBC) fueron observadas a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento con Mito-SG1 y su compuesto parental SG1 a diferentes concentraciones, para determinar el efecto sobre la proliferación celular y determinar la concentración ideal que genera inhibición de la proliferación celular. En la Figura II- 5 se graficaron las tres más bajas concentraciones de Mito-SG1 que lograron significativamente una reducción de la proliferación celular, tanto en la línea celular MCF7 (no TNBC), como en MDA-MB-231 (TNBC). Se observa que a 2 μ M del compuesto, se logra una fuerte inhibición del crecimiento desde las primeras 24 horas evaluadas, logrando evitar el aumento del número de células que fueron sembradas, hasta las 72 horas de evaluación. El compuesto parental SG1, en concentraciones equimolares a las trabajadas con Mito-SG1, no genera afectación en la proliferación celular de las líneas celulares evaluadas Figura II- 5.

El ensayo de proliferación celular tiene la desventaja de que no permite evaluar la capacidad de las células de dividirse, dado que solo identifica la célula viva de la muerta, por la conservación de la integridad de la membrana, y, por ende, no

inclusión del colorante. Adicionalmente algunos compuestos tienen efecto tardío en la proliferación celular, por esta razón fue necesario realizar el ensayo de formación de colonias, dado que este ensayo permite evaluar la habilidad de una sola célula de dividirse y formar una colonia en un tiempo mayor de seguimiento. El ensayo de formación de colonias ha sido reportado desde 1956 (160), siendo considerado el método de elección para determinar la afectación de la reproducción celular posterior a un tratamiento con radiaciones ionizantes, así como, para determinar la efectividad de agentes citotóxicos (151).

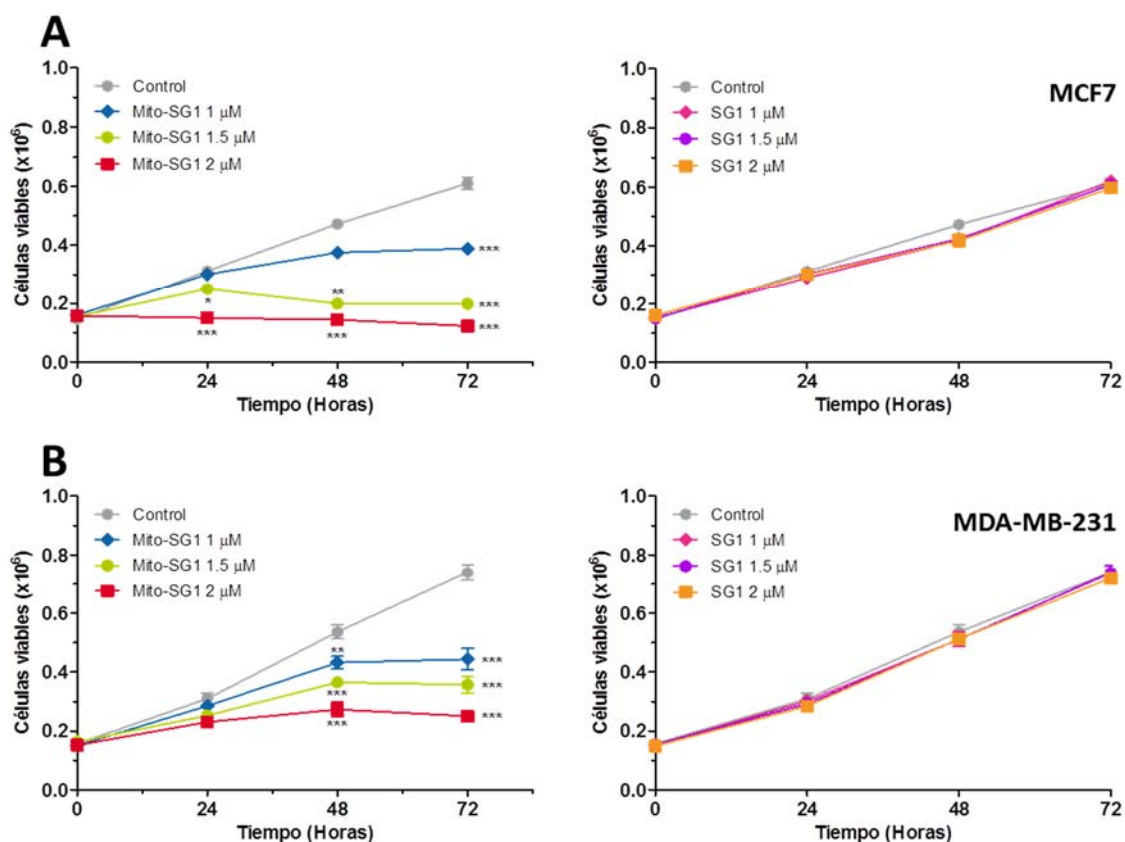


Figura II- 5 Efectos del tratamiento con MitoSG1 y su compuesto parental SG1, sobre la proliferación celular.

La inhibición de la proliferación celular fue evaluada mediante la observación manual del número de divisiones de las líneas celulares utilizando la coloración con azul de tripán de las líneas celulares de A) MCF7 y B) MDA-MB-231, después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con MitoSG1 (izquierda) y SG1 (derecha). Se representa el promedio de tres experimentos independientes cada uno con $n=3$. La diferencia significativa fue calculada aplicando el test de Student, comparando el conteo celular de cada concentración contra el conteo celular del control correspondiente en el mismo periodo de tiempo, donde, *, $p<0.05$, **, $p<0.01$ y ***, $p<0.001$.

Las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7 fueron sembradas a una densidad celular de 300 células en placa de 6 pozos, a las 24 horas se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 y SG1 que oscilaron entre 0.1 μM y 10 μM diluidas en medio de cultivo. A las 24 horas del tratamiento las placas fueron lavadas con PBS y se adicionó medio completo. Se realizó seguimiento visual de 1 a 3

semanas, hasta poder detectar la aparición de colonias. Las colonias se consideraron como agrupaciones de más de 50 células. Las células fueron fijadas y coloreadas con cristal violeta al 0.5% diluido en glutaraldehído al 6%.

En la Figura II- 6 se observa que Mito-SG1, más no el compuesto SG1 afecta la habilidad de formación de colonias tanto de las líneas celulares de TNBC, como las células no-TNBC. Los IC_{50} calculados a partir de la cuantificación de la fracción superviviente, son correspondientes a los calculados por el ensayo de MTT. Las líneas celulares TNBC presentan una IC_{50} menor del compuesto Mito-SG1, en comparación con la línea celular no TNBC MCF7.

Por otra parte, podemos inferir que los efectos presentados en los ensayos realizados son atribuibles específicamente al compuesto Mito-SG1 y no a sus compuestos parentales. Lo que nos confirma que el efecto de Mito-SG1 no se debe a su compuesto parental, sino a sus propiedades como mito-compuesto y por ende a la acumulación preferencial en la mitocondria.

Para la evaluación de la migración celular se utilizó el ensayo de cierre de herida, más conocido como "*wound healing assay*". Este ensayo se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células que previamente se le ha realizado una brecha o "herida". Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la herida. El ensayo de cierre de herida abierta, es de bajo costo, fácil de realizar y es considerado un método ampliamente aceptado para la medición de la migración celular *in vitro* (161).

Para la realización del ensayo, fue necesario determinar el tiempo necesario para el cierre de la herida por cada línea celular, y las concentraciones de Mito-SG1 que lograran efectos significativos sobre la migración. Se eligieron las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7, para el ensayo, debido a que presentan una mayor velocidad de migración que la línea celular MDA-MB-468, siendo representativas de TNBC y no-TNBC. Para el análisis de las imágenes accedimos al software libre TScratch (CSElab, Zurich, Switzerland), el cual permite calcular el porcentaje del área abierta de la imagen (tiempo 0), así como, permite determinar el porcentaje de área de la herida abierta en un tiempo determinado (lo que corresponde al porcentaje del área abierta de la imagen, que no ha sido ocupada por células en un tiempo determinado).

Como podemos observar en la Figura II- 7 Evaluación de los efectos de Mito-SG1 sobre la migración celular *in vitro* en MDA-MB-231 y MCF7. Figura II- 7A, en la línea celular de TNBC MDA-MB-231 Mito-SG1 a una concentración de 1.5 μM inhibe significativamente la migración celular a las 16 horas de seguimiento. A tan solo 16 horas de seguimiento y a una concentración inferior a la IC_{50} (3.42 μM), se logra que

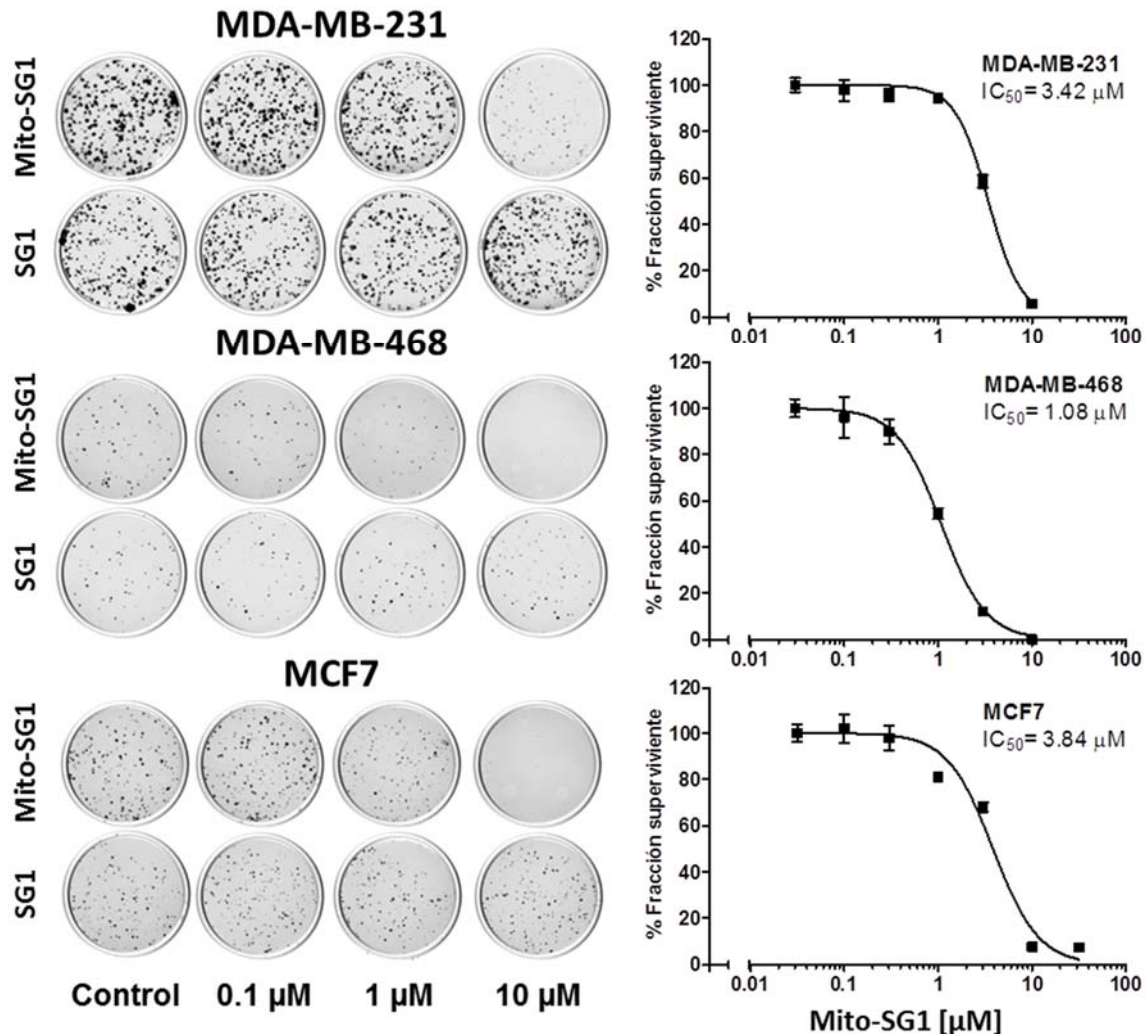


Figura II- 6 Mito-SG1 inhibe la formación de colonias en las líneas celulares TNBC y no-TNBC.

La inhibición del crecimiento celular fue evaluada mediante el ensayo de formación de colonias. Derecha: imágenes representativas de cada línea celular evaluada. Izquierda, cuantificación y cálculo del IC₅₀ de Mito-SG1 correspondiente a las imágenes a la derecha del panel. La densidad celular inicial fue de 300 células por pozo para cultivo en placas de 6 pozos. Las células fueron incubadas a 37°C, a una concentración de CO₂ del 5% por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron diferentes concentraciones de MitoSG1 y SG1 que oscilaron entre 0.1 μM y 10 μM diluidas en medio de cultivo. Pasadas 1 a 3 semanas de acuerdo con la velocidad de la línea celular para formar colonias visibles, se procedió a fijar con glutaraldehído 6% v/v y a colorear con cristal violeta al 0.5% p/v. Los parámetros de adquisición de las imágenes fueron: tiempo de exposición 1 sg, configuración de ganancia 1, luz LED epi, color blanco, filtro 5. Cada ensayo se realizó con n=3.

las células sólo hayan cerrado un 32% de la herida realizada, mientras que el control al mismo tiempo ya ha permitido la migración de las células para cubrir el 61% de la herida realizada al iniciar el experimento. A las 24 horas de incubación, se logra una inhibición significativa de la migración celular a menores concentraciones a las observadas, presentando a la concentración de 1 μM un porcentaje de herida abierta del 56.39%, comparado con un 18% presentado por el control.

En el caso de la línea celular MCF7 Figura II- 7B, el seguimiento se realizó a las 30 horas de realizar la herida en la monocapa, y la concentración de Mito-SG1 requerida para lograr una inhibición de la migración celular estadísticamente significativa fue de 3 μM , muy cercana al IC_{50} del compuesto (3.84 μM).

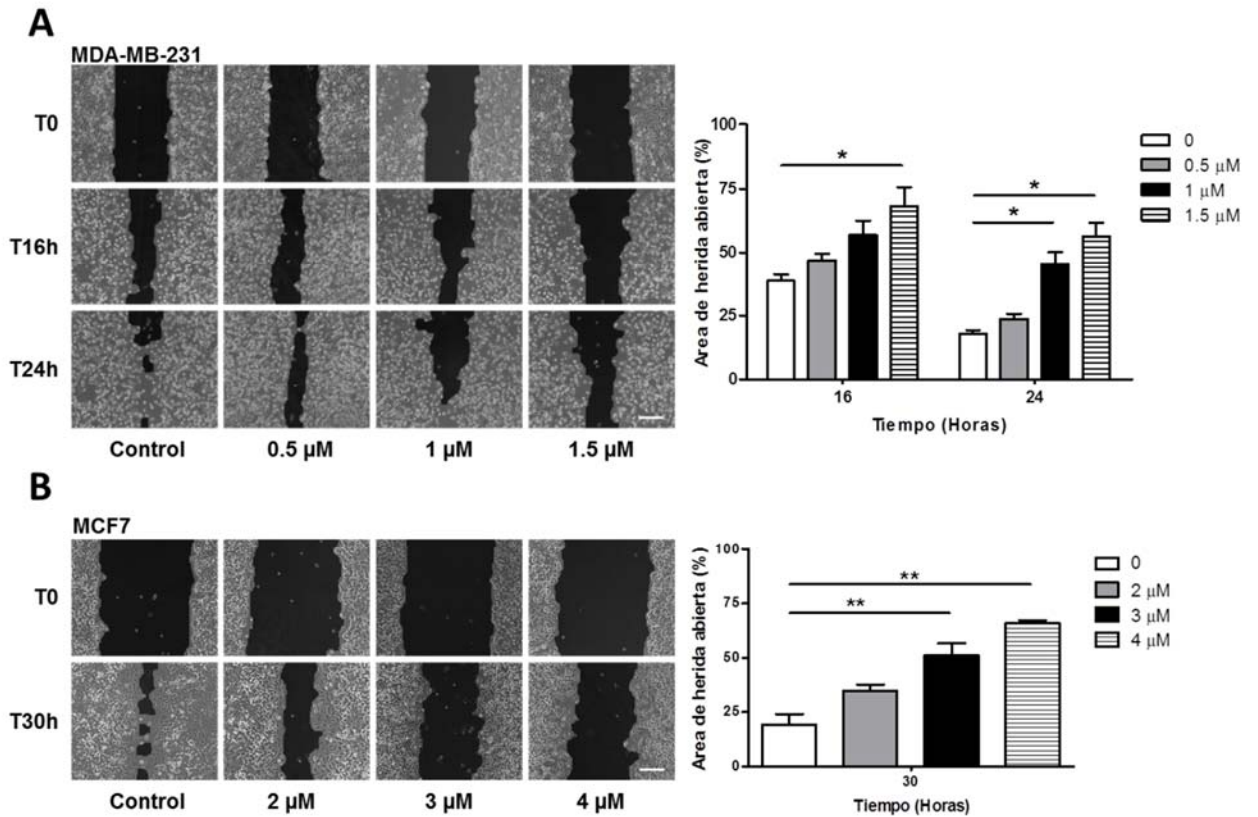


Figura II- 7 Evaluación de los efectos de Mito-SG1 sobre la migración celular in vitro en MDA-MB-231 y MCF7.

Para la evaluación de la migración celular se utilizó el ensayo de cierre de herida, más conocido como “wound healing assay”. Las células fueron sembradas y cultivadas hasta formar una monocapa, posteriormente se realizó la herida con punta de pipeta de 200 μL , se lavaron con PBS y se tomaron las fotos de tiempo 0. Se adicionaron diferentes concentraciones de Mito-SG1 y dependiendo de la velocidad de migración se hicieron las capturas de imágenes respectivas. A) MDA-MB-231 Imágenes de contraste de fase (derecha) y cuantificación (Izquierda). B) MCF7 Imágenes de contraste de fase (derecha) y cuantificación (Izquierda). Las fotos fueron tomadas a un aumento de 10X, y se presentan imágenes representativas de cada uno de los ensayos realizados. Escala de la barra= 200 μM . *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ de cada una de las concentraciones evaluadas comparadas con el control (0), con $n=3$. Las imágenes fueron analizadas con el software libre TScratch (CSElab, Zurich, Switzerland).

2.2 OBJETIVO ESPECIFICO 2

Determinar los efectos apoptóticos de Mito-SG1 en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7).

Uno de los retos en el desarrollo de terapias contra el cáncer, es promover la muerte de las células malignas sin causar daño a las células sanas. Para no causar daño a las células sanas se busca el desarrollo de compuestos selectivos, pero también, debe ser considerado el mecanismo de muerte que dichos compuestos activan para lograr la citotoxicidad. En las terapias contra el cáncer se busca promover la apoptosis, una alta tasa de apoptosis retrasaría el crecimiento del tumor en tejidos con altas tasas mitóticas (162). Las células tumorales pueden suprimir la apoptosis por una serie de mecanismos moleculares y de esta manera adquirir resistencia a los agentes apoptóticos, por ejemplo, mediante la expresión de proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl-2 o por la regulación negativa o mutación de proteínas pro-apoptóticas tales como BAX. Es por esta razón, que el desarrollo de fármacos dirigidos a la mitocondria que puedan inducir apoptosis en las células tumorales es un verdadero reto.

Para determinar si el compuesto Mito-SG1 producía muerte celular promoviendo la apoptosis, y si dicha apoptosis era generada desde la mitocondria, se evaluó en primera instancia los cambios morfológicos nucleares por medio de la tinción con DAPI y observación por microscopía de fluorescencia. Dado que la evaluación de apoptosis incluye no sólo los cambios nucleares, sino también la afectación de la membrana plasmática se determinó si Mito-SG1 producía la translocación de la fosfatidil-serina de la cara interna a la cara externa de la membrana por medio del ensayo de anexina V por citometría de flujo. Entendiendo que muchos de los cambios observados en las células pueden presentarse en apoptosis y necrosis, la determinación de la activación de caspasas 3/7, es fundamental para diferenciar entre estos dos mecanismos de muerte. Y, por último, con el fin de definir si la apoptosis es por la vía intrínseca o extrínseca se procedió a evaluar si Mito-SG1 generaba liberación de citocromo C al citosol, por medio de la técnica de western blot.

2.2.1 Evaluación de los cambios morfológicos del núcleo producidos por Mito-SG1 en TNBC y no-TNBC

Las células sanas muestran una coloración difusa del núcleo. En las células lesionadas el tipo de morfología celular observada depende tanto del tipo célula como del compuesto a evaluar, pero generalmente confluye en tres tipos de patrones de células apoptóticas: 1) Condensación de la cromatina: marginación de

la cromatina sin condensación nuclear; 2) Fragmentación nuclear: lo que corresponde a una marginación de la cromatina con condensación nuclear; y 3) Condensación nuclear: disminución de tamaño del núcleo sin marginación de la cromatina.

Para determinar el porcentaje de células apoptóticas se procedió en primera instancia a calcular con el software software NIS Elements AR Advanced Research) 3.2 (Nikon) la media de: área, circularidad, factor de forma (FF), intensidad media de fluorescencia (IMF) y variación de la intensidad de fluorescencia (VIMF) de las células control. Para determinar los factores que se utilizarían para calcular el número de células con alteraciones morfológicas indicativas de apoptosis se procedió a realizar el mismo ensayo con diferentes concentraciones de estauporina y determinar que valores eran indicativos de cada uno de los tipos de cambios morfológicos Figura II- 8.

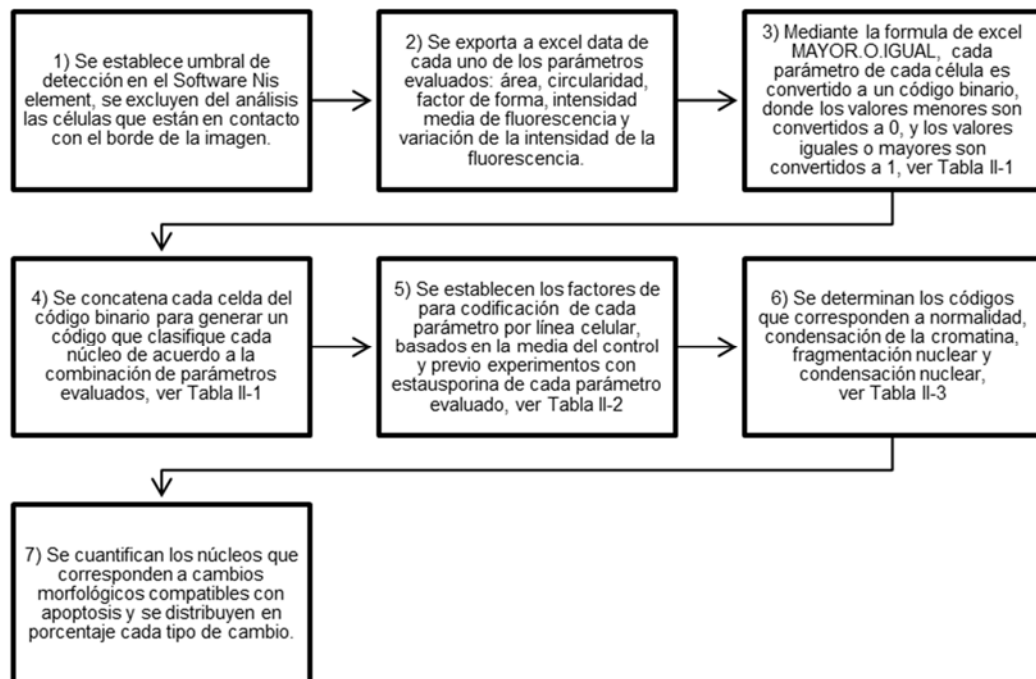


Figura II- 8 Metodología de análisis aplicada a la cuantificación de cambios morfológicos nucleares.

Cada valor numérico obtenido por el software para los parámetros a evaluar fue convertido a un código binario, tal como se puede apreciar en la Tabla II- 1, lo que permitió asignar un código a cada cambio morfológico, partiendo de criterios previamente reportados (163-165) Tabla II- 1.

Tabla II- 1 Ejemplo de codificación por asignación de código binario.

Valores registrados por el Software NIS Element										
Área	Circularidad	FF	IMF	VIMF	Área	Circularidad	FF	IMF	VIMF	Código
526.05	0.85	0.88	145.38	14.26	0	1	1	1	0	1110
723.06	0.849	0.905	131.52	45.74	1	1	1	1	1	11111
752.6	0.785	0.861	134	41.92	1	1	1	1	0	11110
784.79	0.807	0.879	121.2	41.45	1	1	1	0	0	11100
792.18	0.956	0.97	129.76	47.98	1	1	1	1	1	11111
793.66	0.817	0.881	128.66	46.46	1	1	1	0	1	11101

FF, Factor de forma. IMF, Intensidad media de fluorescencia. VIMF, Variación de la intensidad media de fluorescencia.

De esta forma, cada combinación obtenida del código binario tenía como máximo 5 dígitos y como mínimo 1, que se obtenían de acuerdo con los factores asignados a cada parámetro según Tabla II- 2.

Tabla II- 2 Factores de codificación por cada línea celular.

Línea celular	Área	Circularidad	FF	IMF	VIMF
MDA-MB-231	0.5	0.6	0.6	1.35	1.5
MDA-MB-468	0.5	0.6	0.7	1.52	1.5
MCF7	0.5	0.6	0.6	1.35	1.4

Dependiendo del cambio morfológico aplican ciertos criterios, en el caso de condensación de la cromatina, no debía haber una reducción del área del núcleo menor al 50% de la media de los núcleos del control cuantificados previamente, así todos los núcleos que tenía un área mayor a la media del control, tenían un código que empezaba en 10.000 y podían corresponder a núcleos normales o núcleos con condensación de la cromatina.

La condensación de cromatina también se determinaba por cambios en la IMF o de la VIMF, dada por zonas que adquieren una mayor coloración de DAPI con o sin cambios en la circularidad o factor de forma. En el caso de fragmentación nuclear, debía existir una reducción del área mayor al 50% del control, con pérdida de la circularidad y del factor de forma, con o sin, aumento de la IMF o VIMF. Para el caso de la condensación nuclear, se podía clasificar por el mantenimiento de la circularidad y/o FF con pérdida del 50% del área del núcleo, con o sin aumento de a IMF o VIMF Tabla II- 3.

Tabla II- 3 Asignación de códigos por tipo de cambio morfológico nuclear

Normalidad	Condensación de la cromatina	Fragmentación nuclear	condensación nuclear
10000	10001	0	100
10100	10010	1	101
11000	10011	10	110
11100	10101	11	111
11101	10110		1000
	10111		1011
	11110		1100
	11111		1101
			1110
			1111

Por último, se cuantificaron el total de núcleos con cambios morfológicos (mínimo 200 núcleos para el control y 100 núcleos para cada una de las concentraciones evaluadas), representando el total de células apoptóticas como el porcentaje de núcleos con cambios morfológicos del total de núcleos evaluados. Así como, la distribución de los cambios detectados del total de las células clasificadas como indicativas de apoptosis.

En la Figura II- 9 podemos observar que Mito-SG1 induce cambios morfológicos nucleares compatibles con apoptosis a las 48 horas de tratamiento, tanto en TNBC como en no-TNBC. En el lado izquierdo de la figura encontramos imágenes representativas de cada una de las concentraciones utilizadas, así como al lado derecho vemos la cuantificación del porcentaje de células apoptóticas. Las líneas celulares MDA-MB-468 y MDA-MB-231 (TNBC), presentaron aumento estadísticamente significativo de apoptosis a concentraciones de 1 μ M y 1.5 μ M respectivamente. En MDA-MB-468 se observó un 26% y 40% de células apoptóticas a concentraciones de 1 μ M y 1.5 μ M de Mito-SG1 respectivamente. La línea celular MDA-MB-231 presentó un 39% y 48% de células apoptóticas a concentraciones de 1.5 μ M y 2 μ M de Mito-SG1 respectivamente. En el caso de la línea celular MCF7, las concentraciones que reflejaron un aumento en la apoptosis fueron de 3 μ M y 1.5 μ M, con un porcentaje de núcleos afectados del 30% y 55% respectivamente.

Al clasificar los tipos de cambios morfológicos predominantes se observó la condensación de la cromatina en todas las líneas celulares evaluadas, sin embargo, se observó solamente en MDA-MB-468 que al aumentar la concentración de Mito-SG1 el cambio morfológico predominante paso de condensación de la cromatina a condensación nuclear. Por ende, se puede concluir que los cambios morfológicos dependen de las líneas celulares, de los compuestos y concentraciones evaluados, y del tiempo elegido para seguimiento.

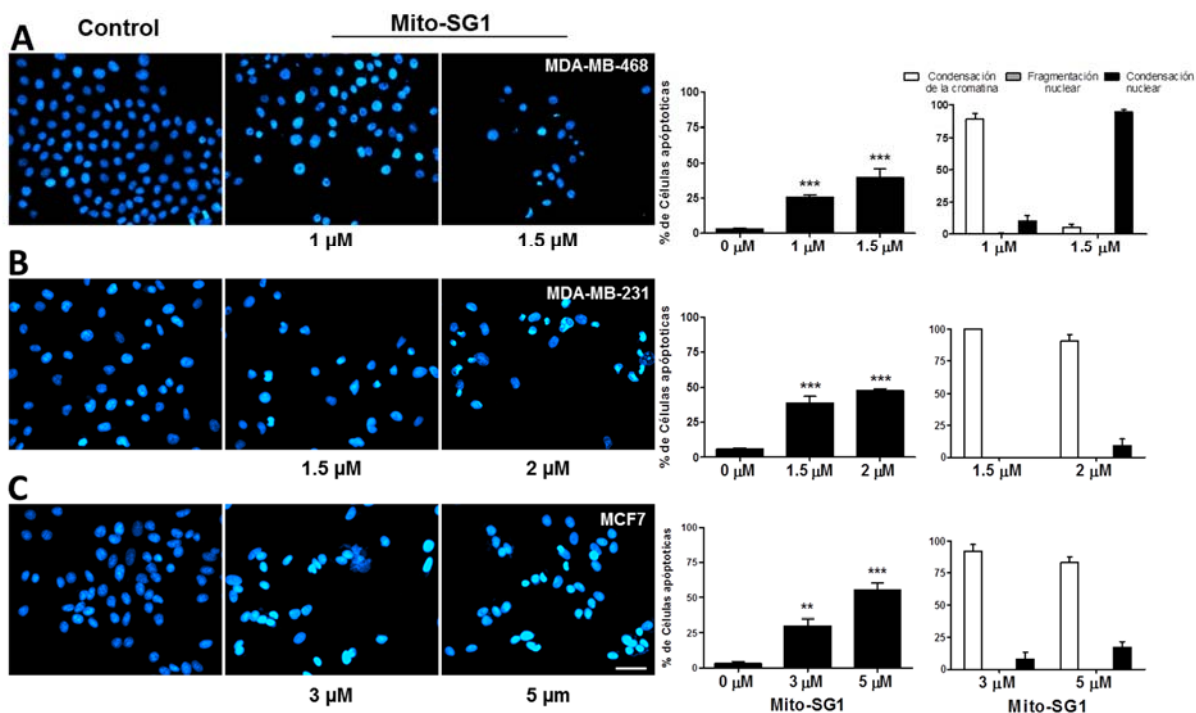


Figura II- 9 Mito-SG1 genera alteraciones en la morfología nuclear de TNBC y no –TNBC compatibles con apoptosis.

Para la evaluación de las alteraciones de la morfología nuclear las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de Mito-SG1 de acuerdo a la concentración del IC₅₀ presentado. Las fotos fueron tomadas a un aumento de 40X, tiempo de exposición de 8 segundos y una ganancia de 1.20X. Se presentan imágenes representativas de cada uno de las concentraciones y líneas celulares evaluadas (Izquierda de la figura). A) MDA-MB-468, B) MDA-MB-231 y C) MCF-7. Escala de la barra= 100 µm. Las imágenes fueron analizadas con el software NIS Elements AR Advanced Research) 3.2 (Nikon) para calcular el área, la circularidad, el factor de forma, la intensidad media de fluorescencia y la variación de la intensidad de fluorescencia, los parámetros obtenidos fueron clasificados en excel para determinar el porcentaje de apoptosis y tipo de cambio morfológico (Derecha de la figura) y la significancia fue calculada en GraphPad Prism 5 por medio de Test de Student. **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, de cada una de las concentraciones evaluadas comparadas con el control (0), donde el control $n \geq 3$.

2.2.2 Mito-SG1 induce traslocación de fosfatidil serina en TNBC

La apoptosis es un proceso cuidadosamente regulado de muerte celular que ocurre como parte normal del desarrollo y que se encuentra de-regulado en las células cancerosas para permitir su supervivencia y aumento de población. La apoptosis se distingue de la necrosis, o de la muerte accidental, por las características morfológicas y cambios bioquímicos. En células normales la fosfatidilserina (FS), se encuentra localizada en la superficie citoplasmática de la membrana celular. Sin embargo, en las células apoptóticas, la FS es traslocada desde la cara interna de la membrana plasmática, hacia la cara externa, exponiendo así la FS al ambiente externo celular. En la apoptosis de leucocitos, la FS de la superficie externa celular es usada como marcador celular, por el cual los macrófagos reconocen a los leucocitos apoptóticos y de esta forma son fagocitados. El anticoagulante, anexina

V, es una proteína de unión a fosfolípidos, dependiente de calcio, y presenta una gran afinidad por la FS. Por esta razón, es ampliamente utilizada para diferenciar apoptosis temprana de necrosis.

Para evaluar la traslocación de FS, se utilizó un doble marcaje con anexina V y colorantes vitales para poder diferenciar las poblaciones de células viables, en apoptosis temprana, apoptosis tardía/necrosis, necrosis. Sin embargo, la apoptosis tardía no es diferenciable de la necrosis con traslocación de FS, por ende, es indispensable experimentos adicionales para confirmar la contribución de una real apoptosis en esta población.

En la línea celular MCF7 Figura II- 10, encontramos a las 24 horas de tratamiento con Mito-SG1, una disminución dosis dependiente de la viabilidad celular y un aumento significativo de la apoptosis temprana y tardía con relación al control, a una concentración de 3 μ M de Mito-SG1. Por otro lado, también hubo un ligero aumento de necrosis, siendo significativo a la concentración de 3 μ M de Mito-SG1.

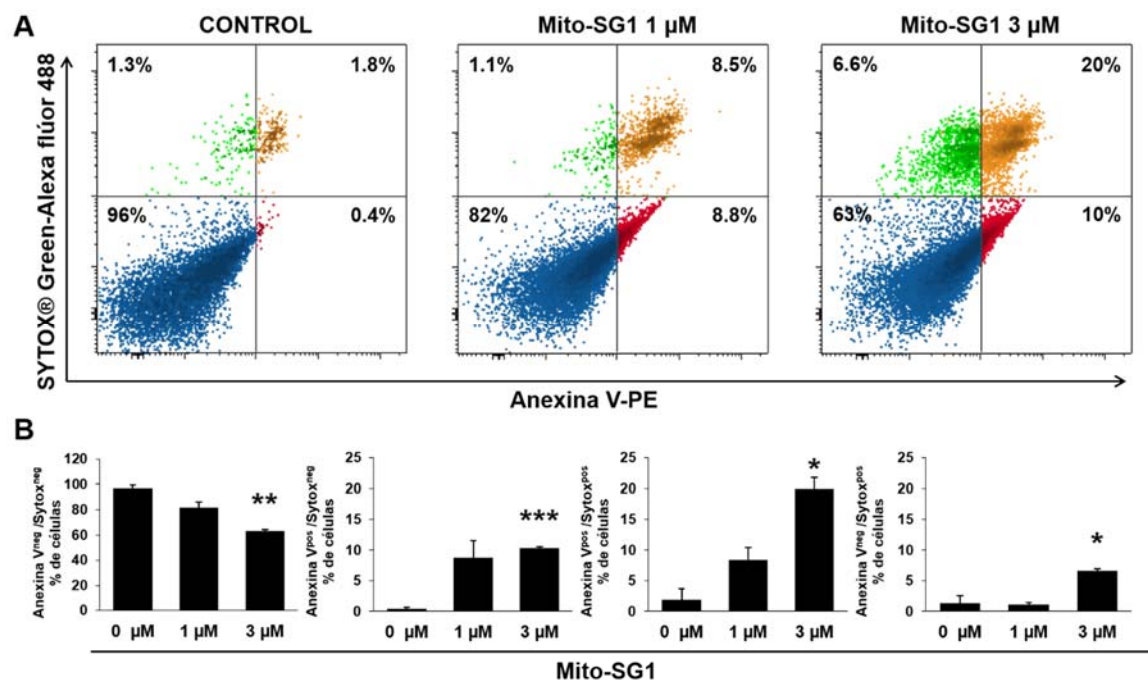


Figura II- 10 Evaluación de la traslocación de fosfatidil serina en la línea celular MCF7.

La traslocación de FS fue evaluada 24 horas posterior al tratamiento con diferentes concentraciones de Mito-SG1 y utilizando un doble marcaje con, anexina V en PE y SYTOX Green cuya lectura se realiza en el canal de Alexa fluor 488 en un citómetro BDFACS Canto II. A) Se presentan los diagramas de densidad de población, identificando las poblaciones detectadas (azul, células viables; rojo, células en apoptosis temprana; naranja, células en apoptosis tardía ó necrosis; y verde, células en necrosis). B) Cuantificación de las poblaciones detectadas (viables, doble negativas; apoptosis temprana, positivas para anexina V y negativas para SYTOX Green; apoptosis tardía/necrosis, doble positivas; y necrosis, negativas para anexina V y positivas para SYTOX Green). La diferencia significativa fue calculada aplicando el test de Student, comparando el control versus cada concentración evaluada, donde, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ y ***, $p < 0.001$, con $n = 3$.

En el caso de la línea celular MDA-MB-231 (TNBC), a las 24 horas de tratamiento pudimos observar una disminución dosis dependiente de Mito-SG1 correspondientes a los valores calculados para su IC₅₀ por el ensayo de formación de colonias y de MTT. Al aumentar la concentración del compuesto se observa hasta un 47% de aumento de la apoptosis temprana, con valores mínimos de apoptosis tardía o necrosis Figura II- 11.

Cuando se realizó el ensayo en la línea celular MDA-MB-468, se inició con un tratamiento a 24 horas como fue presentado para las líneas celulares de MCF7 y MDA-MB-468. Sin embargo, a pesar de lograr una disminución de la viabilidad celular del 87% a una concentración de 2 μ M, también era evidenciable que se

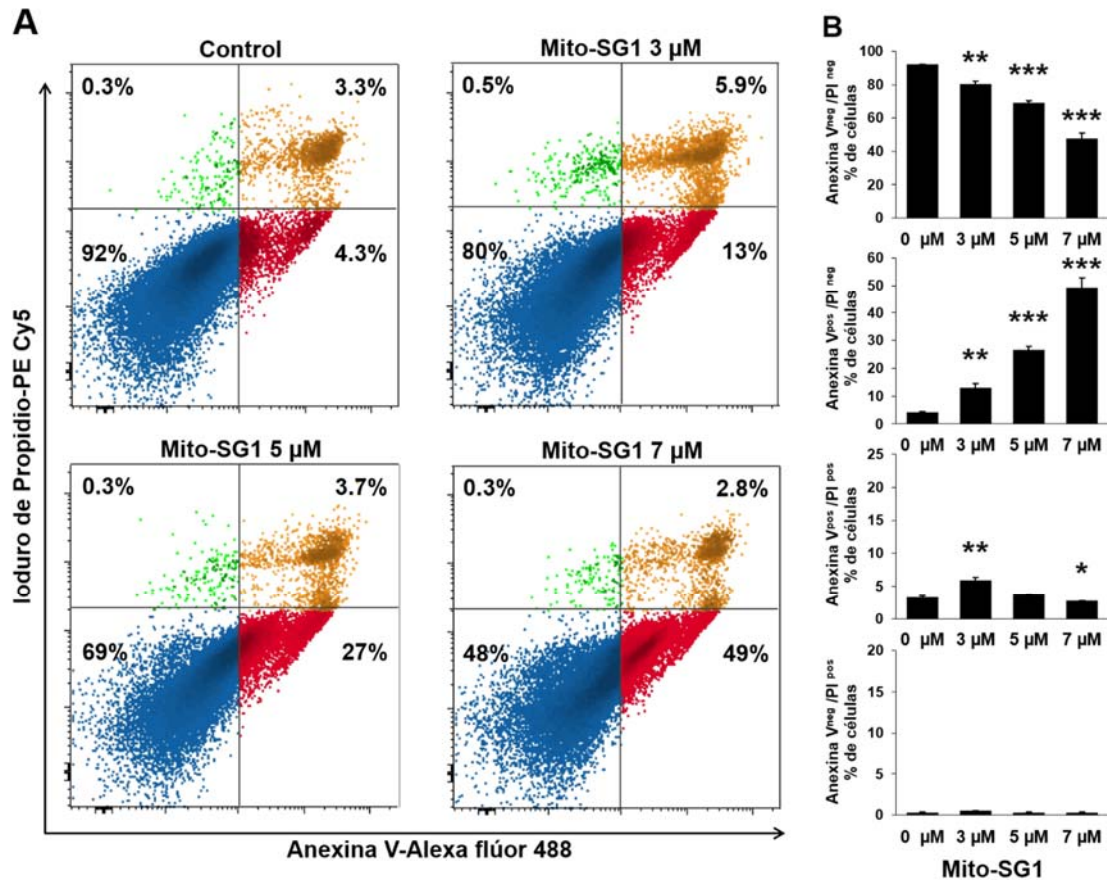


Figura II- 11 Evaluación de la traslocación de fosfatidil serina en la línea celular MDA-MB-231.

La traslocación de FS fue evaluada 24 horas posterior al tratamiento con diferentes concentraciones de Mito-SG1 y utilizando un doble marcaje con, anexina V en Alexa flúor 488 y Ioduro de Propidio (PI, por sus siglas en inglés Propidium iodide) cuya lectura se realiza en el canal de PE Cy5 en un citómetro BDFACS Canto II. A) Se presentan los diagramas de densidad de población, identificando las poblaciones detectadas (azul, células viables; rojo, células en apoptosis temprana; naranja, células en apoptosis tardía ó necrosis; y verde, células en necrosis). B) Cuantificación de las poblaciones detectadas (viables, doble negativas; apoptosis temprana, positivas para anexina V y negativas para PI; apoptosis tardía/necrosis, doble positivas; y necrosis, negativas para anexina V y positivas para PI). La diferencia significativa fue calculada aplicando el test de Student, comparando el control versus cada concentración evaluada, donde, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ y ***, $p < 0.001$, con $n = 3$.

lograba un mayor aumento de la apoptosis tardía/necrosis, que de la misma apoptosis temprana Figura II- 12. Quisimos averiguar si, el aumento de la apoptosis tardía/necrosis, era un efecto de la concentración utilizada o del tiempo del tratamiento, como consecuencia de daño extremo celular que generaba la pérdida de la integridad de la membrana celular y, por ende, una señal positiva para PI. Por esta razón, se procedió en esta línea celular, a evaluar los efectos a las 12 y 18 horas de tratamiento 1 y 2 μ M de Mito-SG1.

Como podemos observar al disminuir el tiempo de tratamiento se logra una disminución de la apoptosis tardía/necrosis, llegando a las 12 horas de tratamiento a no ser diferente a la presentada por el control Figura II- 12. A las 12 horas de tratamiento se observa el aumento de la apoptosis temprana, mas no, de la apoptosis tardía/necrosis, ó de la necrosis.

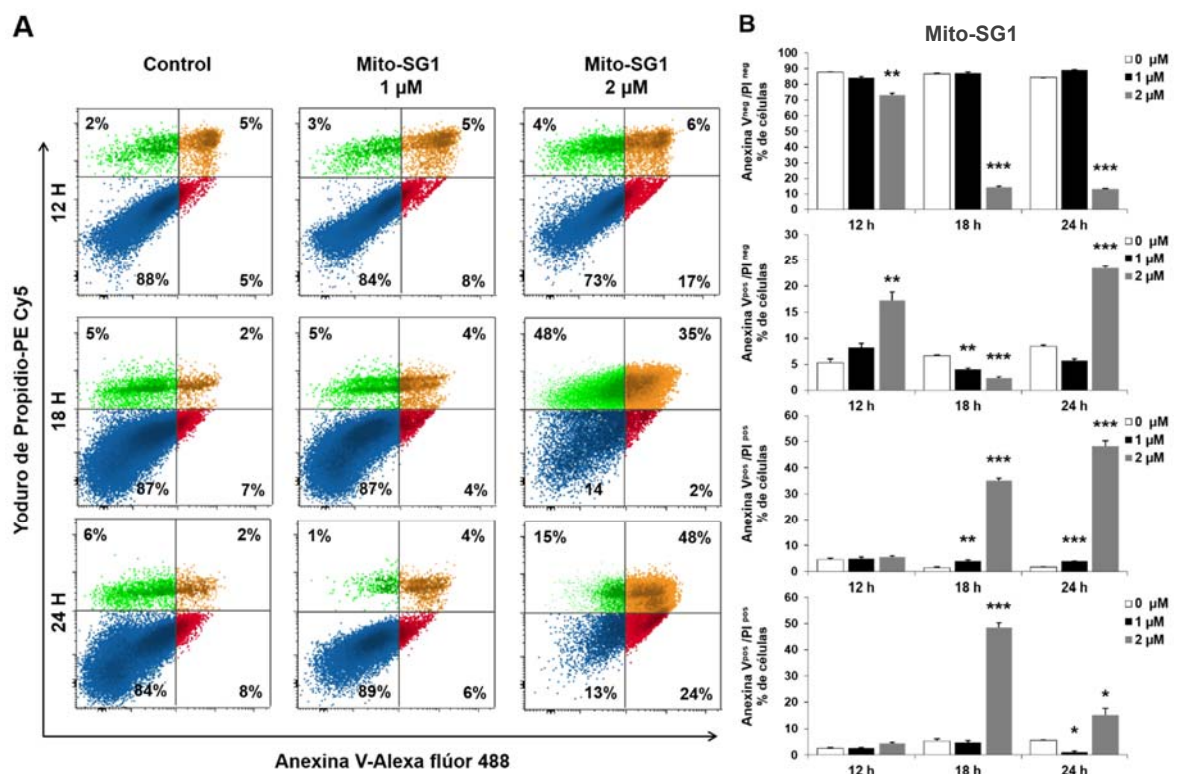


Figura II- 12 Evaluación de la traslocación de fosfatidil serina en la línea celular MDA-MB-468.

La traslocación de FS fue evaluada 12, 18 y 24 horas posterior al tratamiento con diferentes concentraciones de Mito-SG1 y utilizando un doble marcaje con, anexina V en Alexa flúor 488 y Ioduro de Propidio (PI, por sus siglas en inglés Propidium iodide) cuya lectura se realiza en el canal de PE Cy5 en un citómetro BDFACS Canto II. A) Se presentan los diagramas de densidad de población, identificando las poblaciones detectadas (azul, células viables; rojo, células en apoptosis temprana; naranja, células en apoptosis tardía ó necrosis; y verde, células en necrosis). B) Cuantificación de las poblaciones detectadas (viables, doble negativas; apoptosis temprana, positivas para anexina V y negativas para PI; apoptosis tardía/necrosis, doble positivas; y necrosis, negativas para anexina V y positivas para PI). La diferencia significativa fue calculada aplicando el test de Student, comparando el control versus cada concentración evaluada en el mismo lapso de tiempo, donde, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ y ***, $p < 0.001$, con $n = 3$.

Los anteriores resultados nos sugieren que la apoptosis es el mecanismo de muerte celular estimulada por Mito-SG1, tanto en las líneas celulares de TNBC como no TNBC, y que es dependiente del tiempo de tratamiento y la concentración utilizada.

Para diferenciar la apoptosis tardía de la necrosis, se procedió a evaluar la actividad de caspasas 3/7 en las líneas celulares de TNBC.

2.2.3 Mito-SG1 induce activación de caspasas 3/7 en TNBC

Para confirmar el mecanismo de muerte celular estimulado por Mito-SG1 en las líneas celulares de TNBC, se procedió a determinar la actividad de las caspasas 3/7 después de 24 horas de tratamiento, por medio del sustrato Magic Red- Ácido aspartil-glutamil-valanil-aspartico (MR-(DEVD)₂). El sustrato consiste en una molécula de violeta de cresilo unida a dos copias del sustrato DEVD (4 secuencias de amino ácidos, considerados el blanco óptimo para las caspasas 3 y 7). Cuando el MR-(DEVD)₂ está intacto, la fluorescencia es aplacada o apagada. Cuando el MR es cortado del DEVD por las caspasas activas, este se acumula en los lisosomas y emite una fuerte fluorescencia roja. De esta manera es detectado por citometría de flujo en el canal PE CY5 (BD FACSCANTO II). Adicionalmente se utilizó un doble marcaje, adicionando SYTOX Green para poder identificar 4 poblaciones celulares: células viables MR-(DEVD)₂(-)/Sytox green(-); Apoptosis temprana MR-(DEVD)₂(+)/Sytox green(-); Apoptosis tardía MR-(DEVD)₂(+)/Sytox green(+); y Necrosis MR-(DEVD)₂(-)/Sytox green(+).

En la línea celular MDA-MB-231 Figura II- 13A y C, observamos aumento de la actividad de caspasas 3/7 sin compromiso de la integridad de la membrana celular, a concentraciones inferiores de Mito-SG1 que, logran traslocación de fosfatidil serina. Por otra parte, al aumentar la concentración de Mito-SG1, se disminuye la apoptosis temprana y aumenta la apoptosis tardía y la necrosis, evidenciada en el daño de la membrana celular.

En el caso de la línea celular MDA-MB-468 Figura II- 13B y D, se observa que efectivamente se presenta la activación de caspasas 3/7, sin compromiso de la membrana celular, logrando a concentraciones de 1 μ M de Mito-SG1 un aumento significativo estadísticamente del 27% de apoptosis. A pesar de observar que el aumento del porcentaje de población necrótica es estadísticamente significativo, el porcentaje mayor alcanzado fue de 4%, lo cual, para efectos de los resultados no es relevante.

Podemos concluir que Mito-SG1 con 24 horas de tratamiento, genera estimulación de la apoptosis mediada por caspasas, como mecanismo de muerte celular en las líneas celulares de MDA-MB-231 y MDA-MB-468.

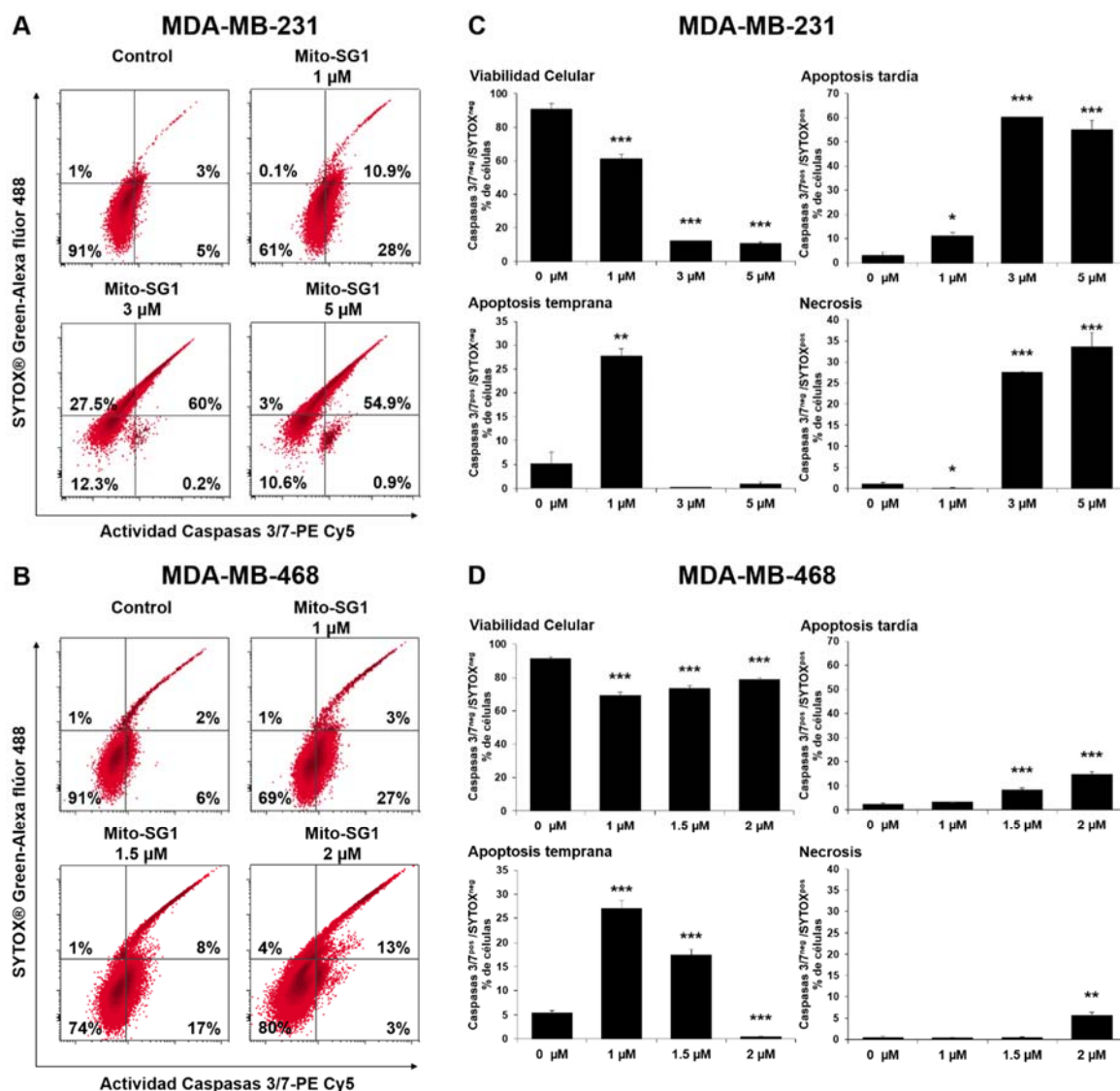


Figura II- 13 Mito-SG1 induce activación de las caspasas 3/7 en TNBC.

La activación de caspasas fue evaluada 24 horas posterior al tratamiento con diferentes concentraciones de Mito-SG1 y utilizando el ensayo Magic Red® Caspase-3/7 Assay. El sustrato Magic Red- Ácido aspartil-glutamil-valanil-aspartico (MR-(DEVD)2), consiste en una molécula de violeta de cresilo unida a dos copias del sustrato DEVD (4 secuencias de amino ácidos, considerados el blanco óptimo para las caspasas 3 y 7). Cuando el MR-(DEVD)2 está intacto, la fluorescencia es aplacada o apagada. Cuando el MR es cortado del DEVD por las caspasas activas, este se acumula en los lisosomas y emite una fuerte fluorescencia roja. De esta manera es detectado por citometría de flujo en el canal PE CY5 (BD FACSCANTO II). Adicionalmente se realizó contraste con SYTOX Green, para la identificación de 4 poblaciones celulares: células Caspasas 3/7^{neg}/SYTOX Green^{neg}; Apoptosis temprana Caspasas 3/7^{pos}/SYTOX Green^{neg}; Apoptosis tardía Caspasas 3/7^{pos}/SYTOX Green^{pos}; y Necrosis Caspasas 3/7^{neg}/SYTOX Green^{pos}. A) Se presentan los diagramas de densidad total, de la línea celular MDA-MB-231. C) Cuantificación de las poblaciones detectadas (viables, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis). La diferencia significativa fue calculada aplicando el test de Student, comparando el control versus cada concentración evaluada para la población de interés, donde, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ y ***, $p < 0.001$, con $n = 3$.

2.2.4 La activación de la vía intrínseca de la apoptosis posiblemente es el mecanismo de muerte celular inducido por Mito-SG1

Después de 48 horas de tratamiento con Mito-SG1 se procedió a evaluar la liberación de citocromo c al citosol, para determinar si la apoptosis era un evento ocurrido por la vía intrínseca, como resultado de afectación de la integridad de la membrana mitocondrial. Se presenta a continuación data preliminar, donde se evidencia en la línea celular MDA-MB-231 una reducción del 50% del citocromo c en la fracción mitocondrial relativa al control y un aumento del 700% del citocromo c en la fracción S-100 citosólica Figura II- 14. Lo anterior no lleva a suponer que posiblemente Mito-SG1 estimula la traslocación del citocromo c del espacio intermembranaral mitocondrial al citosol (por activación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial). El citocromo c se une a la proteína APAF1 para formar el apoptosoma en presencia de dATP. El apoptosoma es el responsable de la activación de la caspasa iniciadora 9 quien, a su vez, activada las caspasas efectoras 3/7, lo que explicaría la activación de las mismas observadas en el ensayo de citometría Figura II- 13.

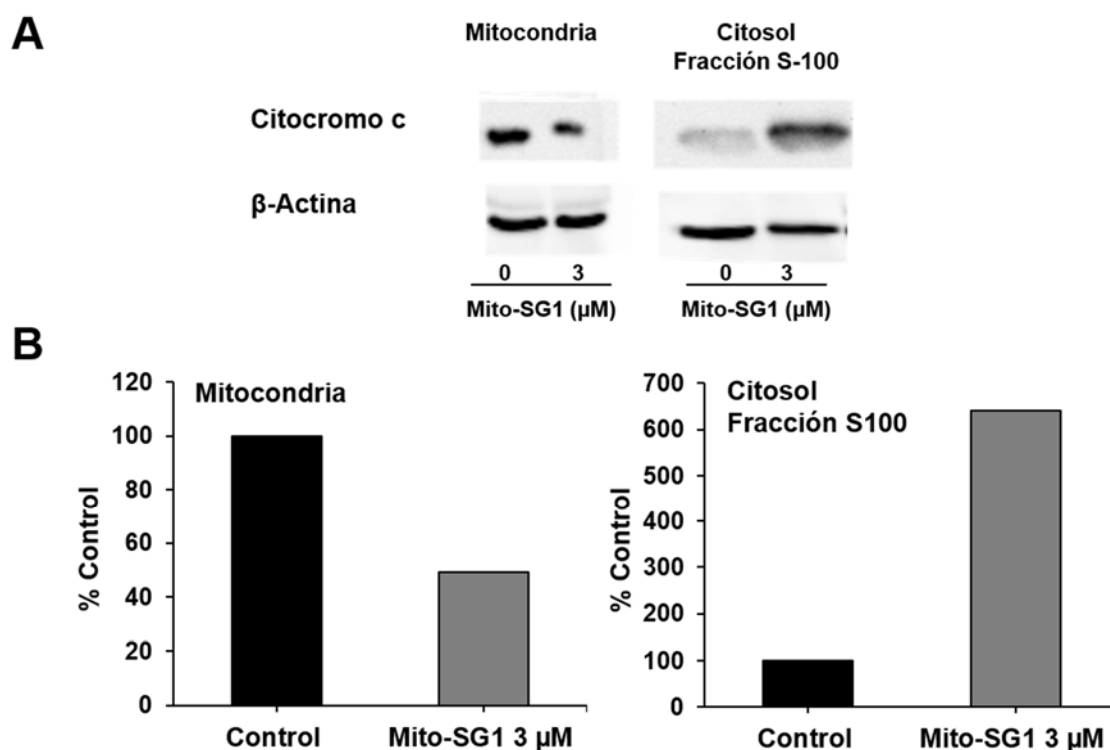


Figura II- 14 Mito-SG1 estimula la liberación de citocromo c al citosol en MDA-MB-231.

Ensayo realizado por Western Blot, realizando separación de la fracción mitocondrial y citosólica S100. A) Fotografía de la membrana. B) Cuantificación de citocromo c en la mitocondria (Izquierda) y fracción S100 (derecha).

2.3 OBJETIVO ESPECIFICO 3

Examinar los efectos de Mito-SG1 sobre el potencial de membrana mitocondrial, el estrés oxidativo y la bioenergética mitocondrial en las líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y no-TNBC (MCF7).

Para examinar los efectos de Mito-SG1 sobre la función mitocondrial, se procedió a evaluar el potencial de membrana y la generación de ROS mitocondrial. Dado que los últimos estudios reportan que los mito-compuestos inhiben la proliferación tumoral celular por mecanismos en su mayoría, independientes de su capacidad antioxidante (166), los cuales incluyen la modulación de la bioenergética mitocondrial (167), fue necesario evaluar de esta forma, el efecto de Mito-SG1 sobre la respiración, la glicólisis, y las diferentes fuentes de carbono utilizadas por las células para la producción de energía. Se utilizó para esta evaluación la tecnología Seahorse Bioscience, que permite el registro en tiempo real de los cambios en la tasa de consumo de oxígeno y de la acidificación extracelular en condiciones normales y con el uso de inhibidores específicos.

2.3.1 Mito-SG1 induce despolarización de membrana mitocondrial y estrés oxidativo en TNBC y no TNBC.

Únicamente Mito-SG1, más no sus compuestos parentales SG1 y TPP, fueron efectivos para generar muerte celular e inhibir la proliferación celular, la habilidad de formar colonias, y la migración celular de las líneas celulares de TNBC y no TNBC. Debido a que lo anterior implica la existencia de daños a nivel mitocondrial, se procedió a evaluar el potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda JC-1 y la generación de superóxido mitocondrial por medio de la sonda MitoSOX®.

2.3.1.1 La Disrupción del potencial de membrana es dosis dependiente de la concentración de Mito-SG1

Las células fueron tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de Mito-SG1, y posteriormente fueron expuestas al catión lipofílico citofluorométrico JC1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil bencimidazolilo carbocianina yoduro). Este catión puede entrar selectivamente en la mitocondria y generar un cambio de color reversible de rojo (~590nm) a verde (~529nm), correspondiente al potencial de membrana presente (Figura II- 15). La fluorescencia emitida de color rojo corresponde a los J-agregados que son formados espontáneamente con la sonda

JC-1 en células con alto potencial de membrana. La fluorescencia verde emitida por los monómeros de JC-1, corresponde a la sonda que no pudo formar J-agregados, debido a un bajo potencial de membrana de la mitocondria. Se evaluó por microscopía de fluorescencia y confirmar por citometría de flujo el efecto de Mito-SG1 sobre el potencial de membrana mitocondrial.

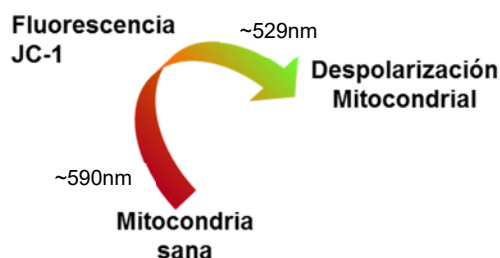


Figura II- 15 Esquema del cambio de fluorescencia detectado con JC-1.

Como podemos observar en la Figura II- 16, Mito-SG1 induce una pérdida dosis-dependientes del potencial de membrana mitocondrial a 24 horas de tratamiento y a concentraciones inferiores a 3 μ M, tanto en la línea celular no TNBC MCF7, como en las líneas celulares TNBC MDA-MB-468 y MDA-MB-231. Lo anterior es

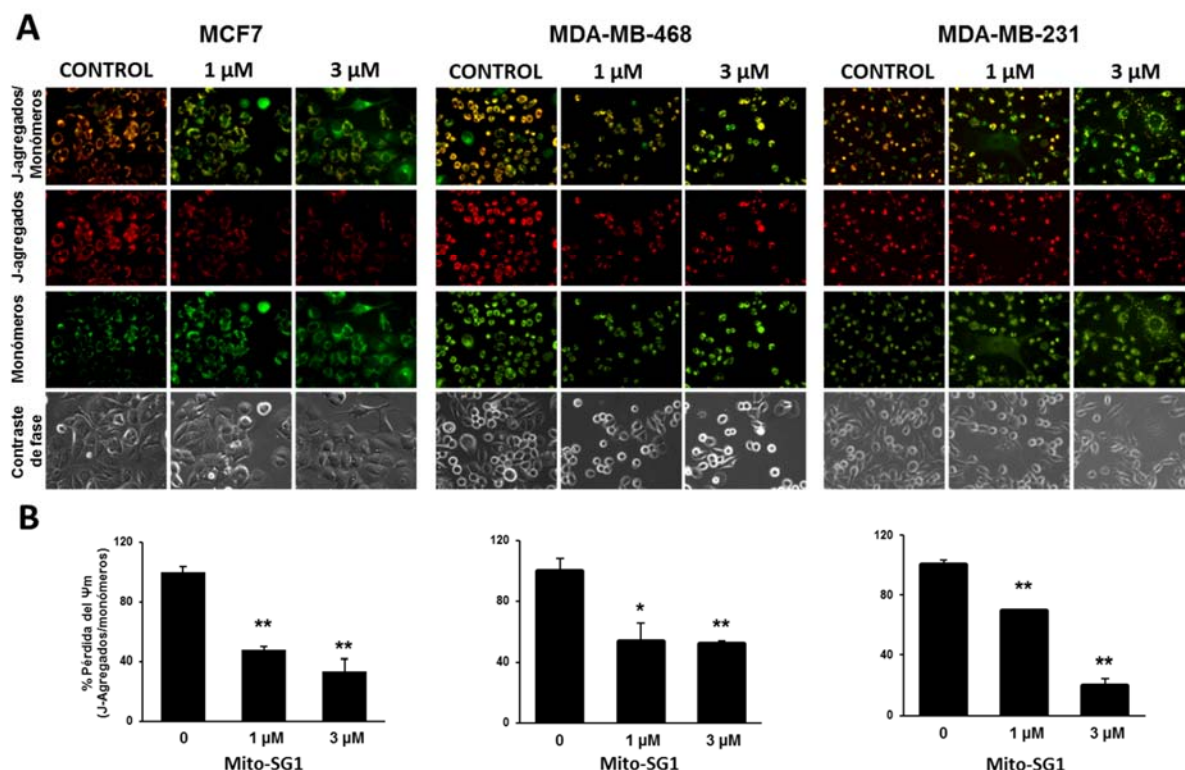


Figura II- 16 Mito-SG1 genera despolarización de la membrana mitocondrial en TNBC y no TNBC.

Para la evaluación de los efectos en el potencial de membrana se utilizó la sonda JC-1 en las líneas celulares TNBC y no TNBC, posteriores a 24 horas de tratamiento. A) Se presentan imágenes representativas de cada uno de las concentraciones y líneas celulares evaluadas. B) Se presenta la cuantificación de la pérdida del potencial de membrana como porcentaje del control. Las fotos fueron tomadas a un aumento de 40X, tiempo de exposición de 8 segundos y una ganancia de 1.20X. Escala de la barra= 200 μ M. Las imágenes fueron analizadas con el software NIS Elements AR Advanced Research) 3.2 (Nikon). La significancia fue calculada en GraphPad Prism 5 por medio de Test de Student. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, de cada una de las concentraciones evaluadas comparadas con el control (0), donde $n \geq 3$.

consistente a los efectos citotóxicos observados en el rango de las dosis del compuesto evaluadas. Es de destacar que se observa una disminución mayor al 50% del potencial de membrana del control.

Posteriormente se procedió a verificar los resultados por citometría de flujo encontrando correspondencia a los resultados observados por microscopia de fluorescencia. Como podemos observar en la Figura II- 17A, que corresponde a las imágenes de los diagramas de puntos de densidad, el control presenta un contorno en su mayoría dado por la señal de la fluorescencia emitida por los J-agregados. Al aumentar la concentración de Mito-SG1 se evidencia en todas las líneas celulares el aumento de la fluorescencia verde correspondiente a una despolarización dosis dependiente de la concentración del compuesto.

En la Figura II- 17B se observa la cuantificación de la pérdida del potencial de membrana, correspondiente a una disminución del radio J-agregados/monómeros registrados en las diferentes concentraciones evaluadas del compuesto, como porcentaje del radio registrado del control. Como lo muestra la figura, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 son más sensibles a la pérdida del potencial de membrana

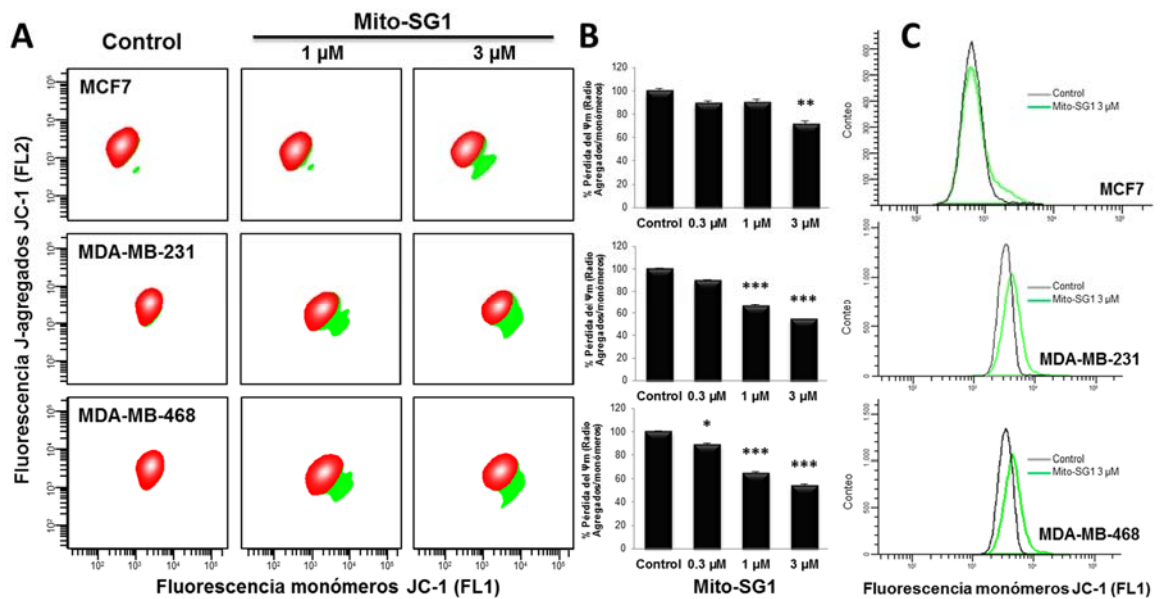


Figura II- 17 Evaluación del efecto de Mito-SG1 sobre el potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo en TNBC y no TNBC.

Para la evaluación de los efectos en el potencial de membrana se utilizó la sonda JC-1 en las líneas celulares TNBC y no TNBC, posteriores a 24 horas de tratamiento. A) Se presenta los diagramas de puntos de densidades donde se representa en el eje Y la fluorescencia de los J-agregados, versus la fluorescencia de los monómeros en el eje X a concentraciones de 1 y 3 μ M de Mito-SG1. B) Se presenta la cuantificación de la pérdida del potencial de membrana como porcentaje del control. C) Se presenta el histograma de la fluorescencia verde (monómeros) del control y la máxima concentración utilizada del compuesto. La significancia estadística fue calculada en GraphPad Prism 5 por medio de Test de Student. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ de cada una de las concentraciones evaluadas comparadas con el control (0), donde $n \geq 3$.

mitocondrial a dosis menores del Mito-SG1 que la línea celular no TNBC MCF7. En la Figura II- 17C, se observa el desplazamiento de la población en el histograma al aumentar la señal de los monómeros, lo que corresponde al efecto de Mito-SG1 en las diferentes líneas celulares, posiblemente por la formación del poro de transición mitocondrial.

2.3.1.2 Mito-SG1 genera estrés oxidativo en TNBC y no TNBC, a expensas de la producción de superóxido de origen mitocondrial.

Debido a que la pérdida de la integridad mitocondrial es frecuentemente asociada con estrés oxidativo, se procedió a determinar si el tratamiento con Mito-SG1 podría afectar los niveles de oxidación de la sonda fluorescente redox-sensible MitoSOX® Red. MitoSOX® Red, es una sonda fluorogénica selectiva para la detección de superóxido mitocondrial, compuesta de un catión de hexil-trifenilfosfonio conjugado a hidroetidina (HE), y aunque ambos, tanto el MitoSOX como la HE pueden ser oxidados por el superóxido, únicamente MitoSOX puede detectar específicamente el superóxido mitocondrial cuando es excitado a una longitud de onda específica (155).

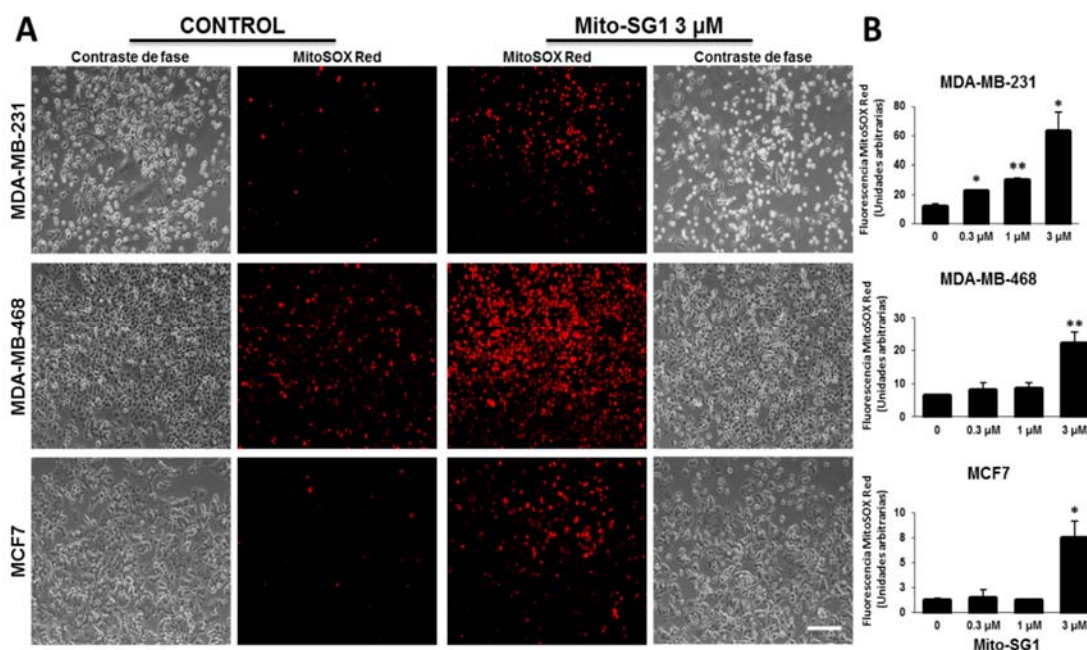


Figura II- 18 Detección de superóxido mitocondrial en líneas celulares de TNBC y no TNBC posterior al tratamiento por 24 horas con Mito-SG1.

La evaluación de los efectos en el estrés oxidativo se realizó por medio de la detección de la oxidación de la sonda MitoSOX Red, selectiva para la producción de superóxido mitocondrial. Las líneas celulares fueron tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de Mito-SG1. A) se presentan imágenes representativas de cada uno de los ensayos realizados, en contraste de fase (Izquierda) y MitoSOX Red (derecha). Las fotos fueron tomadas a un aumento de 10X. Escala de la barra= 200 μM. B) Se presenta la cuantificación de la fluorescencia de MitoSOX Red, del total de concentraciones evaluadas. La significancia estadística fue calculada aplicando el Test de Student. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ de cada una de las concentraciones comparadas con el control (0), donde $n \geq 3$

Mito-SG1 aumenta de forma dosis dependiente la producción de superóxido en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7, como lo podemos observar en la Figura II- 18. En la Figura II- 18A, se muestran imágenes representativas tomadas por microscopia de fluorescencia, donde se puede comparar la detección de fluorescencia del control versus la concentración de 3 μM de Mito-SG1. La cuantificación de la fluorescencia se grafica en la Figura II- 18B, evidenciando que a concentraciones de 3 μM de Mito-SG1, se logra un aumento significativo de la producción de superóxido mitocondrial y, por ende, de estrés oxidativo en las líneas celulares evaluadas.

Se procedió a realizar la cuantificación y verificación por citometría de flujo de la producción de superóxido en las líneas celulares TNBC, MDA-MB-231 y MDA-MB-468. En este caso, debido a que se detectó una señal de MitoSOX Red no estable durante la lectura (determinado por lecturas estadísticamente significativas entre los

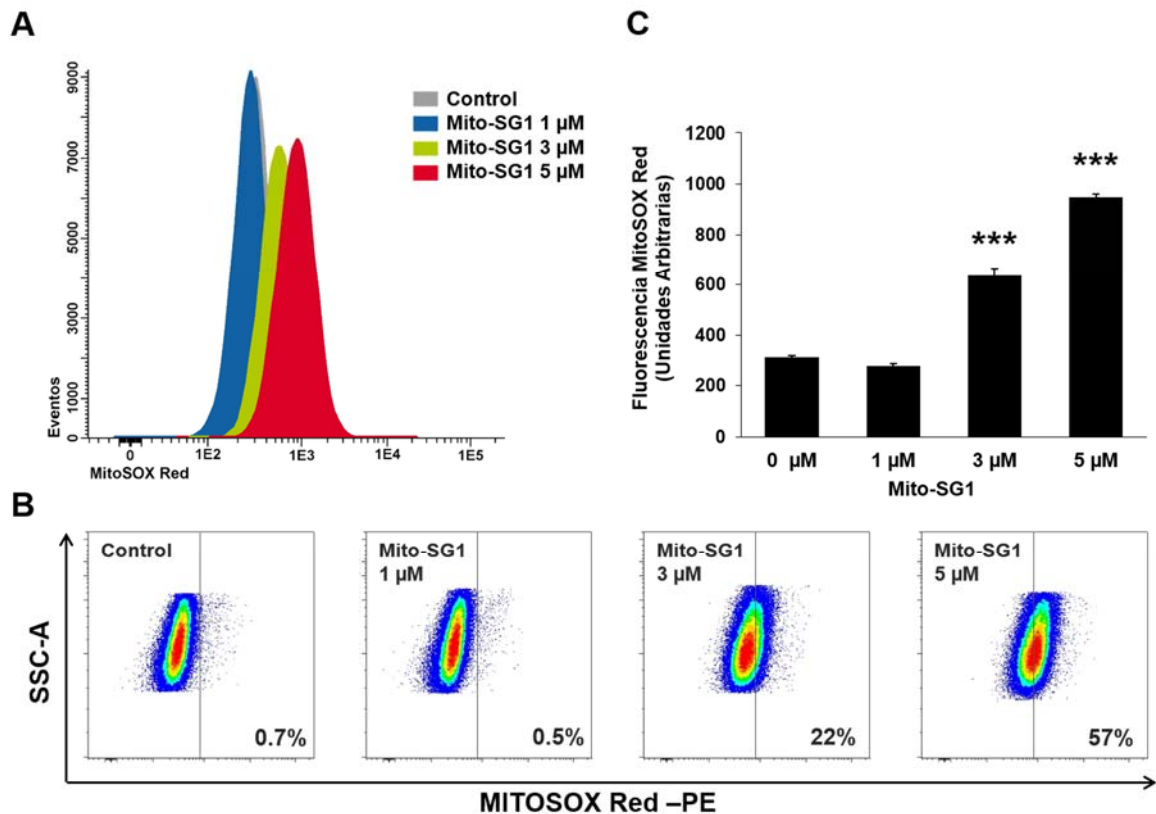


Figura II- 19 Detección de superóxido mitocondrial en la línea celular MDA-MB-231 por citometría de flujo.

La evaluación de los efectos en el estrés oxidativo se realizó por medio de la detección de la oxidación de la sonda MitoSOX Red, selectiva para la producción de superóxido mitocondrial. Las líneas celulares fueron tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de Mito-SG1. A) Histograma de las concentraciones evaluadas. B) Diagrama de puntos de densidad total, SSC-A versus fluorescencia de MITOSOX Red. C) Cuantificación. Total de eventos analizados por muestra 20.000. Data capturada en un citómetro FACS Canto II BD, y analizada con el software infinicity. La significancia estadística fue calculada aplicando el Test de Student. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ de cada una de las concentraciones comparadas con el control (0), donde $n \geq 3$.

controles al inicio y finalización de los tubos a evaluar), se decidió implementar la fijación con glutaraldehído que permitía estabilizar la señal de fluorescencia del control a lo largo de la lectura de todas las muestras.

Como podemos observar en las Figura II- 18 y Figura II- 19, los resultados evidenciados por citometría de flujo en las líneas celulares de TNBC, son correspondientes a los encontrados por microscopia de fluorescencia. Los anteriores resultados nos permiten afirmar que Mito-SG1 produce estrés oxidativo a expensas del aumento de la producción de superóxido mitocondrial.

Debido a recientes resultados observados en cáncer gástrico, donde se demostró que el aumento de ROS y la disrupción del potencial de membrana indujo la supresión de la fosforilación de ERK y activación de caspasa 3 (196), procedimos a

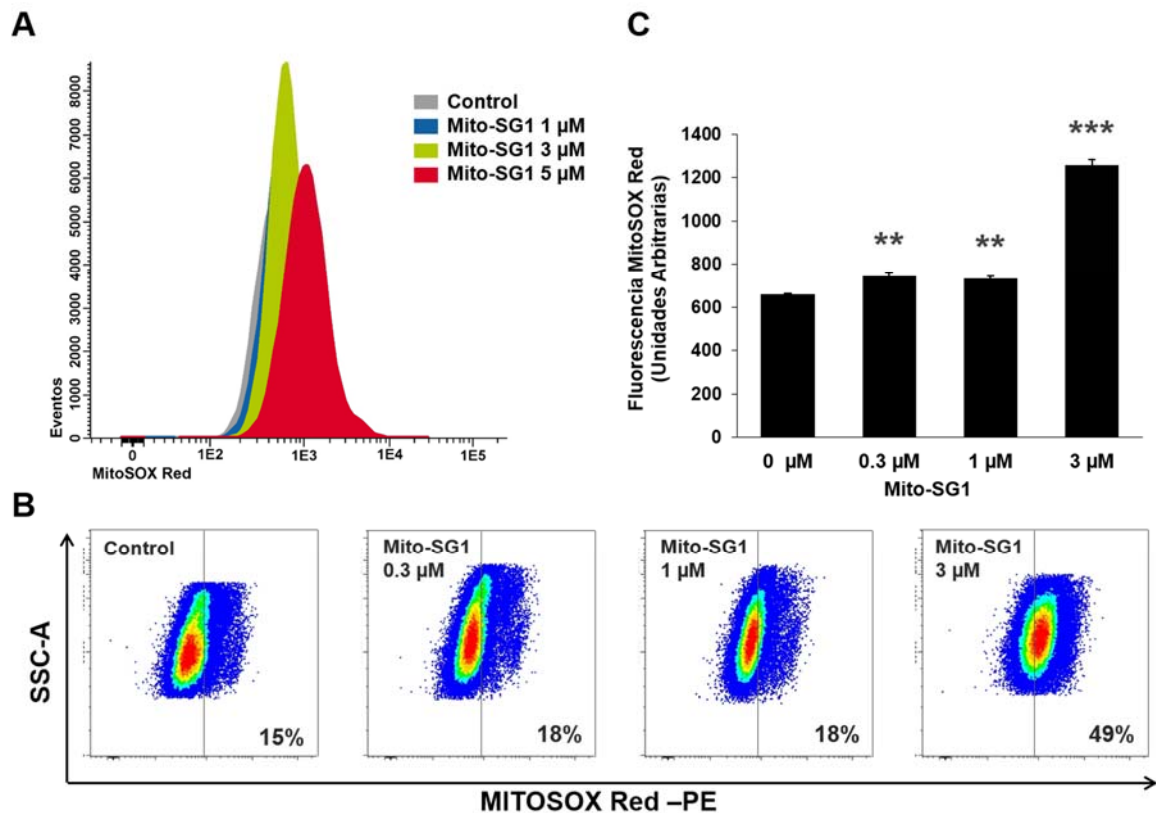


Figura II- 20 Detección de superóxido mitocondrial en la línea celular MDA-MB-468 por citometría de flujo.

La evaluación de los efectos en el estrés oxidativo se realizó por medio de la detección de la oxidación de la sonda MitoSOX Red, selectiva para la producción de superóxido mitocondrial. Las líneas celulares fueron tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de Mito-SG1. A) Histograma de las concentraciones evaluadas. B) Diagrama de puntos de densidad total, SSC-A versus fluorescencia de MITOSOX Red. C) Cuantificación. Total de eventos analizados por muestra 20.000. Data capturada en un citómetro FACS Canto II BD, y analizada con el software infinity. La significancia estadística fue calculada aplicando el Test de Student. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ de cada una de las concentraciones comparadas con el control (0), donde $n \geq 3$.

evaluar en data preliminar el potencial rol de la vía Ras/MEK/ERK en la respuesta antitumoral observada.

Como podemos observar en Figura II- 21 (data preliminar), Mito-SG1 genera una disminución dosis dependiente de la activación de ERK en la línea celular MDA-MB-468, consistente con la información publicada el presente año en cáncer gástrico y con un estudio presentado de carcinoma medular tiroideo, donde se utilizó Mito-CP para inhibir la proliferación celular (58). Los anteriores resultados nos impulsan a evaluar el potencial rol de Ras y la vía MAPK (p38, JNK y ERK), en la respuesta antitumoral generada por Mito-SG1.

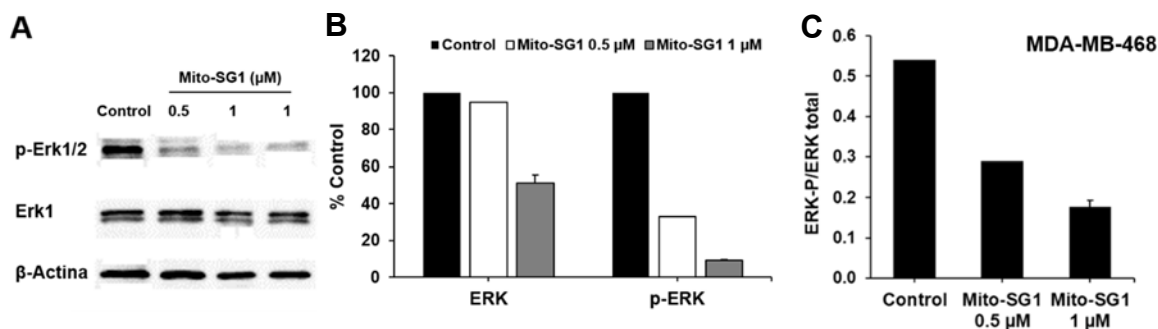


Figura II- 21 La vía de señalización ERK es afectada por el tratamiento con Mito-SG1 en TNBC.

Western blot de ERK y p-ERK, en la línea celular MDA-MB-468. A) Fotos de la membrana. B) Cuantificación de expresión de ERK y p-ERK. C) Ratio de activación de ERK. Tratamiento con Mito-SG1 por 48 horas con diferentes concentraciones de Mito-SG1 (Data preliminar).

2.3.2 Las células que son forzadas a depender de la respiración mitocondrial para la producción de ATP son más sensibles a Mito-SG1

Desde 1992, Robinson et al. (168) reportaron que una forma de evaluar los defectos en la fosforilación oxidativa consistía en forzar el metabolismo oxidativo cambiando la glucosa por galactosa en el medio de cultivo. Aquellas células que tenían defectos severos en FosOx no eran capaces de sobrevivir en medio con galactosa. Esto ocurre porque al suprimir la glucosa por galactosa, el metabolismo se re-direcciona hacia el uso de FosOx para la producción de ATP, debido a que el proceso de producción de glucosa-1-fosfato desde galactosa, es muy lento y obliga a forzar FosOx para cubrir las demandas energéticas celulares.

Se procedió a sustituir la glucosa que se encontraba a una concentración de 5.5 mM por galactosa a 10 mM, en la línea celular MDA-MB-231 por 3 semanas de cultivo. Como podemos observar en la Figura II- 22 se logra un aumento significativo de la respiración basal, Máxima capacidad respiratoria (MCR); Capacidad de reserva (CR); Respiración acoplada (RA). Así como, del ratio OCR/ECAR de las

células que crecieron en medio con galactosa en comparación con las que crecieron en glucosa.

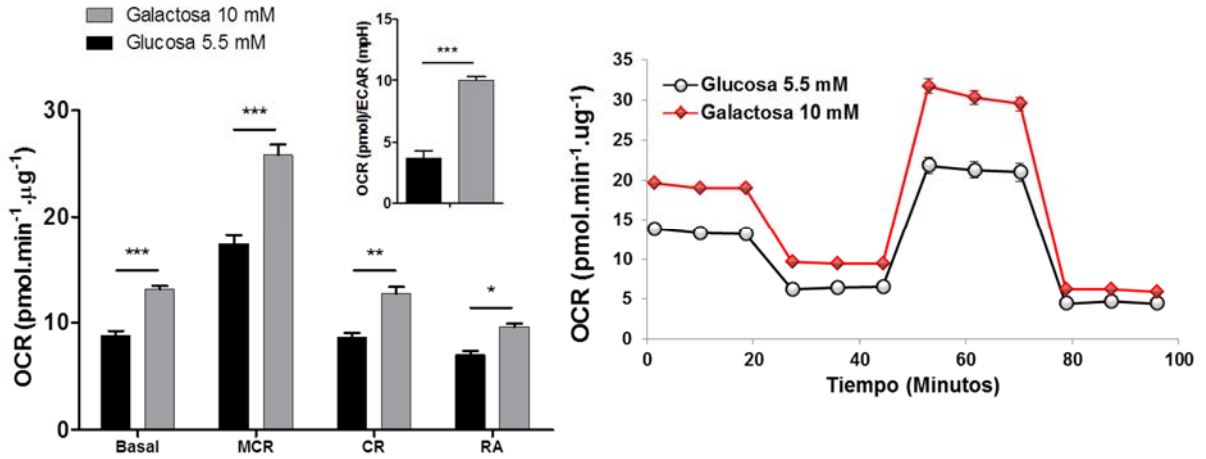


Figura II- 22 Aumento de la respiración celular en la línea celular MDA-MB-231 al sustituir la glucosa por galactosa en el medio de cultivo.

Evaluación de la respiración celular al sustituir glucosa a 5.5 mM por galactosa a 10 mM, por medio del XF Cell Mito Stress Test Kit. MCR, Máxima capacidad respiratoria; CR, Capacidad de reserva; RA, Respiración acoplada.

Como podemos observar en la Figura II- 23, debido a la disminución de la respiración celular típica de MDA-MB-231, la tasa de crecimiento celular es menor cuando el medio es suplementado con galactosa, como única fuente de carbono. Lo anterior es estadísticamente significativo a las 72 horas de cultivo celular. Las células tratadas con 2 μ M de Mito-SG1, tanto las que son suplementadas con glucosa, como con galactosa, tienen una inhibición del crecimiento celular en comparación con el control respectivo.

A las 72 horas de cultivo también se puede apreciar que la reducción de la proliferación entre el control vs tratamiento con Mito-SG1 de las células suplementadas con glucosa es del 66% vs un 82% a las células suplementadas con galactosa. También podemos observar que la reducción de la proliferación entre las células tratadas con 2 μ M de Mito-SG1 que crecieron en glucosa vs las que crecieron con galactosa, es estadísticamente significativa desde las 24 horas del cultivo.

Los anteriores resultados nos ratifican la predilección del fenotipo glicolítico de TNBC, y nos indican que las células que son forzadas a depender de la respiración mitocondrial para la producción de ATP son más sensibles a Mito-SG1.

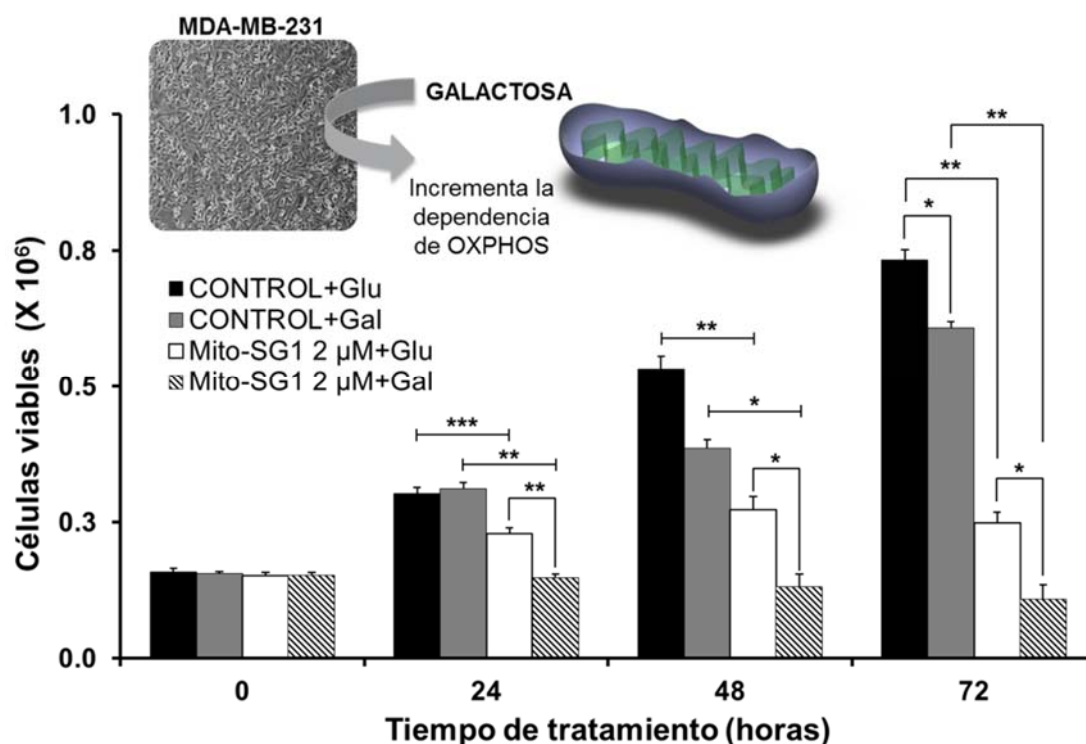


Figura II- 23 Efecto de Mito-SG1 sobre la proliferación celular de la línea celular MDA-MB-231 que ha sido pre-acondicionada a depender de FosOx para la generación de ATP.

La línea celular MDA-MB-231 fue acondicionada por 20 días en un medio de cultivo donde la glucosa fue reemplazada por galactosa a 10mM. Para la evaluación del efecto de Mito-SG1 sobre la proliferación celular en presencia de glucosa (5.5mM) o galactosa (10mM) de la línea celular MDA-MB-231, se procedió a realizar cultivo de 150.000 células por pozo, en placas de 6 pozos, con tratamiento posterior a las 24 horas de cultivo. Se realizó observación manual del número de divisiones de las líneas celulares utilizando la coloración con azul de tripán de las líneas celulares y se compararon los resultados de la línea celular con glucosa vs galactosa. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, de cada una de las concentraciones evaluadas comparadas según lo indicado en la gráfica. $n \geq 3$ de dos experimentos independientes.

2.3.3 Mito-SG1 genera una disminución dosis dependiente del metabolismo mitocondrial.

La medición de la respiración celular es una poderosa herramienta para evaluar el metabolismo energético dado el acoplamiento entre la síntesis de ATP y el consumo de oxígeno durante la FosOx. Para examinar efectivamente la función bioenergética usando el equipo XFe24 Extracellular Flux Analyzer, es esencial primero caracterizar el tipo de línea celular con respecto a su actividad metabólica bajo condiciones basales y bajo condiciones de estudio. Lo primero que se recomienda es determinar la concentración ideal de células por pozo, que pueden ser analizadas manteniendo una correlación lineal entre el número de células y la tasa de consumo de oxígeno. Posteriormente es necesario identificar la menor concentración de FCCP, que me permite una mayor tasa de consumo de oxígeno. Con esta información es posible realizar los experimentos para medir la función respiratoria,

la glicólisis y el uso de fuentes de carbono por parte de las líneas celulares bajo condiciones normales y expuestas a diferentes concentraciones de Mito-SG1.

2.3.3.1 Determinación de las condiciones de estudio de las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7

Se realizó la titulación de las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7 Figura II- 24, para determinar el rango de densidad celular que mantuviera una correlación lineal adecuada para el OCR y ECAR, que permitiera dentro del rango de detección del equipo la comparación entre líneas celulares de los valores de OCR y ECAR. La densidad celular óptima puede variar dependiendo de la línea celular, siendo deseable lograr una confluencia celular entre el 50 al 90%. Dado los resultados obtenidos en la células por pozo. Lo anterior fue correspondiente a lo publicado por Pelicano y, se eligió la densidad celular que no era mayor al 90% de confluencia y que mostraba valores del OCR y del ECAR en un rango lineal. Para MDA-MB-231 y MDA-MB 468, la densidad celular elegida fue de 50.000 células por pozo. Para MCF7, la densidad celular elegida fue de 30.000 células por pozo. Lo anterior fue correspondiente a lo publicado por Pelicano y colaboradores (45).

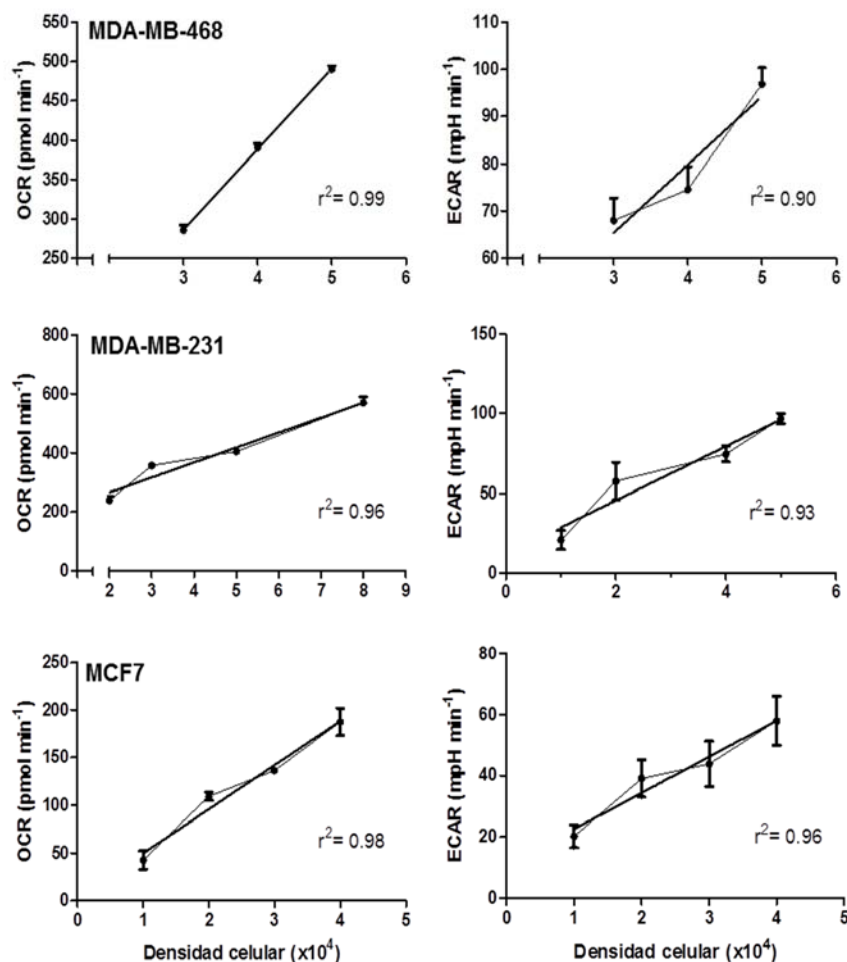


Figura II- 24 Titulación del número de células en microplaca de cultivo XF24 V7.

Las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF7 fueron sembradas a diferentes densidades celulares para determinar el rango de detección lineal del equipo que permitiera la comparación del OCR o ECAR entre diferentes líneas celulares. A la izquierda se encuentra la correlación lineal del OCR que mantuvo un coeficiente de correlación superior a 0.96, y a la derecha, la correlación lineal del ECAR que mantuvo un coeficiente de correlación superior a 0.9. Para todos los experimentos $n=3$.

Dado que los diferentes tipos de líneas celulares varían en la respuesta al desacoplador FCCP, y teniendo presente que una alta dosis de FCCP, reduce la respuesta observada, es necesario determinar empíricamente la dosis de FCCP adecuada para los experimentos a realizar. Por ende, se procedió a titular la concentración de FCCP que permitiera obtener el máximo consumo de oxígeno en cada línea celular, y así determinar las condiciones de los ensayos posteriores. Se utilizó un rango de 0.1 μM a 1.5 μM correspondiente a las concentraciones reportadas en trabajos previos (169, 170).

La concentración recomendada por el proveedor Seahorse Bioscience para oligomicina y antimicina/rotenona es de 1 μM . Como se puede observar en la Figura II- 25, la concentración ideal de trabajo del FCCP es de 0.5 μM en las tres líneas celulares. Al utilizar concentraciones menores, no se obtiene un máximo de consumo de oxígeno, y al utilizar concentraciones mayores, la tasa de consumo de oxígeno se ve afectada.

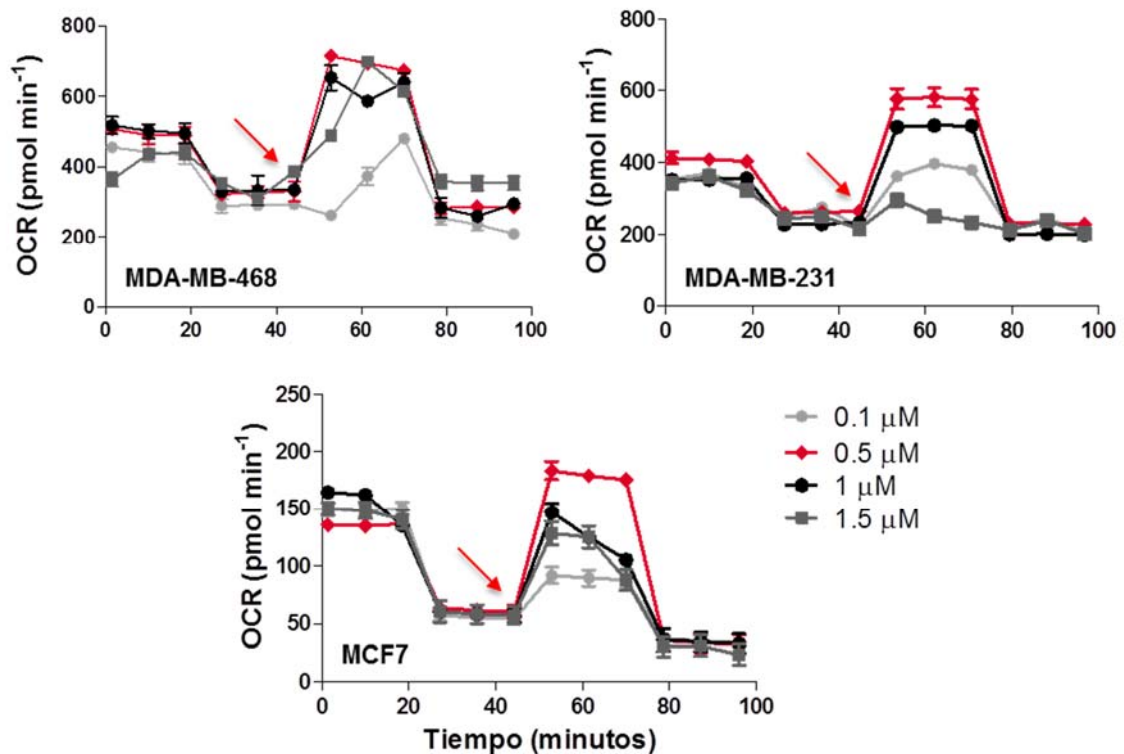


Figura II- 25 Titulación de FCCP en MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF7.

Las líneas celulares MDA-MB-468 y MDA-MB-231 fueron sembradas a 50.000 células por pozo y MCF7 a 30.000 células por pozo. Se utilizó el XF Cell Mito Stress Test Kit para cuantificar la concentración menor de FCCP que permitía el máximo consumo de oxígeno. La flecha roja indica el momento en que se realiza la inyección del FCCP. La concentración graficada en color rojo representa la máxima de OCR obtenida en la titulación del FCCP. Para todos los experimentos n=5.

2.3.3.2 Mito-SG1 genera una disminución dosis dependiente del consumo de oxígeno de las líneas celulares de TNBC, forzando un aumento de la tasa de acidificación extracelular posiblemente a expensas de la glicólisis

Para establecer la concentración mínima del compuesto que genera afectación en la FosOx, así como determinar que el vehículo del compuesto no es el responsable del efecto observado, se realizó una observación del efecto de diferentes concentraciones del compuesto y de la máxima concentración del vehículo, sobre el OCR y el ECAR de las líneas celulares de TNBC MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (Figura II- 26).

Por ende, un día antes del ensayo las líneas celulares de TNBC fueron sembradas en medio de cultivo completo, en microplacas XF V7 del sistema Seahorse Bioscience, así como se dejó en hidratación el cartucho calibrador a 37°C sin CO₂. Posterior a las 24 horas de cultivo, las células fueron lavadas con DMEM libre de rojo de fenol y de NaHCO₃, y suplementado el día de uso, con las mismas concentraciones de glucosa, L-glutamina y piruvato del medio completo y ajustado el pH a 7.35 +/- 0.05 con NaOH, en condiciones de temperatura de 37°C +/- 0.5.

Para las células son incubadas durante 1 hora a 37°C sin CO₂, mientras se carga el puerto A del cartucho calibrador con concentraciones seriadas de Mito-SG1. El puerto A debe tener una concentración 8X de la concentración final deseada en el pozo, por ende, las concentraciones utilizadas de Mito-SG1 fueron: 2.4, 8, 24, 80 y 240 µM, correspondientes a concentraciones finales en el pozo de: 0.3, 1, 3, 10, 30 µM. Dado que la solución stock de Mito-SG1 se encuentra a 20 mM al 100% de DMSO, se realizó el cálculo para determinar la máxima concentración de DMSO presente en el ensayo que correspondió al 0.15%. Por ende, se procedió a cargar con 1.2% de DMSO el puerto del cartucho correspondiente a la evaluación del vehículo, cuya concentración final en el pozo quedó al 0.15%.

Como podemos observar en la Figura II- 26, el compuesto Mito-SG1 genera inmediatamente es expuesto a las células TNBC (flecha roja), una disminución dosis dependiente de la tasa de consumo de oxígeno tanto en MDA-MB-468, como en MDA-MB-231. Tal como se muestra en la figura, el control y el vehículo no presentan afectación del OCR, demostrando que los efectos evidenciados de Mito-SG1 son debidos efectivamente por el compuesto y no por el vehículo. Mito-SG1 a 1 µM logra una reducción de la tasa de consumo de oxígeno en MDA-MB-231 y MDA-MB-468 del 27 al 35% a las 3 horas de exposición respectivamente, mientras que a concentraciones de 30 µM se logra una reducción del 55 al 60% del OCR inmediatamente posterior a la inyección del compuesto.

A la hora de exposición se logra una reducción del 42 al 50% del OCR a una concentración de 3 µM de Mito-SG1 en MDA-MB-231 y MDA-MB-468 respectivamente.

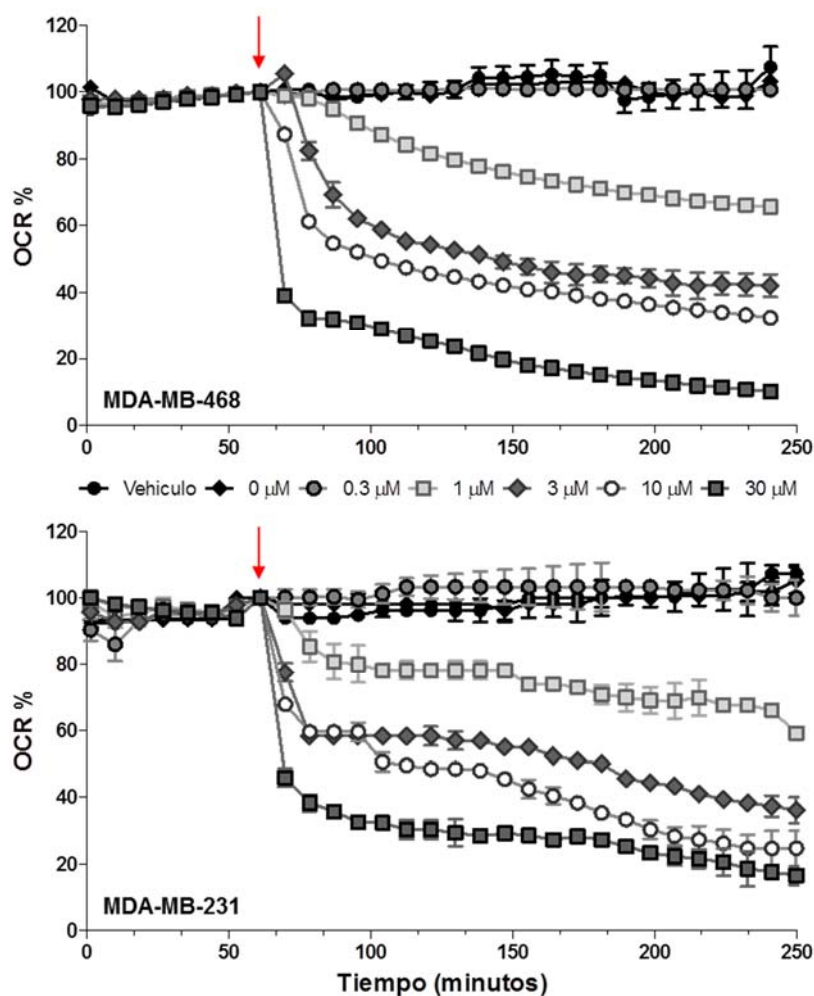


Figura II- 26 Mito-SG1 genera una disminución dosis dependiente de la tasa de consumo de oxígeno en TNBC.

Las líneas celulares MDA-MB-468 y MDA-MB-231 fueron sembradas a 50.000 células por pozo. La determinación del consumo de oxígeno se realizó en un analizador XFe24 Seahorse Bioscience por 250 minutos. La flecha roja indica el momento en que se realiza la inyección de Mito-SG1. Para todos los experimentos n=3.

Al calcular el IC₅₀ del OCR, es decir, la concentración de Mito-SG1 que logra una disminución del 50% del OCR en las líneas celulares, se observó que a mayor tiempo de exposición, la concentración que logra la disminución del 50% del OCR es menor, es decir, que Mito-SG1 logra una disminución dosis-tiempo dependiente del OCR (Figura II- 27). EL IC₅₀ a la media hora posterior a la inyección del compuesto es de 9.8 y 10.67 μM, para MDA-MB-468 y MDA-MB-231 respectivamente, pasadas 3 horas de exposición al compuesto el IC₅₀ disminuye a 2.80 y 2.42 μM respectivamente. Debido a que los experimentos de apoptosis se realizaron a las 24 horas de actividad del compuesto, y teniendo presente que posterior a las 3 horas de exposición se mantiene constante la afectación del OCR,

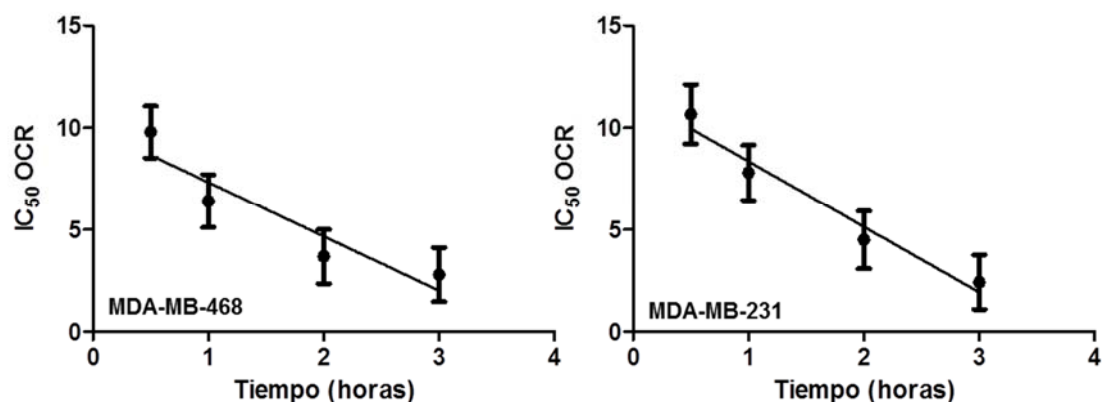


Figura II- 27 Mito-SG1 genera una disminución dosis-tiempo dependiente de la tasa de consumo de oxígeno en TNBC.

La concentración de Mito-SG1 que afecta el 50% del OCR fue calculada a partir de la observación del consumo de oxígeno de las líneas celulares MDA-MB-468 (izquierda) y MDA-MB-231 (derecha), a las 0.5, 1, 2 y 3 horas posteriores a la exposición del compuesto. Se grafica el IC₅₀ +/- ESM.

se determinan las condiciones de estudio para los experimentos de bioenergética mitocondrial con 24 horas de pretratamiento con Mito-SG1.

Con la data obtenida durante las primeras tres horas de la inyección de Mito-SG1 se pudo realizar una representación bi-dimensional de los cambios en los valores de OCR y ECAR en las líneas celulares de TNBC MDA-MB-468 y MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de Mito-SG1 Figura II- 28. Durante las primeras 3 horas de tratamiento se observa una inhibición del OCR y una elevación del ECAR.

Sin embargo, con el tiempo, se observa que las líneas celulares de TNBC no logran mantener la acidificación extracelular. A mayor concentración del compuesto, así como a mayor tiempo de tratamiento, observamos que se mantiene la disminución de la respiración celular, pero se inhibe la glicólisis o se agota las reservas de glucosa para el mantenimiento energético celular.

Bajo estas condiciones, se puede suponer que el incremento de la glicólisis o de la acidificación extracelular, es un mecanismo compensatorio a la afectación de la respiración celular, que no es sostenido en el tiempo o a concentraciones mayores del compuesto.

2.3.3.3 Mito-SG1 genera afectación de la tasa de consumo basal, la máxima capacidad respiratoria, la reserva de la capacidad respiratoria y la respiración acoplada en TNBC y no TNBC a concentraciones micromolares.

Las líneas celulares fueron sembradas en medio completo de cultivo, de acuerdo con los requerimientos nutricionales específicos, y se evaluaron tres

concentraciones de Mito-SG1 (0.1, 0.3 y 1 μM) por 24 horas en incubación a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5%.

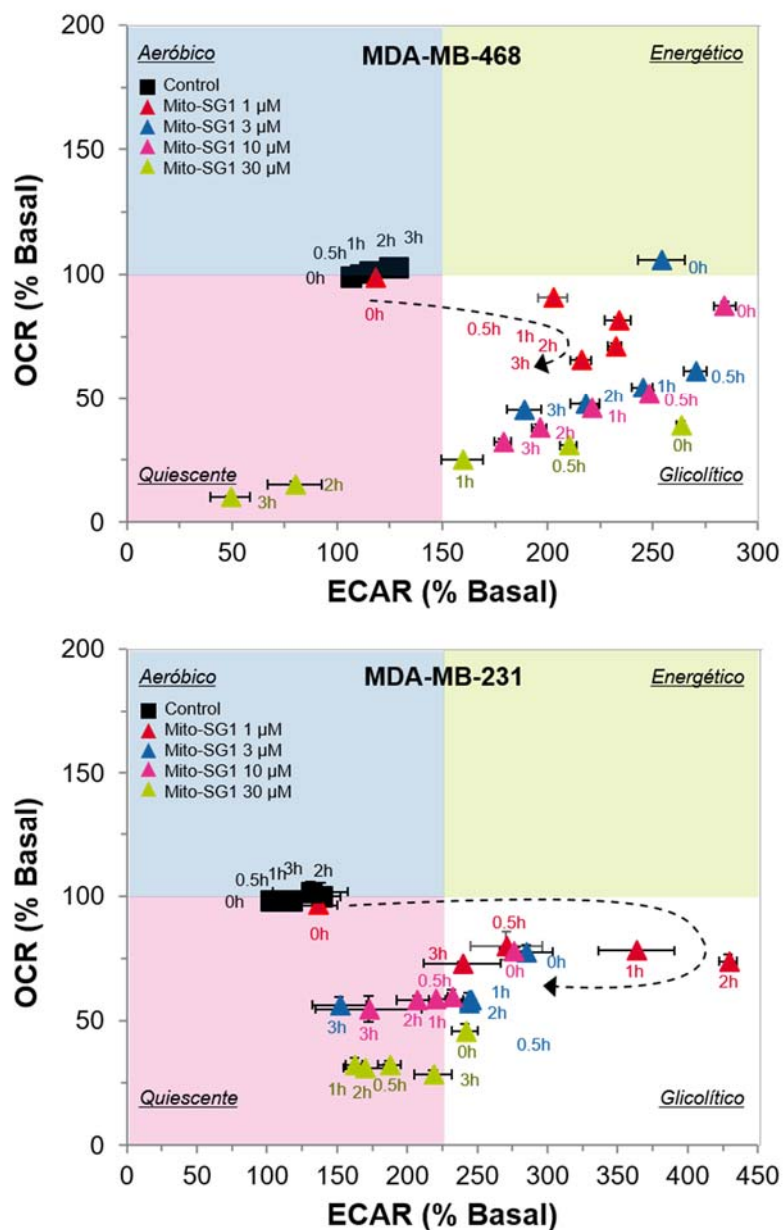


Figura II- 28 Mapa bioenergético bi-dimensional del OCR y el ECAR a diferentes concentraciones de Mito-SG1, durante las primeras 3 horas de la inyección del compuesto.

Se presenta en el eje Y el porcentaje de la media del OCR registrado en el tiempo con relación al último OCR registrado antes de la inyección del compuesto. Se presenta en el eje X el porcentaje de la media del ECAR registrado en el tiempo con relación al último ECAR registrado antes de la inyección del compuesto. Se presentan los resultados de las líneas celulares MDA-MB-468 (arriba) y MDA-MB-231 (abajo), a las 0.5, 1, 2 y 3 horas posteriores a la exposición del compuesto. Se grafica el porcentaje de la media del OCR y ECAR $\pm$ ESM. Para los experimentos n=3.

Para la evaluación de la respiración se utilizó XF Cell Mito Stress Test Kit, permitiendo la evaluación de 6 parámetros claves: respiración basal, máxima capacidad respiratoria, capacidad de reserva respiratoria, fuga de electrones, producción de ATP, y respiración no mitocondrial, por medio del uso de inhibidores específicos tales como, oligomicina A, carbonilo cianuro 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), antimicina A y rotenona Figura II- 29.

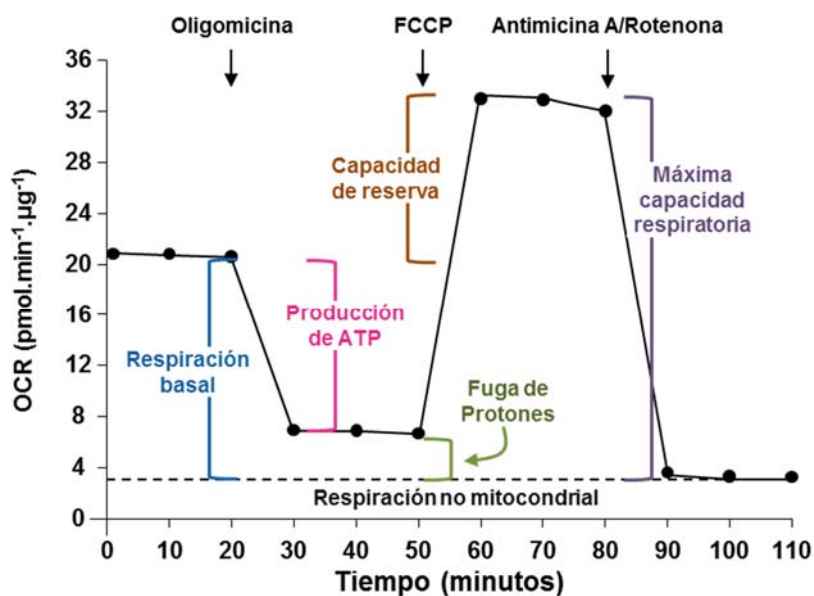


Figura II- 29 Parámetros de la respiración celular evaluados con el XF Cell Mito Stress Test Kit.

Fuente: Tomado y adaptado de Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol.* 2014;547:309-54.

La inyección de oligomicina genera una disminución del consumo de oxígeno, el cual es debido a la inhibición que el compuesto realiza sobre el complejo V de la CTE (ATP sintasa), lo que permite evaluar la respiración mitocondrial que está asociada con la producción de ATP, es decir la respiración acoplada. Posteriormente la inyección con el FCCP desacopla el consumo de oxígeno de la producción de ATP, debido a la formación de un poro de translocación de los protones (protonóforo) del espacio intermembranal, generando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Como resultado, se pierde la inhibición del flujo de electrones a través de la CTE, y el oxígeno es consumido en su máxima capacidad por el complejo IV, lo que se conoce como la máxima capacidad respiratoria.

El OCR estimulado por el FCCP puede ser usado para calcular la capacidad de reserva respiratoria, definida como la diferencia entre la máxima respiración y la respiración basal. Esta capacidad de reserva es la medida de la habilidad de la célula para responder a incrementos en la demanda energética. La tercera inyección es una mezcla de rotenona, un inhibidor del complejo I, y antimicina A, un inhibidor del complejo III. Con esta última inyección se bloquea la respiración

mitocondrial y se permite el cálculo de la respiración no mitocondrial que es liderada por procesos externos a la mitocondria (Tabla II- 4).

Tabla II- 4 Ecuaciones para el cálculo de los parámetros a evaluar de la respiración mitocondrial con XF Cell Mito Stress Test Kit

Parámetro	Ecuación para el cálculo a partir de XF Cell Mito Stress Test Kit
Respiración basal	(Última medida antes de la inyección de oligomicina)- (Respiración no mitocondrial)
Fuga de protones	(Mínima medida después de la inyección de oligomicina)-(Respiración no mitocondrial)
Respiración acoplada	(Última medida antes de la inyección con oligomicina)- (Mínima medida después de la inyección de oligomicina)
Capacidad máxima respiratoria	(Máxima medida después de la inyección de FCCP)- (Respiración no mitocondrial)
Capacidad de reserva	(Capacidad máxima respiratoria)-(Respiración basal)
Respiración no mitocondrial	(Mínima medida después de la inyección de Antimicina A y Rotenona.
Eficiencia de acoplamiento	$100 \times ((\text{Respiración acoplada})/(\text{Respiración basal}))$
Radio Respiración acoplada/capacidad máxima respiratoria	$(\text{respiración acoplada})/(\text{Capacidad máxima respiratoria})$

En la Figura II- 30 se observan los resultados obtenidos de la respiración celular en las líneas celulares evaluadas con el uso de XF Cell Mito Stress Test Kit, posterior a 24 horas de tratamiento con el compuesto Mito-SG1. Es notoria la disminución de la respiración de manera dosis dependiente a la concentración del compuesto utilizado. Podemos observar una disminución del consumo basal de oxígeno, así como una disminución de la máxima capacidad respiratoria a 1 μM de Mito-SG1 (línea roja) en las tres líneas celulares, así como de la capacidad de reserva. En la gráfica también se observa la disminución de la respiración acoplada, por la disminución de la tasa de consumo basal.

Se procede a calcular los parámetros de la respiración celular y determinar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas al ser comparadas con los valores registrados en el control Figura II- 31.

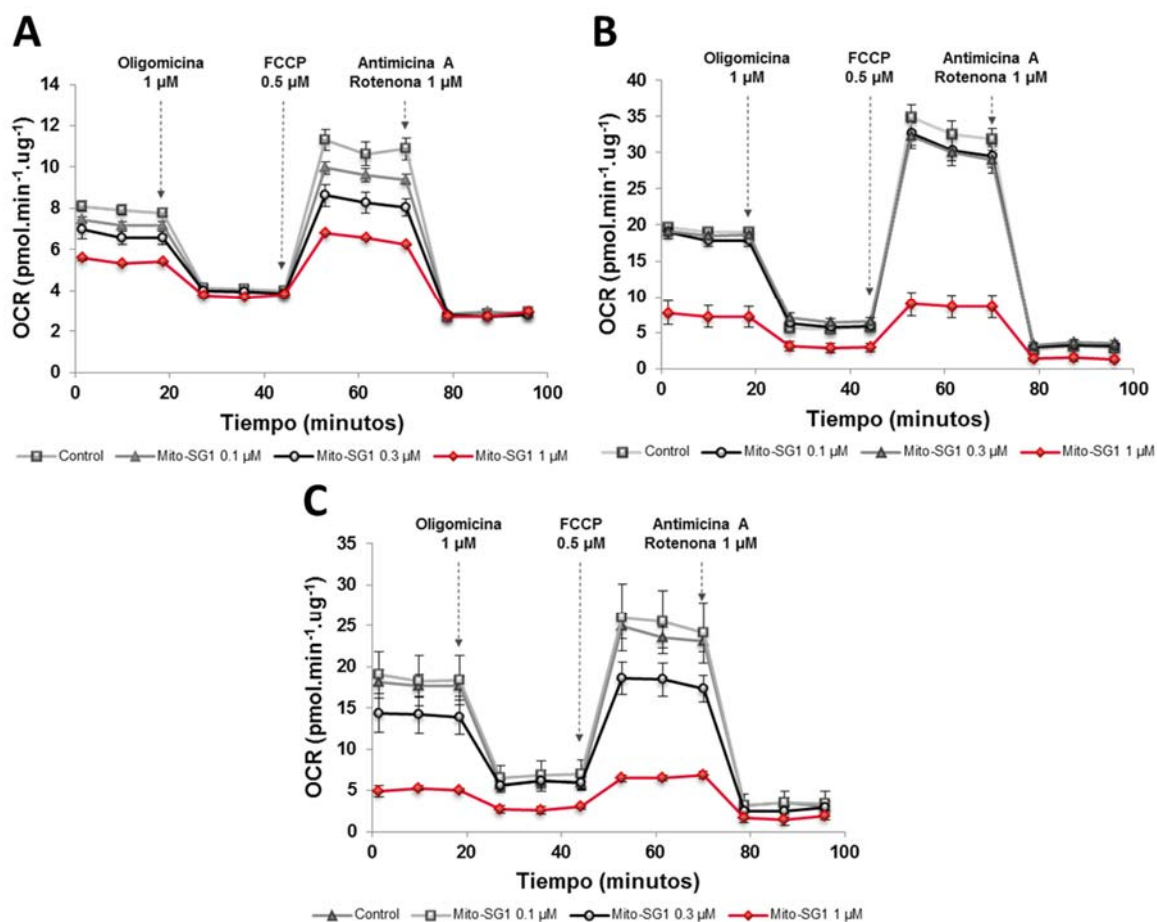


Figura II- 30 Efecto de 24 horas de tratamiento con Mito-SG1 en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7 sobre la tasa de consumo de oxígeno. Evaluada con XF Cell Mito Stress Test Kit.

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto Mito-SG1 por 24 horas, posteriormente fueron lavadas con medio de ensayo XF seahorse, e incubadas 1 hora a 37°C en atmósfera sin CO₂. Se utilizó el XF Cell Mito Stress Test Kit para medir la afectación del compuesto sobre la respiración celular. A) MDA-MB-231, B) MDA-MB-468 y C) MCF7. Se grafica la media del OCR normalizado por concentración de proteínas +/- ESM versus el tiempo. Para los experimentos n=4.

La respiración basal es conocida como la tasa endógena de la respiración, y se encuentra conformada principalmente de dos procesos: la respiración usada para conducir la síntesis de ATP y la respiración asociada a la fuga de protones. En la Figura II- 31A, se puede observar que 1 μM de Mito-SG1 disminuye en más del 50% la respiración basal, a las 24 horas de tratamiento, tanto en las líneas celulares de TNBC, como no TNBC.

Se procede a evaluar el efecto de Mito-SG1 en la fuga de protones y respiración acoplada, observando en la Figura II- 31B y C, que la disminución de la respiración basal se debe en un mayor porcentaje a la disminución de la respiración celular sensible a oligomicina Figura II- 31C, la cual corresponde a la respiración usada para la producción de ATP, conocida también como respiración acoplada.

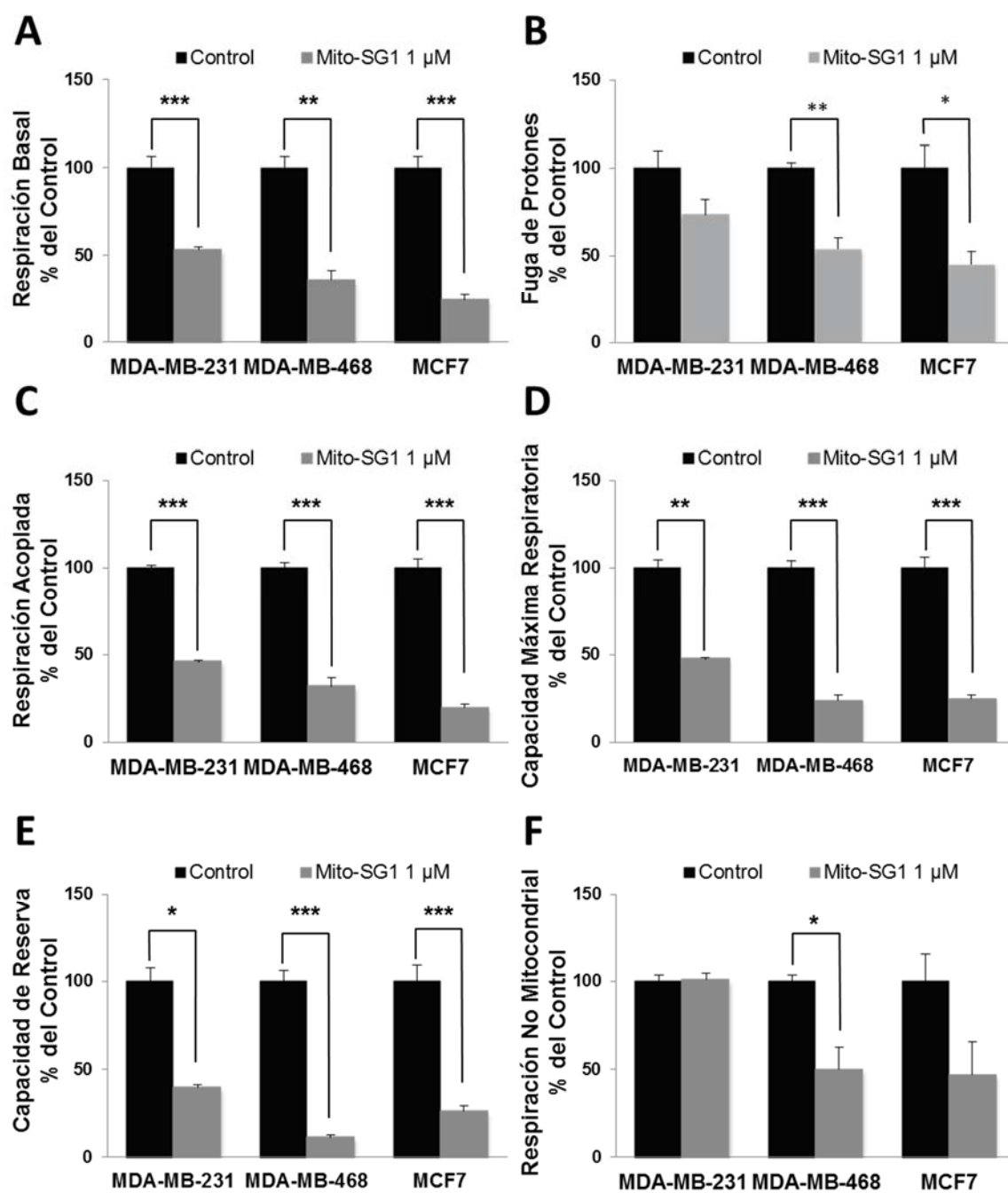


Figura II- 31 Efecto del tratamiento por 24 horas con Mito-SG1 sobre los 6 parámetros principales de la respiración celular de las líneas celulares TNBC y no TNBC.

A) Respiración basal, B) Fuga de protones, C) Respiración acoplada, D) Capacidad máxima respiratoria, E) Capacidad de reserva y F) Respiración no mitocondrial. La data es representada como % del control +/- ESM. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. $n \geq 3$, data representativa de dos experimentos independientes.

La fuerza protón-motriz generada durante la oxidación de los sustratos no es usada exclusivamente para la síntesis de ATP. Algunos protones se fugan a través de la membrana mitocondrial interna, consumiendo constantemente el potencial de membrana, estimulando de esta forma la actividad de la cadena respiratoria para mantenerla. Esta respiración se conoce como desacoplada, y es la razón por la que, la respiración mitocondrial persiste aún en presencia de oligomicina. Como podemos observar en la Figura II- 31B, se observa una disminución en la fuga de protones, en todas las líneas celulares evaluadas, siendo correspondiente a despolarización de la membrana mitocondrial reportada en el ítem 2.3.1.1 de resultados del objetivo 3.

Al evaluar la capacidad máxima respiratoria (CMR), entendida como la máxima medida de consumo de oxígeno detectada en situaciones de demanda energética, observamos que el compuesto Mito-SG1, reduce del 50 al 25% esta capacidad Figura II- 31D. Evaluar la CMR permite establecer el impacto que el compuesto tiene sobre el metabolismo celular. Mito-SG1 limita la respuesta celular ante demanda energética y, por ende, se constituye en un blanco hacia la bioenergética mitocondrial en las células tumorales.

La capacidad de reserva, entendida como la diferencia entre la respiración basal y la CMR, es la capacidad que tiene la célula para producir ATP, la cual no se utiliza hasta que la célula es sometida a un estrés energético, dependiendo también específicamente del tipo de celular. En el caso de la célula tumoral, se esperaría que la CMR así como, la capacidad de reserva, fueran limitadas, es decir, se cree que las células tumorales no utilizan la FosOx debido a que no es funcional. Sin embargo, tal como lo demostramos al cultivar MDA-MB-231 en medio donde la glucosa fue reemplazada por galactosa, las células mantienen una dependencia de la FosOx para cumplir sus demandas energéticas, a pesar, de tener un metabolismo preferiblemente glicolítico. Es por esta razón, que el compuesto Mito-SG1 genera la inhibición del crecimiento celular, debido a que afecta la generación de ATP celular y la glicólisis como mecanismo compensatorio, no es suficiente para abrogar esta disrupción generada. Tal como podemos observar en la Figura II- 31E, Mito-SG1 a concentración de 1 μ M, logra disminuir la capacidad de reserva respiratoria de un 40, 26 y 11%, MDA-MB-231, MCF7 y MDA-MB-468 respectivamente.

Por otra parte, encontramos que la respiración mitocondrial no es uniformemente afectada en las tres líneas celulares, indicándonos que los procesos de respiración no debidos a FosOx, responde de manera diferente en las tres líneas celulares estudiadas Figura II- 31F.

Analizados los 6 parámetros claves de la respiración celular, se procedió a calcular la eficiencia de acoplamiento entendida como la fracción de la respiración basal usada para la síntesis de ATP, y a su vez, verificar los efectos de Mito-SG1 sobre la misma. En la Figura II- 32A, interesantemente se observa que a pesar de haber reducido la respiración acoplada (Figura II- 31) al evaluar la eficiencia del

acoplamiento según la Tabla II- 4, en donde se calcula con base a la respiración basal, no se disminuye la eficiencia del acoplamiento. La disminución real de la respiración sensible a la oligomicina se genera por la reducción de la respiración basal, más que por una afectación de la síntesis de ATP. Al determinar la eficiencia de la respiración acoplada relativa a la MCR, tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas Figura II- 32B.

En conjunto la data anterior evidencia el efecto del compuesto Mito-SG1 sobre la respiración celular, en las líneas celulares TNBC y no TNBC.

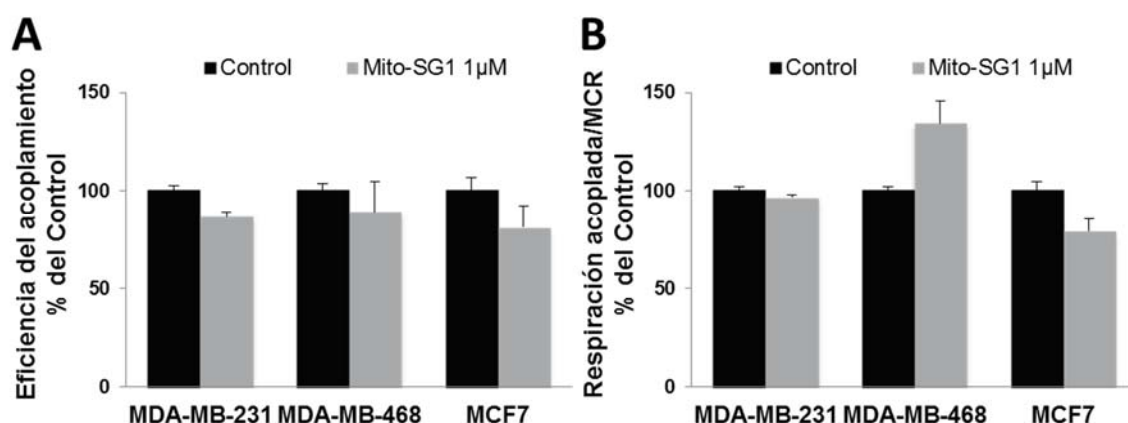


Figura II- 32 Mito-SG1 no afecta significativamente la eficiencia del acoplamiento.

A) Eficiencia del acoplamiento. B) Respiración acoplada/MCR

2.3.4 Mito-SG1 genera un cambio en el fenotipo metabólico de TNBC y afectación del índice bioenergético.

Con el fin de entender los efectos causados por Mito-SG1 en el metabolismo mitocondrial y la bioenergética celular, se determinó el fenotipo energético celular de MDA-MB-231 (Figura II- 33), MDA-MB-468 (Figura II- 34) y MCF7 (Figura II- 35). Estas determinaciones nos permiten conocer la estrategia celular elegida para mantener la demanda energética celular bajo condiciones basales (específicamente en presencia de glucosa, glutamina y piruvato) y de estrés energético (específicamente en presencia de compuestos estresores). Por otra parte, el potencial metabólico, entendido como el porcentaje de incremento del OCR y ECAR bajo estrés celular sobre sus respectivas medidas basales, permiten establecer la competencia celular para aumentar la glicólisis y/o la respiración celular ante demanda energética. Por último, se calculó el impacto del tratamiento de Mito-SG1 sobre el índice bioenergético celular Figura II- 36.

2.3.4.1 El tratamiento con Mito-SG1 deteriora la habilidad de las células de TNBC y no TNBC para responder ante cambios en los requerimientos energéticos celulares

Se presenta a continuación los mapas energéticos celulares de MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7, donde se puede observar el perfil del fenotipo energético celular, el potencial metabólico, así como los perfiles de OCR y ECAR en condiciones basales y de estrés energético. En los fenotipos energéticos de TNBC y no TNBC (Figura II- 33A, Figura II- 34A, Figura II- 35A) se evidencia que en

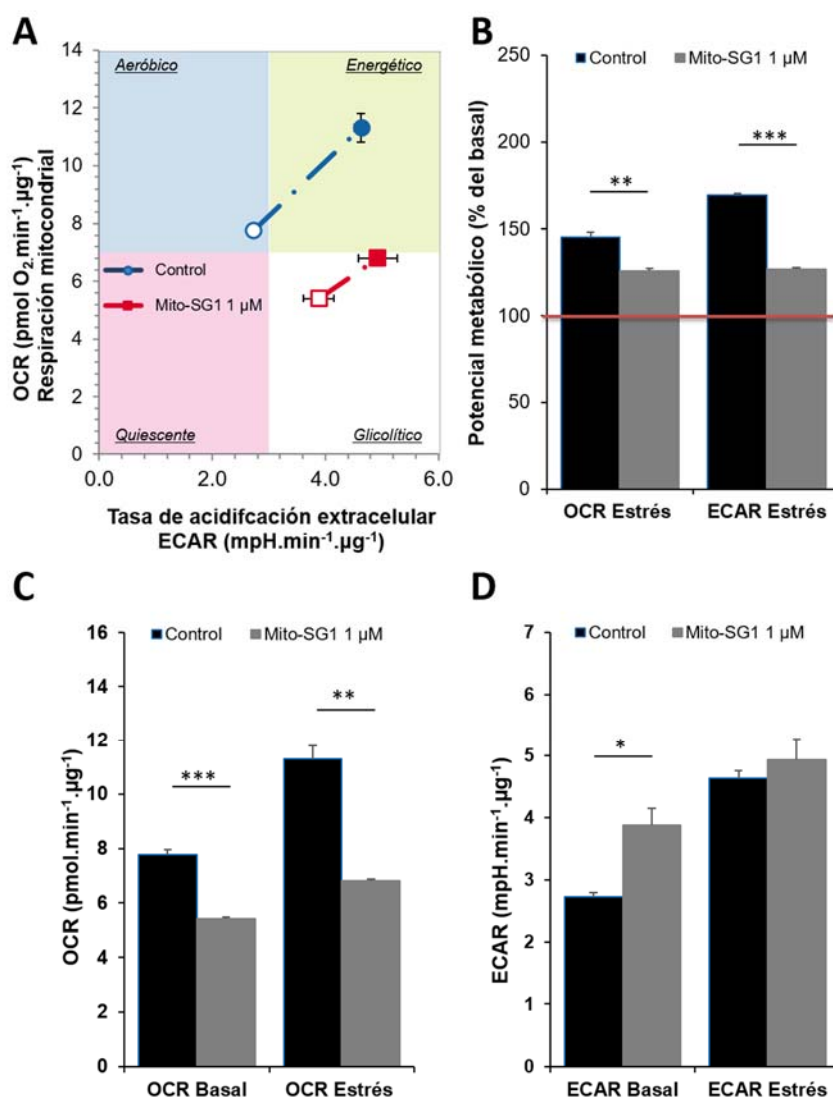


Figura II- 33 Efecto de Mito-SG1 sobre el perfil del fenotipo energético celular de MDA-MB-231.

Versión esquemática del XF Mapa Energético, donde se presentan A) Fenotipo energético celular, donde el marcador abierto representa las condiciones basales, y el marcador cerrado las condiciones bajo demanda energética, B) Potencial metabólico celular, C) Perfil OCR, D) Perfil ECAR. Se grafica la media normalizada por concentración de proteínas +/- ESM. *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$. Para los experimentos $n=4$.

condiciones bajo demanda energética las células dependen principalmente del metabolismo mitocondrial en comparación con su estado basal. Mito-SG1 a una concentración de 1 μ M, drásticamente genera una disrupción mitocondrial afectando la capacidad celular de aumentar su respiración, y conllevando a soportar a través de la glicólisis los requerimientos energéticos celulares.

Para entender como las células intentan adaptarse a situaciones de demanda energética, se calcularon los cambios relativos en el potencial metabólico de las células tratada y no tratadas con Mito-SG1, por medio de la determinación del porcentaje del OCR y ECAR bajo estrés energético según las ecuaciones (II.1) y (II.2).

$$\% \text{ OCR Estrés} = \frac{\text{OCR estrés}}{\text{OCR basal}} \times 100 \quad (\text{II.1})$$

$$\% \text{ ECAR Estrés} = \frac{\text{ECAR estrés}}{\text{ECAR basal}} \times 100 \quad (\text{II.2})$$

En las dos líneas celulares de TNBC se encontró que Mito-SG1 suprime la habilidad celular para responder a los cambios en la demanda energética por inhibición tanto de la respiración mitocondrial como de la glicólisis (Figura II- 33B y Figura II- 34B), pero únicamente inhibe el potencial metabólico glicolítico de la línea celular no TNBC, MCF7 (Figura II- 35B).

Es importante resaltar que estos resultados contribuyen a fortalecer la evidencia de que el mecanismo de toxicidad de Mito-SG1 es direccionado al metabolismo celular y a la bioenergética bajo condiciones de estrés celular.

Al revisar en detalle el metabolismo mitocondrial y glicolítico para establecer la contribución relativa de cada uno, se observó que Mito-SG1 induce inhibición del OCR basal y OCR en estrés energético, afectando el metabolismo mitocondrial en todas las líneas celulares evaluadas (Figura II- 33C, Figura II- 34C y Figura II- 35C). En el caso del metabolismo glicolítico, se observa que en las células no tratadas con Mito-SG1, usualmente reprograman su fenotipo energético, hacia un fenotipo glicolítico para suplir la demanda energética celular. En las células tratadas con Mito-SG1, se observa un intento por soportar el daño causado por el compuesto aumentando la glicólisis (Figura II- 33D, Figura II- 34D y Figura II- 35D), sin embargo, en las líneas celulares de MCF7 y MDA-MB-468, el aumento de la glicólisis no es suficiente para sobreponer la célula del daño ocasionado en la mitocondria (Figura II- 34D y Figura II- 35D).

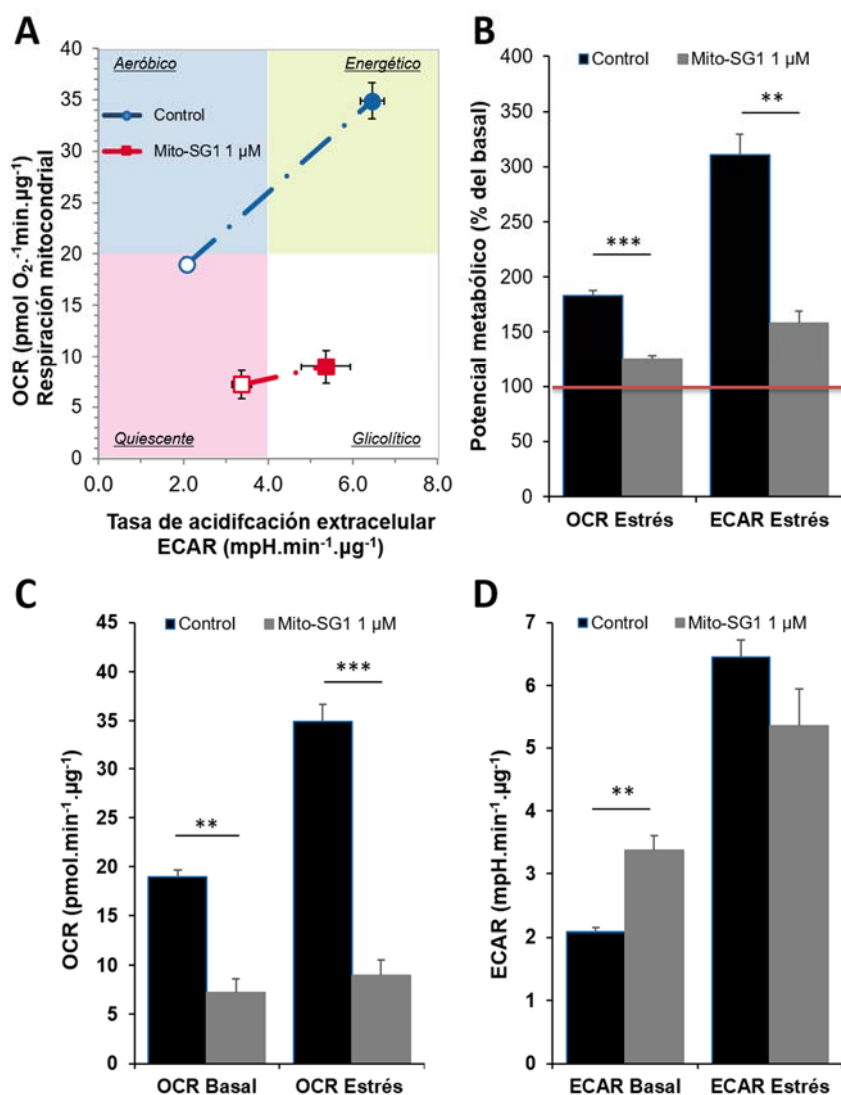


Figura II- 34 Efecto de Mito-SG1 sobre el perfil del fenotipo energético celular de MDA-MB-468.

Versión esquemática del XF Mapa Energético, donde se presentan A) Fenotipo energético celular, donde el marcador abierto representa las condiciones basales, y el marcador cerrado las condiciones bajo demanda energética, B) Potencial metabólico celular, C) Perfil OCR, D) Perfil ECAR. Se grafica la media normalizada por concentración de proteínas +/- ESM. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. Para los experimentos $n=4$.

2.3.4.2 Mito-SG1 induce un efecto dosis dependiente en el índice bioenergético celular de TNBC y no TNBC.

En publicaciones recientes el Dr Victor Darley Usmar describió un nuevo concepto denominado el índice bioenergético IB (171), el cual es una medida dinámica de la respuesta celular al estrés energético que contempla el análisis grupal de las características más relevantes de la función mitocondrial. En los resultados observados hasta ahora, se han realizado determinaciones de parámetros

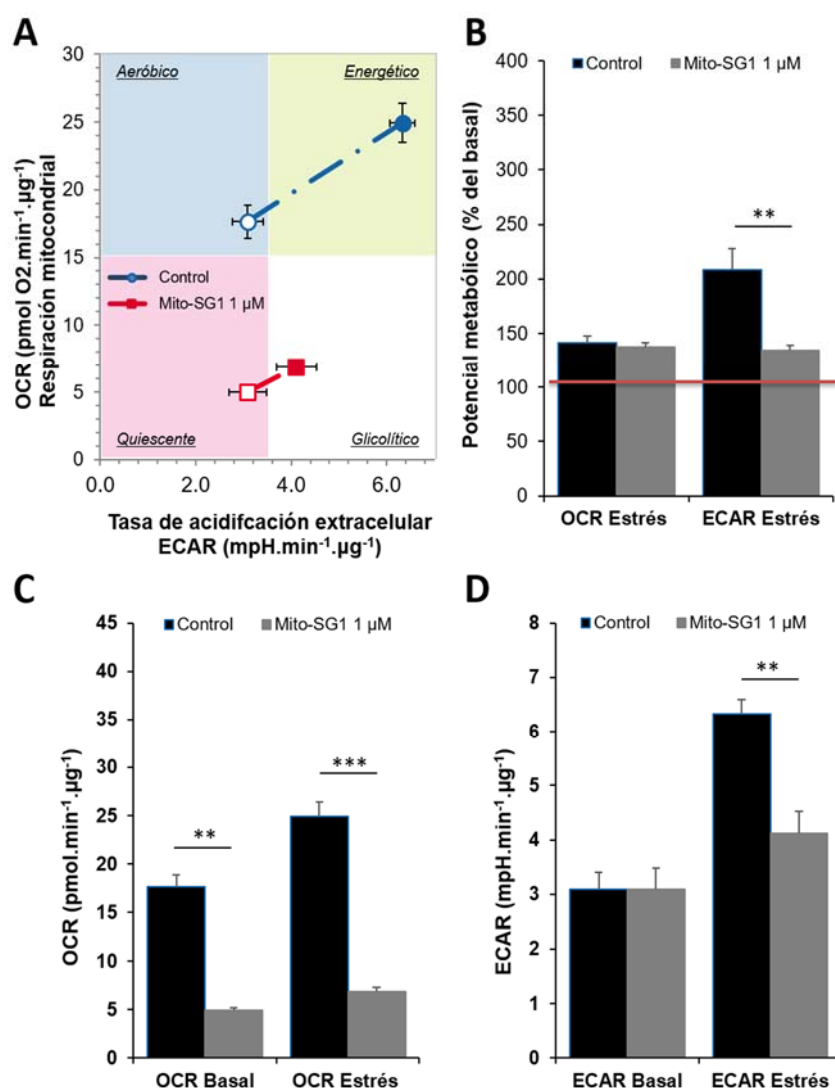


Figura II- 35 Efecto de Mito-SG1 sobre el perfil del fenotipo energético celular de MCF7

Versión esquemática del XF Mapa Energético, donde se presentan A) Fenotipo energético celular, donde el marcador abierto representa las condiciones basales, y el marcador cerrado las condiciones bajo demanda energética, B) Potencial metabólico celular, C) Perfil OCR, D) Perfil ECAR. Se grafica la media normalizada por concentración de proteínas +/- ESM. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. Para los experimentos $n=4$.

específicos basadas en la respuesta celular al estrés energético, sin embargo, cada uno de los parámetros de la respiración celular podrían no tener un aparente disrupción, pero al analizarlos en conjunto y establecer un peso para cada uno en una ecuación, se podrían entender y detectar perturbaciones metabólicas tempranas inducidas por Mito-SG1, no identificables cuando se analizan de forma individual estos parámetros.

Según la propuesta del Dr Usmar, un bajo índice energético está asociado con baja capacidad de reserva, así como, de respiración acoplada, con un aumento de la

respiración no mitocondrial y la fuga de protones. Esta propuesta se resume en la ecuación (II.3), donde se aprecian aspectos positivos de la función bioenergética (capacidad de reserva y respiración acoplada), que contrastan con los aspectos potencialmente deletéreos (respiración no mitocondrial y fuga de protones).

$$IB = \log \frac{(Capacidad\ de\ reserva)^a \times (Respiración\ acoplada)^b}{(Respiración\ no\ mitocondrial)^c \times (Fuga\ de\ protones)^d} \quad (II.3)$$

El primer término en el numerador es la capacidad de reserva. Cuanto mayor sea la capacidad de reserva, más efectivamente pueden las mitocondrias satisfacer tanto las necesidades de ATP celular, como los aumentos en la demanda energética, y estrés iónico o metabólico.

El segundo término en el numerador es la respiración acoplada, como la medida de la capacidad de la célula para satisfacer las demandas energéticas. En el denominador, tenemos la fuga de protones, la cual disminuye la eficiencia mitocondrial con respecto a la generación de ATP, siendo entonces un término negativo.

El último término del denominador es la respiración no mitocondrial. Dependiendo del objetivo del cálculo del IB, del tipo celular, y del conocimiento del comportamiento energético celular, esta fórmula se puede adaptar y asignar a los exponentes a, b, c y d, una ponderación generando que un término tenga un peso mayor sobre la ecuación. Para este análisis, se ha asignado para cada exponente el valor numérico de 1.

El objetivo del cálculo del índice bioenergético en este trabajo es la comparación de los IB's generados por la exposición a Mito-SG1 versus el grupo control. En general, los defectos en la cadena transportadora de electrones generan una disminución en el IB debido a la baja capacidad de reserva, disminución de la respiración acoplada o incremento de la respiración no acoplada.

Se evidencia gracias al cálculo del IB, tempranas disrupciones del metabolismo mitocondrial no detectadas cuando dichos parámetros son analizados individualmente. Mito-SG1 a concentraciones de 0.1 y 0.3 μ M, afectan el metabolismo mitocondrial en MDA-MB-468 y MDA-MB-231 respectivamente (Figura II- 36A y B), en comparación con la dosis de 1 μ M que logra diferencias significativas al evaluar la tasa de consumo basal, la máxima capacidad respiratoria, la reserva de la capacidad respiratoria y la respiración acoplada, como parámetros de análisis individuales.

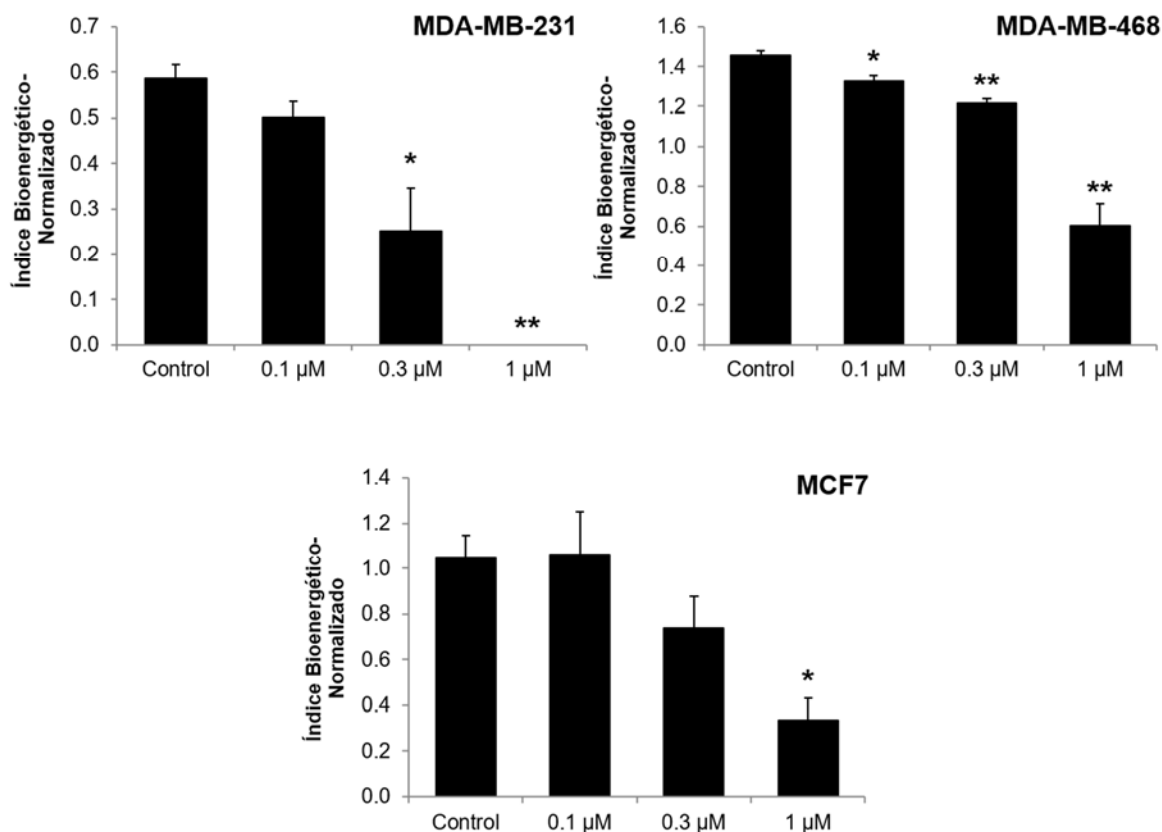


Figura II- 36 Mito-SG1 inhibe de forma dosis dependiente el índice bioenergético celular.

El índice bioenergético fue calculado a partir de la data obtenida en la evaluación de la respiración celular. N=3, donde *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

2.3.5 Glicólisis como mecanismo compensatorio de la disfunción mitocondrial ocasionada por Mito-SG1 en las líneas celulares de TNBC y no TNBC.

La glicólisis es de vital importancia en el metabolismo de las células tumorales, al igual que en células normales en estado proliferante, los intermediarios glicolíticos son requeridos para la biosíntesis de nucleótidos, lípidos y amino ácidos. Unas décadas atrás, se pensó que el aumento de la glicólisis se debía a un mecanismo energético compensatorio a una disfunción mitocondrial, lo cual fue puesto en duda debido a que se demostró que solo casos específicos de células tumorales tienen realmente una afectación en la respiración celular. En este estudio, demostramos que cuando la línea celular MDA-MB-231 era cultivada en medio sin glucosa y suplementado con galactosa, la mitocondria respondía a la demanda energética aumentando su máxima capacidad respiratoria, sin embargo, a expensas de una disminución en la proliferación Figura II- 23. Debido a que Mito-SG1 genera una disfunción mitocondrial, así como aumento de la tasa de acidificación extracelular,

se podría suponer que la glicólisis podría ser un mecanismo compensatorio al déficit energético ocasionado por Mito-SG1.

Con el objeto de evaluar los efectos de Mito-SG1 en la glicólisis, se procedió a utilizar el XF Cell Glycolysis Stress Test Kit de Seahorse Bioscience, la función glicolítica en las células, se determina por la medición directa del ECAR. Este kit provee un método estándar para evaluar parámetros claves en el flujo glicolítico tales como: glicólisis, capacidad glicolítica, reserva glicolítica, así como, acidificación no glicolítica Figura II- 37.

Las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF7, fueron sembradas en medio completo de cultivo, de acuerdo con los requerimientos nutricionales específicos, posteriormente se adicionaron tres concentraciones de Mito-SG1 (0.1, 0.3 y 1 μ M) por 24 horas en incubación a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5%. Para iniciar el ensayo, las células son lavadas con medio de DMEM libre de glucosa y piruvato, y se dejan en incubación sin CO₂ por 1 hora. Los puertos del cartucho calibrador son cargados con glucosa 10mM, Oligomicina 1 μ M, y 2DG de 50 mM a 100 mM (dependiendo de la línea celular).

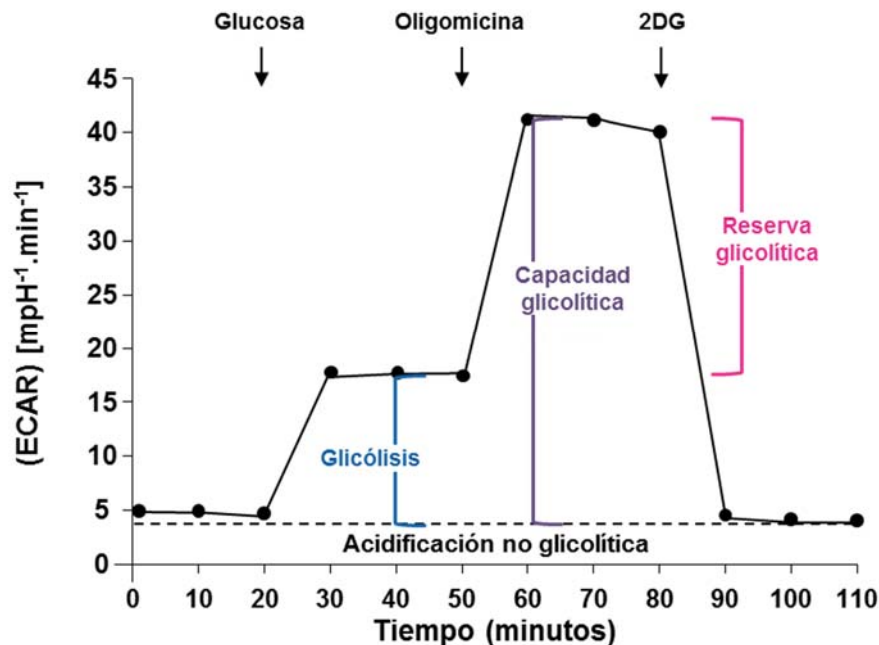


Figura II- 37 Parámetros de la glicólisis, evaluados con el XF Cell Glycolysis Stress Test.

Fuente: Tomado y adaptado de Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol.* 2014;547:309-54.

La Figura II- 38 muestra la tasa de acidificación glicolítica determinada en cada uno de los tratamientos con glucosa, oligomicina y 2 deoxi-glucosa para las células control y las células tratadas con diferentes concentraciones de Mito-SG1. Al lado izquierdo de la figura podemos observar la tasa de acidificación extracelular versus

el tiempo, y al lado derecho de la figura se presentan los parámetros claves de la glicólisis, cuyo cálculo se detalla en la Tabla II- 5.

Tabla II- 5 Ecuaciones para el cálculo de los parámetros a evaluar de la glicólisis con XF Cell Glycolysis Stress Test

Parámetro	Ecuación para el cálculo a partir de XF Cell Glycolysis Stress Test
Glicólisis	(Máxima medida antes de la inyección con oligomicina)-(la última medida antes de la inyección de glucosa)
Capacidad glicolítica	(Máxima medida después de la inyección con oligomicina)-(Última medida antes de la inyección de glucosa)
Reserva glicolítica	(Capacidad glicolítica)-(glicólisis)
Acidificación no glicolítica	Última medida antes de la inyección de glucosa

Tal como lo habíamos observado en el análisis de la respiración celular, Mito-SG1 genera un aumento de la ECAR a una concentración de 1 μM , tanto en las líneas celulares de TNBC, como en no TNBC. La glicólisis se ve aumentada de forma dosis dependiente según la concentración de Mito-SG1 usada.

En el caso de MDA-MB-231 se observa una disminución dosis dependiente de la capacidad glicolítica y de la reserva glicolítica, siendo estadísticamente significativa a concentraciones de 0.3 y 1 μM respectivamente. En el caso de la línea celular MDA-MB-468, se observa una diferencia estadísticamente significativa en la función glicolítica desde concentraciones de 0.3 μM , logrando doblar la glicólisis a una concentración de 1 μM de Mito-SG1. La reserva glicolítica se ve disminuida al igual que, en los resultados presentados de la línea celular MDA-MB-231. En la línea celular MCF7, ocurre un efecto opuesto en la capacidad glicolítica, la cual aumenta de forma dosis dependiente de Mito-SG1 y es estadísticamente significativa para de 0.3 y 1 μM de mito-SG1. La afectación en la reserva glicolítica es similar a la observada para las líneas celulares de TNBC.

Procedimos a realizar una evaluación del ratio OCR/ECAR basal Figura II- 39, bajo exposición a 10mM de glucosa; posterior a la inyección de oligomicina; y posterior a la inyección de 2DG. Según lo que esperábamos, la exposición a 1 μM de Mito-SG1 en condiciones basales y en medio sin glucosa y piruvato, presenta una disminución del OCR en comparación con el control, y no se observa aumento de la ECAR, debido a la ausencia de glucosa y piruvato en el medio.

Al inyectar 10 mM de glucosa, se observa un incremento en la glicólisis, más notorio en las células tratadas con Mito-SG1 que en las células control. Es de resaltar que una vez las células son expuestas a oligomicina, tanto el control como las células tratadas con Mito-SG1 disminuyen el OCR y aumentan aún más la glicólisis. El comportamiento del control nos demuestra, que al inhibir la respiración celular las

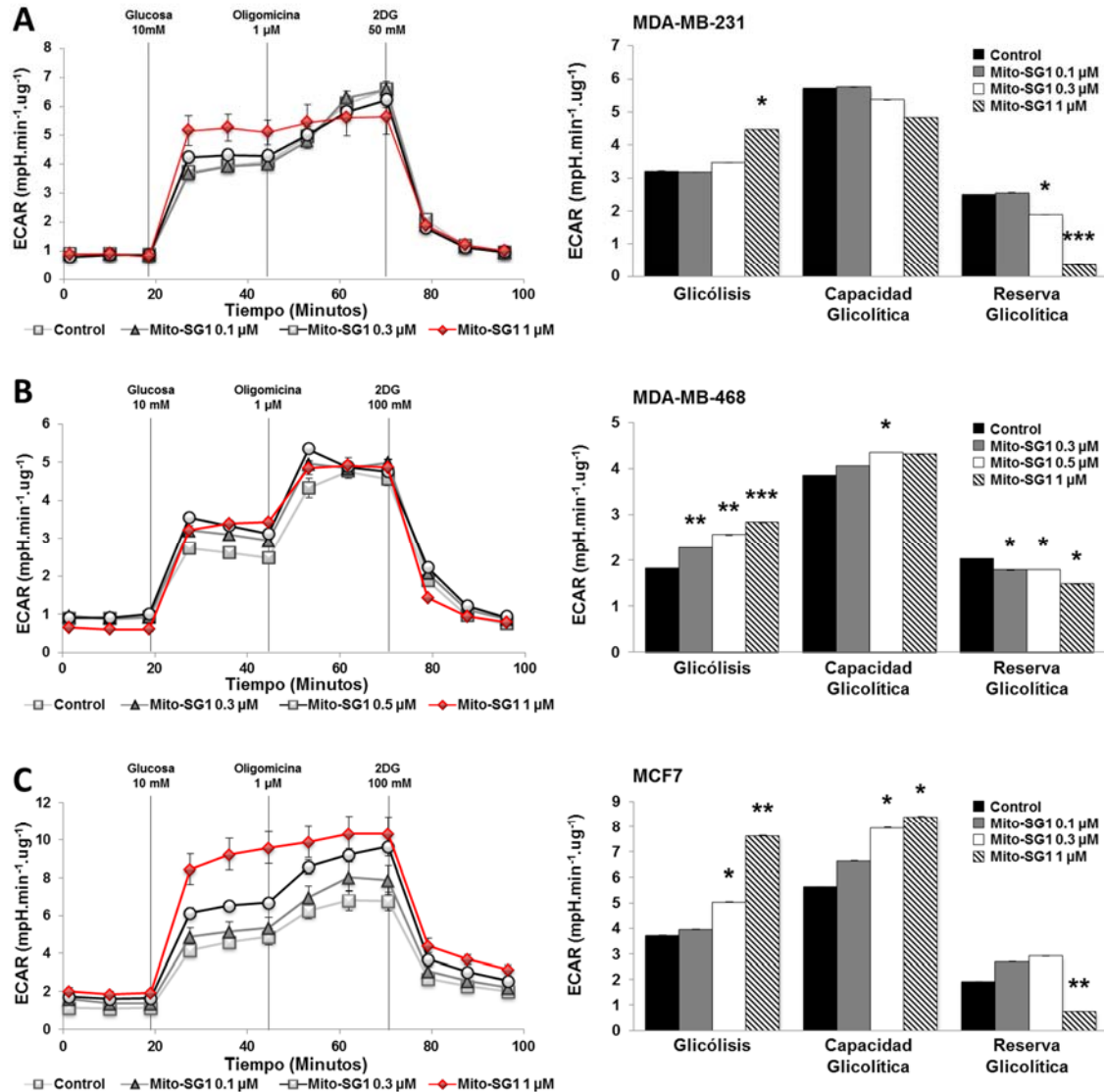


Figura II- 38 Efecto de 24 horas de tratamiento con Mito-SG1 en la función glicolítica de las líneas celulares TNBC y no TNBC.

La línea celular MDA-MB-231 (A), MDA-MB-468 (B) y MCF7 (C) fueron tratada por 24 horas con diferentes concentraciones de Mito-SG1. Se utilizó el XF Cell Glycolysis Stress Test para evaluar la función glicolítica, capacidad glicolítica y reserva glicolítica de las células control versus diferentes concentraciones de Mito-SG1. A la derecha se observa el comportamiento en la tasa de acidificación extracelular versus el tiempo, donde las líneas continuas representan las inyecciones de glucosa, oligomicina y 2DG. A la izquierda se presenta la media normalizada por concentración de proteínas +/- ESM de cada una de las características evaluadas. Para los experimentos $n \geq 3$. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

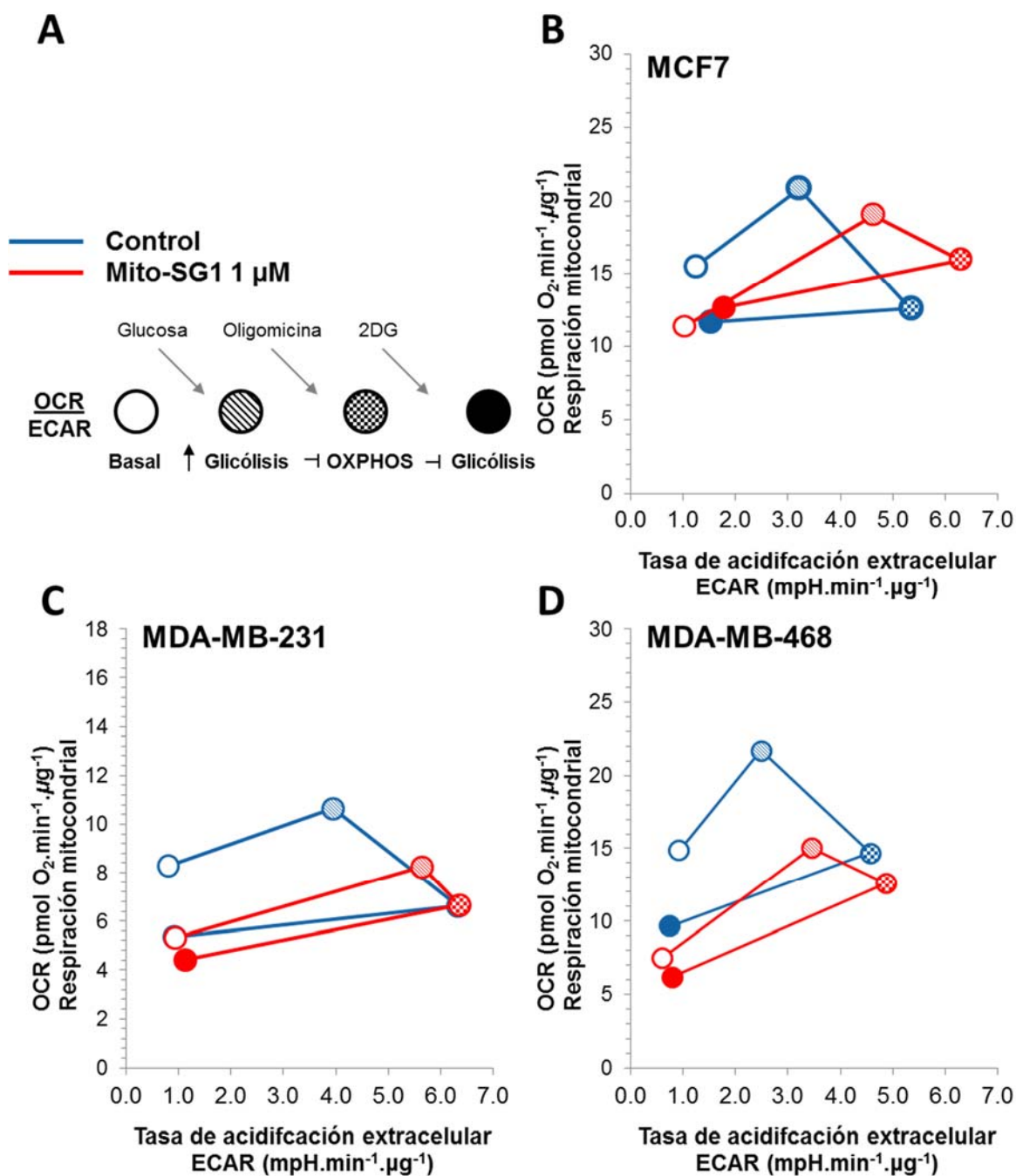


Figura II- 39 Comportamiento del ratio OCR/ECAR durante la evaluación de la glicólisis.

Representación bidimensional del ratio OCR/ECAR durante las distintas etapas del XF Cell Glycolysis Stress Test. A) Esquema de diagramación, donde cada punto representa el estadio basal, aumento de la glicólisis por la inyección de glucosa; inhibición de la fosforilación oxidativa (FosOx) debida a la inyección con oligomicina, y por último, la inhibición de la glicólisis por el uso de 2DG. Se grafican las líneas celulares MCF7 (B), MDA-MB-231 (C) y en MDA-MB-468 (D).

células utilizan la glicólisis como mecanismo compensatorio, ante el déficit de respiración celular prácticamente generando un mismo ratio OCR/ECAR que las

células tratadas con Mito-SG1. Al inhibir la glicólisis con 2DG, y debido a que la respiración celular estaba inhibida con oligomicina, las células retornan a su radio OCR/ECAR basal, con la diferencia que el control presenta un OCR similar al presentado por las células previamente tratadas con Mito-SG1 en su estado basal.

Lo anterior nos ratifica que Mito-SG1 inhibe la respiración celular y estimula el uso de la glicólisis para soportar la demanda energética, sin embargo, como lo podemos observar en la Figura II- 38, la reserva glicolítica no es suficiente para contra-restar los efectos citotóxicos ocasionados por el compuesto conllevando la activación de la apoptosis y muerte celular (Figura II- 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13 y 14).

2.3.6 Evaluación de la distribución del uso de las principales fuentes de carbono, bajo el tratamiento con Mito-SG1.

Para la evaluación de cómo se redistribuyen las principales fuentes de carbono bajo el tratamiento con Mito-SG1, se utilizó el XF Mito Fuel Flex Test Kit. La mayor cantidad de energía producida por las células es derivada a partir de tres combustibles o fuentes de carbono: glucosa, glutamina y ácidos grasos. La dependencia y flexibilidad para usar cada una de estas fuentes de carbono, se puede evaluar al medir la disminución en el OCR por la inhibición de cada fuente. Es relevante determinar si la disminución en la respiración celular debida al tratamiento con Mito-SG1, se correlaciona con la disminución o aumento de la dependencia de una fuente de carbono específica, o a una afectación directa sobre los complejos mitocondriales. En este proyecto se evaluó la afectación del tratamiento de Mito-SG1 sobre la dependencia, capacidad y flexibilidad de glucosa, glutamina y ácidos grasos; sin embargo, no se determinó el efecto de Mito-SG1 sobre los complejos mitocondriales, por temas presupuestales.

Se procedió a evaluar las dos líneas celulares de TNBC MDA-MB-231 (Figura II- 40) y MDA-MB-468 (Figura II- 41), debido a la disponibilidad de los recursos no fue viable realizar este ensayo en la línea celular de MCF7. La densidad celular utilizada para MDA-MB-231 y MDA-MB-468 fue de 50.000 células por pozo, cultivo por 24 horas con y sin tratamiento de Mito-SG1 a 1 μ M.

Los tres inhibidores utilizados fueron: UK5099, BPTES y Etomoxir. El UK5099 es un inhibidor de la vía de oxidación de la glucosa, dado que bloquea el transportador del piruvato a la mitocondria; El BPTES, es un inhibidor de la oxidación de la glutamina, dado que actúa como inhibidor alostérico de la glutaminasa 1, impidiendo que la glutamina se convierta en glutamato, el cual a su vez es convertido a alfa-keto-glutarato, y de esta forma pueda ingresar al ciclo de ácido tricarboxílico; el Etomoxir, es un inhibidor de la vía de oxidación de los ácidos grasos de larga cadena, dado que inhibe la palmitoil-carnitina transferasa 1A, la cual es clave para la translocación de los ácidos grasos de larga cadena desde el citosol a la mitocondria para la beta-oxidación.

Se presenta en la Figura II- 40 los resultados de la evaluación de las principales fuentes de carbono en MDA-MB-231. En las células sin tratamiento se puede afirmar que existe una mayor dependencia de la glucosa (39%) y de los ácidos grasos (36%), para mantener la respiración celular y, por ende, la producción de ATP, en comparación con la dependencia observada de glutamina (6%). La flexibilidad para aumentar la oxidación de los ácidos grasos (63%) y de la glutamina

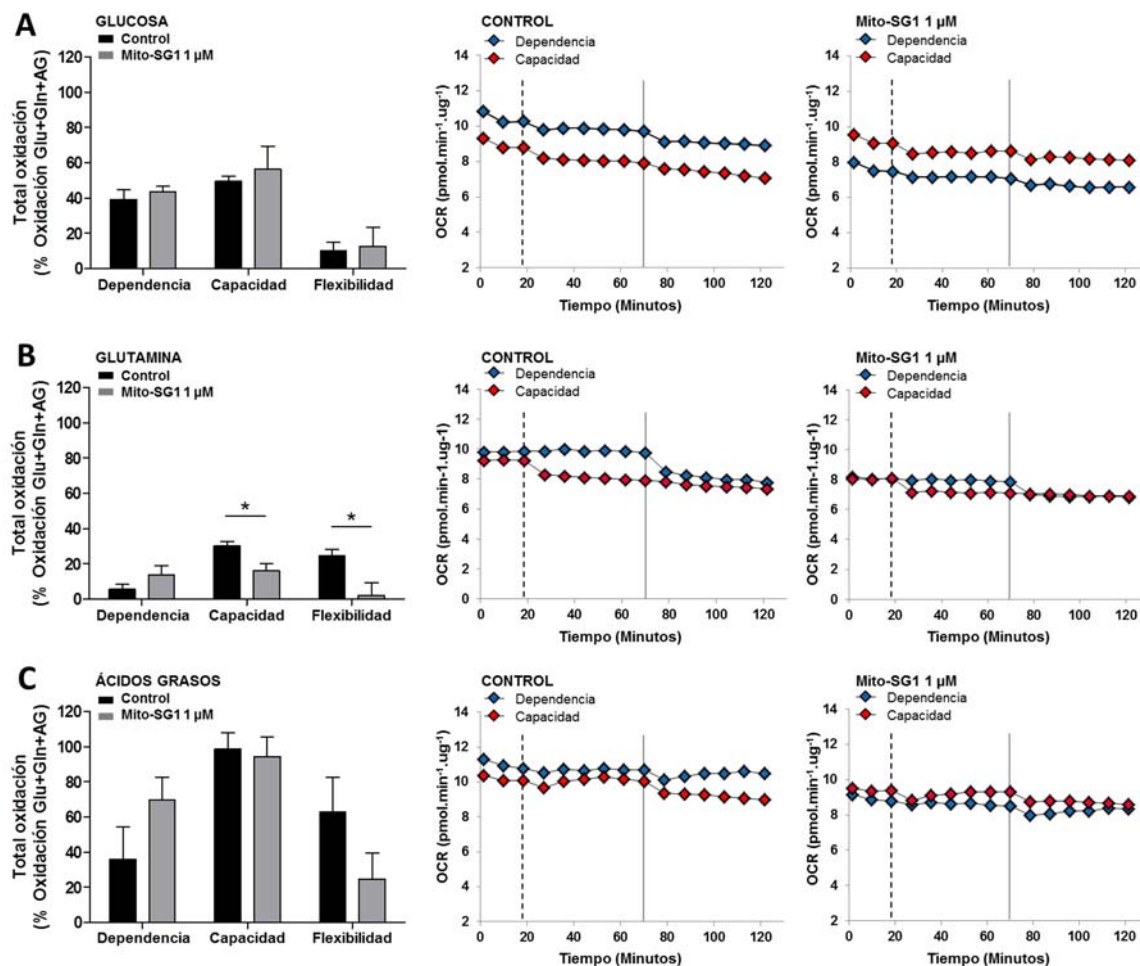


Figura II- 40 Efecto de 24 horas de tratamiento con Mito-SG1 en la contribución a la tasa de consumo de oxígeno de las principales fuentes de carbono en la línea celular MDA-MB-231.

La línea celular MDA-MB-231 fue tratada a una concentración de 1 μM de Mito-SG1 por 24 horas. Se utilizó el XF Mito Fuel Flex Test para evaluar la contribución en el mantenimiento de la tasa de consumo de oxígeno, de la oxidación de las principales fuentes de carbono: glucosa (A), glutamina (B) y ácidos grasos (C). En la primera fila se observa la cuantificación de la dependencia, capacidad y flexibilidad de las células de acuerdo con el tipo de fuente de carbono evaluada, a partir del comportamiento en el consumo de oxígeno a medida que se inyectaban los correspondientes inhibidores. En la segunda y tercera fila, se observa el comportamiento en la tasa de consumo de oxígeno de las células control y las tratadas con Mito-SG1, versus el tiempo; donde las líneas discontinuas y continuas, representan la primera y segunda inyección de los inhibidores respectivamente. Para la determinación de la dependencia, la primera inyección corresponde a la inhibición de la vía que se evalúa, y la segunda inyección corresponde a la inhibición de las dos vías no evaluadas. Se presenta la media normalizada por concentración de proteínas +/- ESM. Para los experimentos n≥4. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

(25%), es mayor que, la observada con glucosa (10%). Adicionalmente, estas células presentan una mayor capacidad para sostener la respiración celular con la oxidación de ácidos grasos (99%), que la presentada por la glucosa (50%) y la glutamina (30%). Es de resaltar, que el tratamiento con Mito-SG1 no afecta de forma significativa la dependencia, capacidad y flexibilidad del uso de glucosa (Figura II-40A) y ácidos grasos (Figura II-40C), como fuentes de carbono para la respiración

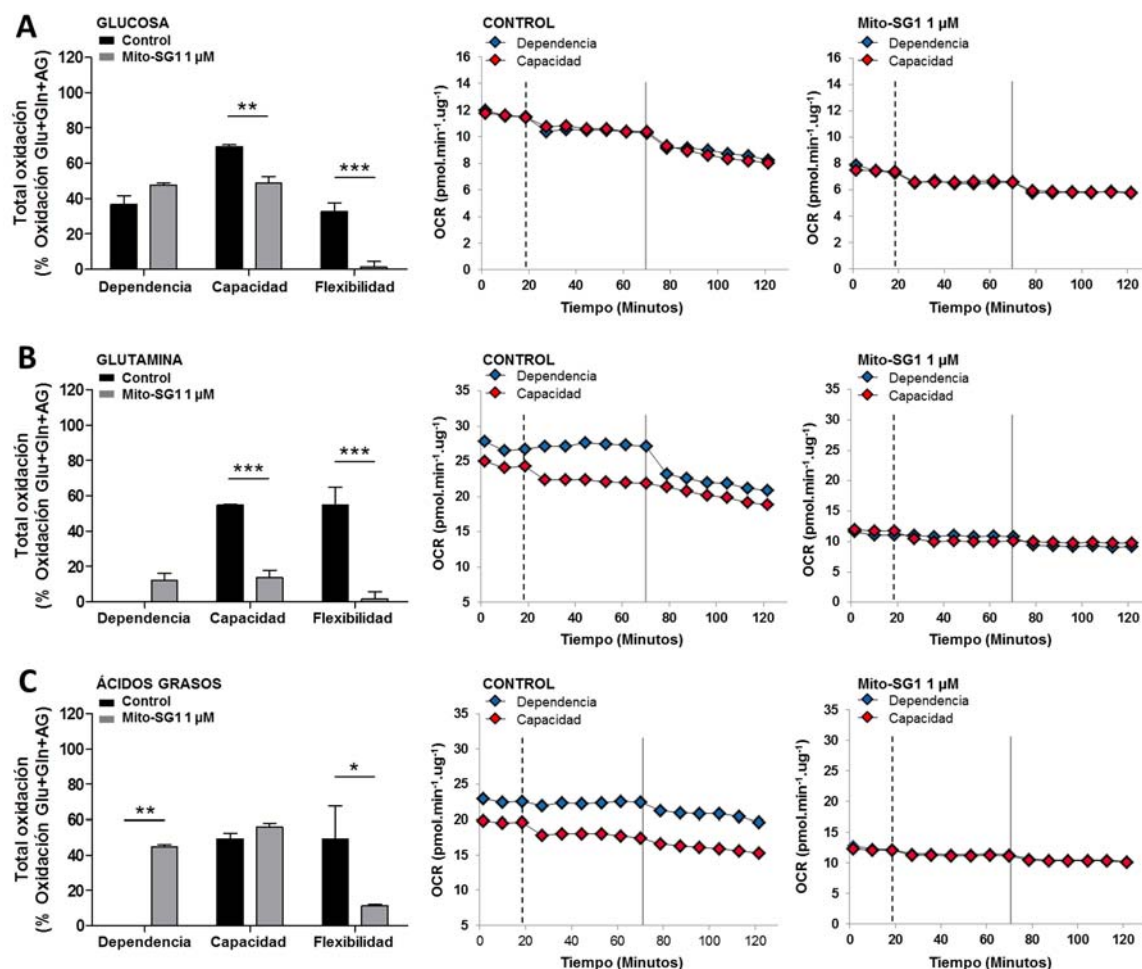


Figura II- 41 Efecto de 24 horas de tratamiento con Mito-SG1 en la contribución a la tasa de consumo de oxígeno de las principales fuentes de carbono en la línea celular MDA-MB-468.

La línea celular MDA-MB-468 fue tratada a una concentración de 1 μM de Mito-SG1 por 24 horas. Se utilizó el XF Mito Fuel Flex Test para evaluar la contribución en el mantenimiento de la tasa de consumo de oxígeno, de la oxidación de las principales fuentes de carbono: glucosa (A), glutamina (B) y ácidos grasos (C). En la primera fila se observa la cuantificación de la dependencia, capacidad y flexibilidad de las células de acuerdo con el tipo de fuente de carbono evaluada, a partir del comportamiento en el consumo de oxígeno a medida que se inyectaban los correspondientes inhibidores. En la segunda y tercera fila, se observa el comportamiento en la tasa de consumo de oxígeno de las células control y las tratadas con Mito-SG1, versus el tiempo; donde las líneas discontinuas y continuas, representan la primera y segunda inyección de los inhibidores respectivamente. Para la determinación de la dependencia, la primera inyección corresponde a la inhibición de la vía que se evalúa, y la segunda inyección corresponde a la inhibición de las dos vías no evaluadas. Se presenta la media normalizada por concentración de proteínas +/- ESM. Para los experimentos n≥4. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

celular; sin embargo, si disminuye la capacidad (16% vs 30%) y flexibilidad (2% vs 25%) de la célula para oxidar la glutamina Figura II- 40B en comparación con las células sin tratamiento.

En el caso de la línea celular MDA-MB-468 Figura II- 41, observamos que existe una mayor dependencia de la glucosa (37), siendo nula la dependencia de la oxidación de la glutamina y los ácidos grasos. Adicionalmente se observa que la glucosa, así como la glutamina y los ácidos grasos, presentan tanto capacidad y flexibilidad similar, sin predominio específico sobre una vía.

En el caso del tratamiento con Mito-SG1, se observa que las células aumentan dramáticamente la dependencia por la oxidación de los ácidos grasos para el soporte de la respiración celular en comparación con el control (45% versus 0%).

Por otra parte, Mito-SG1 disminuye la capacidad de la glucosa y la glutamina para soportar la OCR cuando las vías alternas son inhibidas; así como, la habilidad de incrementar la oxidación de las tres principales fuentes de carbono, en orden de compensar dicha inhibición.

2.4 OBJETIVO ESPECIFICO 4

Valorar los efectos sinérgicos o aditivos, de Mito-SG1 con doxorrubicina y 2-DG en líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y MDA-MB-468).

En la actualidad los tratamientos utilizados para cáncer de seno triple negativo son altamente tóxicos y carecen de selectividad, generando efectos colaterales que comprometen la calidad de vida, así como, la tasa de supervivencia de los pacientes. Mito-SG1, además de ser un compuesto selectivo, podría utilizarse simultáneamente con las terapias actualmente aprobadas para TNBC (como doxorrubicina), con el objeto de: potencializar los efectos citotóxicos sobre las células tumorales; minimizar la dosis efectiva de la quimioterapia; y, por consiguiente, reducir los efectos adversos.

Por otra parte, recientes investigaciones en el desarrollo de alternativas terapéuticas se han enfocado en explotar las diferencias bioquímicas en el metabolismo de las células tumorales y las normales (172). Se han estudiados diversos agentes que inhiben la glicólisis en sistemas celulares y en modelos animales con resultados positivos; sin embargo, son pocos los resultados similares en humanos, la mayoría debido a los efectos adversos a la dosis-límite utilizada (173). Uno de los compuestos anti-glicolíticos más frecuentemente utilizados es el compuesto 2-deoxy-D-glucosa (2-DG), el cual es fosforilado por las hexokinasas y subsecuentemente inhibe la síntesis de ATP por la vía glicolítica. No obstante, debido a la alta concentración de 2DG donde logra la inhibición de la producción del ATP (~20 mmol/L), la eficacia del tratamiento se ha visto limitada por la toxicidad sistémica presentada en los ensayos clínicos para el tratamiento de glioma (174). Novedosas estrategias han sido propuestas, “hipersensibilizando” a las células tumorales con el uso combinado de inhibidores mitocondriales o Mito-compuestos con 2DG (175).

Dado el interés de evaluar el potencial uso de Mito-SG1 con doxorrubicina, así como, con el agente glicolítico 2DG, se procedió a determinar el tipo de interacción presente entre los compuestos, por medio del ensayo de MTT y basados en el método Chou-Talalay (158). El método de Chou-Talalay para la evaluación de combinación de drogas, está basado en la ecuación de efecto-medio derivada del principio de ley de acción de masas. El índice de combinación resultante (CI, por sus siglas en inglés Combination Index) del teorema de Chou-Talalay ofrece una definición cuantitativa para efecto aditivo ($CI=1$), sinergismo ($CI<1$) y antagonismo ($CI>1$) en combinaciones de drogas. El detalle de la ecuación para el cálculo del CI se puede observar en ítem 1.5.4 de la metodología (Capítulo I).

Según Chou (176), en los estudios *in vitro*, el método de evaluación debería contemplar tanto el isoblograma, como el cálculo del CI y el índice de reducción de dosis (IRD). Los tres parámetros se pueden obtener con el software de análisis Calcsyn (156, 157), a partir de la curva dosis respuesta. El isoblograma es un gráfico que presenta las combinaciones equipotentes de varias dosis, de dos drogas. Ilustra de manera semicuantitativa el efecto aditivo, sinergismo, o antagonismo a diferentes dosis.

En la Figura II- 42 se observa un isoblograma clásico, utilizado cuando los radios de las drogas usadas son constantes, como es el caso del presente estudio. En el eje Y se grafica el IC₅₀, IC₇₅ e IC₉₀ de la droga D₁; y en el eje X los correspondientes de la droga D₂. Se traza la isobola, que corresponde a la línea recta entre las correspondientes dosis de cada una de las drogas a evaluar. Si el IC de la combinación de las drogas D₁+D₂ cae sobre la hipotenusa trazada, se considera que la interacción es de tipo efecto aditivo; si cae por debajo, se considera sinergismo; si cae por encima, antagonismo (176).

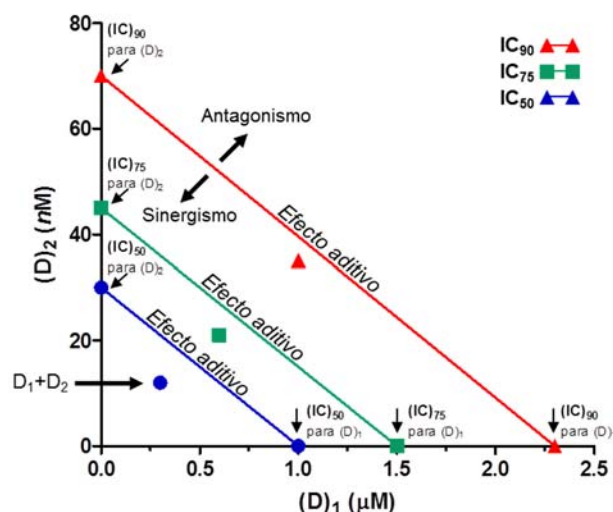


Figura II- 42 Isoblograma clásico para IC₅₀, IC₇₅ e IC₉₀ e interpretación.

Fuente: Tomado y adaptado de "Chou TC. *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. Pharmacol Rev. 2006 Sep;58(3):621-81".

Para la interpretación del CI, nos basaremos en la Tabla II- 6 establecida por Chou y Talalay, en la que se identifica de acuerdo con el valor obtenido del CI, el tipo de interacción encontrada (desde sinergismo muy fuerte hasta antagonismo muy fuerte).

El CI es un buen factor para determinar si realmente existe sinergismo, ya que contempla no sólo la potencia conocida como la dosis media efectiva (D_m), sino también la pendiente (m) y el coeficiente de correlación (r). Una pendiente igual a 1 significa que, la curva tiene una forma hiperbólica, tal como los sistemas cinéticos siguiendo el comportamiento de la ecuación de Michaelis Menten (modelo típico del

comportamiento enzimático); $m > 1$, corresponde a una curva de tipo sigmoidal, donde pequeños cambios pueden generar efectos mayores, evidenciando cooperativismo en la interacción (cinética no Michaeliana, ejemplo: cinética oxígeno-hemoglobina); $m < 1$, una curva sigmoidal aplanada, donde el cooperativismo es negativo, como en los sistemas cinéticos alóstericos. El coeficiente de correlación nos determina que tanto la data obtenida es conforme con el principio de la ley de acción de masas, estimando como muy buena conformidad un valor de $r > 0.97$ (159).

El IRD, nos provee la medida de que tantas veces puede ser reducida la dosis de una droga en una combinación sinérgica, para lograr un efecto determinado, comparada con la dosis de cada droga individualmente (176). El IRD se puede determinar para una dosis efectiva específica como: IC_{50} , IC_{75} e IC_{90} . Un $IRD > 1$, es benéfico, pero no necesariamente significa la existencia de sinergia. Valores altos del IRD indican una gran reducción de la dosis, que logra el efecto terapéutico deseado, minimizando los efectos individuales del uso de altas dosis de los compuestos individuales.

2.4.1 Mito-SG1 potencia los efectos citotóxicos de doxorrubicina, presentando un efecto sinérgico en la línea celular MDA-MB-468 y un efecto aditivo en MDA-MB-231.

Para una correcta evaluación de la interacción entre dos compuestos, es necesario determinar la curva dosis respuesta de los compuestos individuales D_1 y D_2 , así como, de la combinación de $D_1 + D_2$, preferiblemente con un radio constante entre los mismos. Para la evaluación de la interacción entre Mito-SG1 y doxorrubicina, se utilizaron concentraciones equimolares, debido a lo observado en las curvas de dosis-respuesta individuales.

Tabla II- 6 Descripción de sinergismo o antagonismo en estudios de combinación de drogas analizados con el método de índice de combinación.

Rango del índice de combinación	Descripción
<0.1	Sinergismo muy fuerte
0.1-0.3	Sinergismo fuerte
0.3-0.7	Sinergismo
0.7-0.85	Sinergismo moderado
0.85-0.90	Sinergismo leve
0.90-1.10	Casi aditivo
1.10-1.20	Antagonismo leve
1.20-1.45	Antagonismo moderado
1.45-3.3	Antagonismo
3.3-10	Antagonismo fuerte
>10	Antagonismo muy fuerte

Fuente: Tomado y adaptado de "Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev. 2006 Sep;58(3):621-81".

Como podemos apreciar en la Figura II- 43, se presentan las curvas dosis respuesta de los compuestos Mito-SG1 y doxorrubicina en las líneas celulares MDA-MB-231 (A) y MDA-MB-468 (B) respectivamente. Tal como se observó en el primer objetivo, MDA-MB-468 es más sensible al compuesto Mito-SG1 ($IC_{50}=1.36 \mu M$) versus MDA-MB-231 ($IC_{50}=3.22 \mu M$); así como con el compuesto doxorrubicina. Según la curva de dosis respuesta, se observa que en las dos líneas celulares la combinación equimolar logra disminuir el IC_{50} tanto de Mito-SG1, como de doxorrubicina.

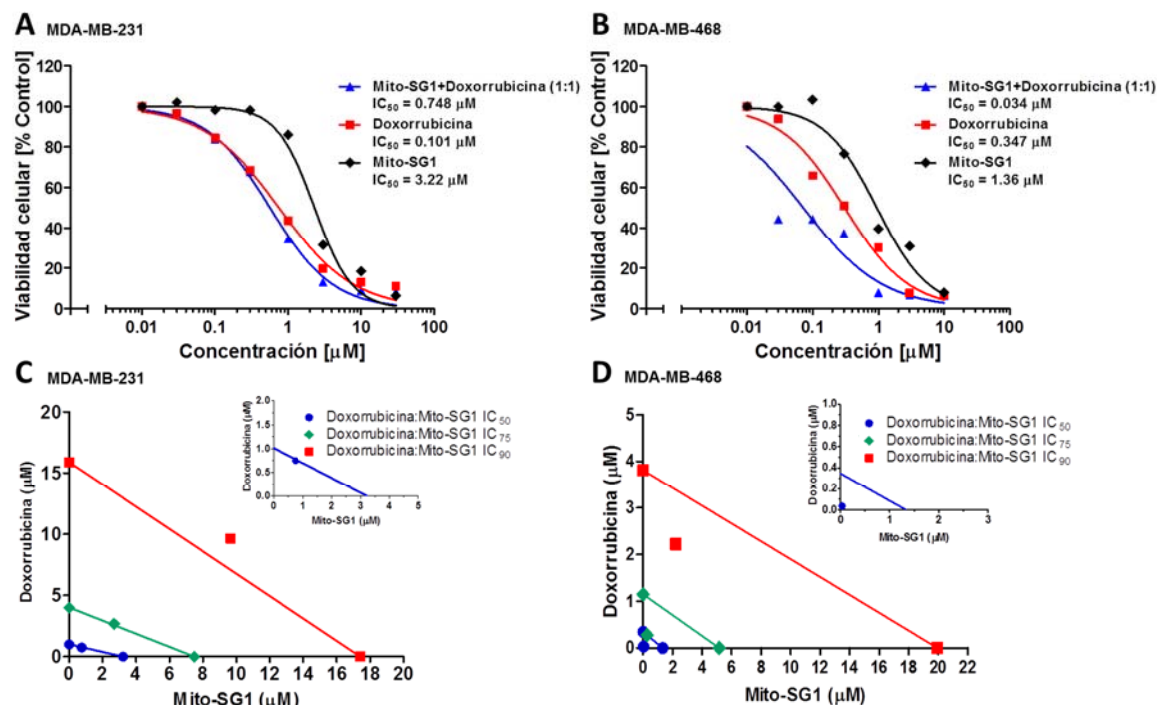


Figura II- 43 Curva dosis respuesta e isoblograma de la interacción de Mito-SG1 con Doxorrubicina.

Las líneas celulares TNBC fueron tratadas por 48 horas con Mito-SG1, doxorrubicina y la mezcla equimolar de los respectivos compuestos. En la parte superior se grafican las curvas dosis respuesta de MDA-MB-231 (A) y MDA-MB-468 (B), usando el software GraphPad Prims 5.0. Por medio del software Calcsyn se calcularon los IC_{50} 's. En la parte inferior se observan los isoblogramas para IC_{50} , IC_{75} e IC_{90} para cada línea celular MDA-MB-231 (C) y MDA-MB-468 (D), así como una ampliación del isoblograma correspondiente al IC_{50} .

Los isoblogramas en la Figura II- 43 nos presentan, el tipo de interacción entre Mito-SG1 y doxorrubicina de acuerdo con el IC_{50} , IC_{75} e IC_{90} . Observamos que en la línea celular MDA-MB-231 se presenta un efecto aditivo para IC_{50} e IC_{75} , y antagónico a un IC_{90} (Figura II- 43C). En el caso de MDA-MB-468 se observa que el punto de convergencia de los compuestos en combinación equimolar cae debajo de la hipotenusa en cada una de dosis efectivas evaluadas IC_{50} , IC_{75} e IC_{90} , determinando sinergismo entre Mito-SG1 y doxorrubicina.

Al observar el índice de combinación para cada dosis efectiva evaluada, se aprecia una buena correspondencia con los isoblogramas, donde se encuentra para MDA-

MB-231 (Tabla II- 7) a dosis IC₅₀ e IC₇₅ un efecto aditivo según la Tabla II- 6 así como para la dosis IC₉₀, antagonismo leve. En el caso de MDA-MB-468, sinergismo fuerte para IC₅₀; sinergismo para IC₇₅; y efecto aditivo para IC₉₀. Se observa que Mito-SG1 en las dos líneas celulares presenta una curva de tipo sigmoidal ($m > 1$); doxorubicina, de tipo sigmoidal plano ($m < 1$); y la combinación D₁+D₂, según el tipo de pendiente ($m < 1$) de bajo cooperativismo entre los compuestos. Se observa que todas las curvas de dosis respuesta son conformes al principio de la ley de acción de masas.

Tabla II- 7 Índice de combinación de Mito-SG1 con los diferentes compuestos evaluados en las líneas celulares de TNBC.

	Índice de Combinación a			Parámetros Dosis-efecto		
	IC ₅₀	IC ₇₅	IC ₉₀	Dm (μM)	m	r
MDA-MB-231						
Mito-SG1				3.22	1.302	0.9766
2DG				1651	0.531	0.9822
Doxorrubicina				1.01	0.798	0.9769
Mito-SG1 + 2DG (1:1000)	0.445	0.427	0.572	0.486 + 486	0.766	0.9775
Mito-SG1 + Doxorubicina (1:1)	0.972	1.029	1.162	0.75	0.859	0.9729
MDA-MB-468						
Mito-SG1				1.36	1.557	0.9631
2DG				4775	0.655	0.9751
Doxorrubicina				0.347	0.916	0.9765
Mito-SG1 + 2DG (1:1000)	0.491	0.675	1.010	0.520 + 520	0.938	0.9948
Mito-SG1 + Doxorubicina (1:1)	0.126	0.342	0.981	0.0347	0.528	0.9165

Es de destacar que, a pesar de no encontrar sinergismo en todas la dosis (IC₅₀, IC₇₅ e IC₉₀), la interacción entre Mito-SG1 y doxorubicina genera un IRD (Tabla II- 8) mayor a 1 a dosis citotóxicas hasta del 90%, lo que significa que se logra disminuir la dosis de ambos compuestos para lograr el mismo efecto terapéutico deseado con una disminución de los efectos colaterales. La reducción en la dosis de Mito-SG1 debida a doxorubicina oscila entre 1.93 a 53 veces; mientras que la reducción de la dosis de doxorubicina, entre 1.29 a 15 veces.

La anterior data soporta el potencial terapéutico del uso de Mito-SG1 en combinación equimolar con doxorubicina para el tratamiento de cáncer de seno triple negativo.

Tabla II- 8 Índice de reducción de dosis Mito-SG1+Doxorrubicina en TNBC.

Fracción Afectada	Índice de Reducción de la Dosis	
	Mito-SG1	Doxorrubicina
MDA-MB-231		
0.035463	8.50	0.54
0.162126	9.13	1.29
0.323517	6.10	1.34
0.654982	5.27	2.26
0.868274	4.57	3.58
0.911221	1.93	1.87
0.916556	0.68	0.68
MDA-MB-468		
0.557101	52.57	14.83
0.557366	15.78	4.46
0.626799	6.33	2.03
0.921483	6.62	5.09
0.933133	2.47	2.05
0.935193	0.76	0.64

2.4.2 Mito-SG1 sinergiza con 2DG en las líneas celulares de TNBC.

Para determinar los efectos citotóxicos de los compuestos sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, los cultivos celulares fueron expuestos a diferentes concentraciones de Mito-SG1 y 2DG por 48 horas, manteniendo un radio constante de 1:1000, debido a la alta dosis requerida de 2DG para lograr la inhibición de la glicólisis.

Tal como lo esperábamos, Mito-SG1 interactúa con 2DG logrando reducir la dosis IC_{50} de ambos compuestos Figura II- 44. Como podemos observar en las curvas dosis respuesta, en las dos líneas celulares hay una notable disminución de la concentración de 2DG utilizada para lograr una disminución de la viabilidad celular. Adicionalmente podemos observar, que a pesar de la mayor sensibilidad por 2DG de la línea celular MDA-MB-231 (Figura II- 44C) versus MDA-MB-468 (Figura II- 44D), al adicionar Mito-SG1 en un radio 1:1000 con 2DG, se reduce el IC_{50} de 2DG a concentraciones similares (486 μM vs 520 μM) y de Mito-SG1 (0.486 μM vs 0.520 μM).

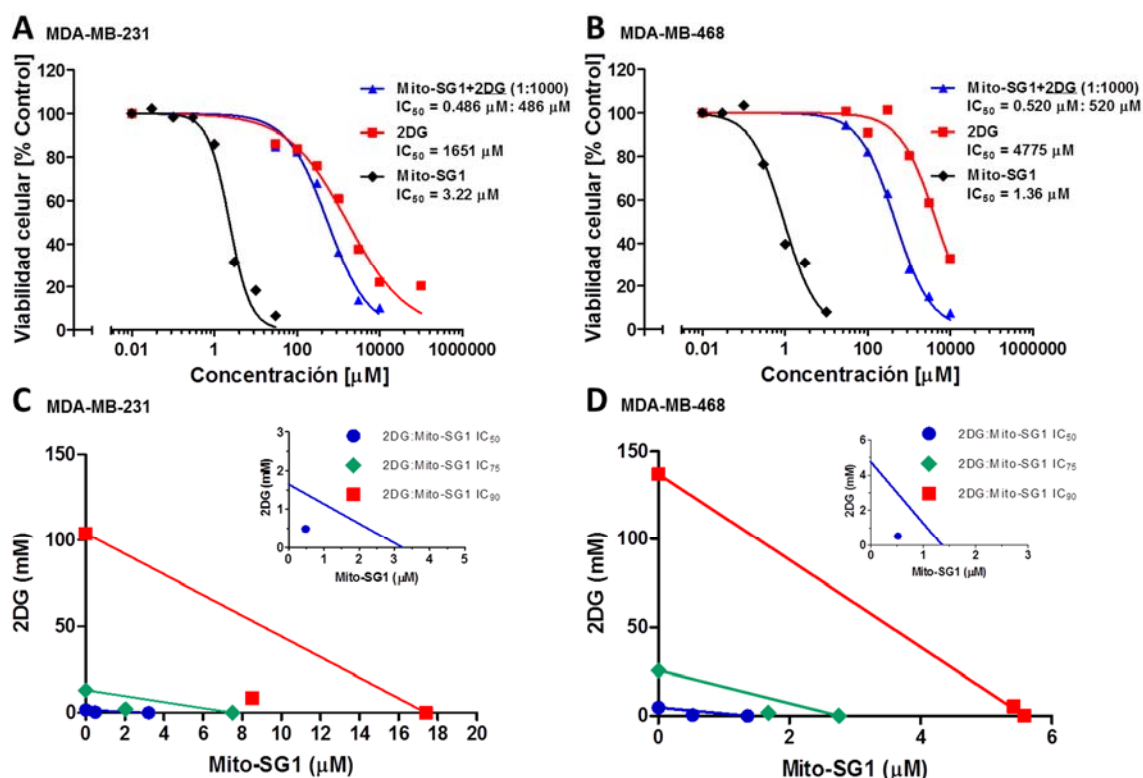


Figura II- 44 Curva dosis respuesta e isoblograma de la interacción de Mito-SG1 con 2DG.

Las líneas celulares TNBC fueron tratadas por 48 horas con Mito-SG1, 2DG y la mezcla a un radio 1:1000 de los respectivos compuestos. En la parte superior se grafican las curvas dosis respuesta de MDA-MB-231 (A) y MDA-MB-468 (B), usando el software GraphPad Prims 5.0. Por medio del software Calcsyn se calcularon los IC_{50} 's. En la parte inferior se observan los isoblogramas para IC_{50} , IC_{75} e IC_{90} para cada línea celular MDA-MB-231 (C) y MDA-MB-468 (D), así como una ampliación del isoblograma correspondiente al IC_{50} .

Es evidente que, la inhibición de la glicólisis por 2DG en adición con la afectación en la respiración celular producida por Mito-SG1, generan el arma perfecta para afectar la bioenergética mitocondrial, logrando un desequilibrio energético que conlleva a la muerte celular. Esta interacción es de tipo sinérgico tal como se puede apreciar en los isoblogramas de las dosis evaluadas (IC_{50} , IC_{75} e IC_{90}) en las Figura

II- 44C y D; a excepción de la línea células MDA-MB-468 en la dosis IC₉₀ donde se observa un efecto casi aditivo.

Al observar el índice de combinación para cada dosis efectiva evaluada, también se aprecia una buena correspondencia con los isobologramas, donde se encuentra para MDA-MB-231 (Tabla II- 7) para todas las dosis: (IC₅₀, IC₇₅ e IC₉₀) sinergismo según la Tabla II- 6; en el caso de MDA-MB-468, sinergismo a dosis IC₅₀ e IC₇₅, y efecto casi aditivo para IC₉₀. Se enfatiza que Mito-SG1 en las dos líneas celulares presenta una curva de tipo sigmoidal ($m > 1$); 2DG, de tipo sigmoidal plano ($m < 1$); y la combinación D₁+D₂, según el tipo de pendiente ($m < 1$) de bajo cooperativismo entre los compuestos. Se observa que todas las curvas de dosis respuesta son conformes al principio de la ley de acción de masas.

Es de resaltar, que la interacción entre Mito-SG1 y 2DG genera un IRD mayor a 1.72 a dosis citotóxicas hasta del 90%, lo que significa que se logra disminuir la dosis de ambos compuestos para lograr el mismo efecto terapéutico deseado con una reducción de los efectos colaterales (Tabla II- 9). La disminución en la dosis de Mito-SG1 debida a 2DG oscila entre 1.32 a 17.63 veces; mientras que la reducción de la dosis de 2DG, entre 1.72 a 28 veces.

Los anteriores resultados soportan el potencial uso de Mito-SG1 en combinación con 2DG a un radio de 1:1000 para el tratamiento de TNBC, debido al efecto sinérgico observado en las líneas celulares evaluadas.

Tabla II- 9 Índice de reducción de dosis Mito-SG1+2DG en TNBC.

Fracción Afectada	Índice de Reducción de la Dosis	
	Mito-SG1	2DG
MDA-MB-231		
0.149884	2.09	28.33
0.175786	0.90	9.84
0.318958	1.32	6.00
0.639012	4.84	4.99
0.863005	17.63	4.41
0.898480	10.04	1.72
MDA-MB-468		
0.056109	7.40	2.14
0.177563	5.09	4.59
0.368321	3.21	6.98
0.723152	2.52	20.69
0.847273	1.36	21.80
0.925042	0.68	22.18

DISCUSIÓN

3.1 EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS DEL AGENTE CATIÓNICO DIRIGIDO A LA MITOCONDRIA MITO-SG1 EN TNBC

El cáncer de seno triple negativo (TNBC) es el subtipo más agresivo de cáncer de seno y presenta el peor pronóstico. No responde a la terapia endocrina y presenta resistencia al tratamiento quimioterapéutico estándar. Existe una necesidad crítica no satisfecha de buscar alternativas terapéuticas para maximizar los enfoques de tratamiento, así como, mitigar los mecanismos de resistencia.

Pelicano y colaboradores (45), publicaron que las líneas celulares TNBC, como MDA-MB-231 y MDA-MB-468 presentan afectación de la función mitocondrial y dependencia mayor por la glicólisis aún en condiciones aeróbicas en comparación con otros subtipos de cáncer de seno (no TNBC, como las líneas celulares MCF7 y T47D), lo cual puede soportar sus altas y rápidas tasas de crecimiento. Asimismo, determinaron que TNBC se caracteriza por: una menor tasa de respiración, asociada con una disminución en la expresión de las proteínas de los complejos mitocondriales I y III; un incremento en la expresión de moléculas glicolíticas entre las que se encuentran Glu1/4 y hexoquinasa II (HKII); así como, activación de Akt que promueve la glicólisis. Se cree que el incremento en la toma de glucosa pueda ayudar a proveer intermediarios metabólicos esenciales para la síntesis de lípidos y ácidos nucleicos vía NADPH y PPP, los cuales son requeridos para mantener su activa proliferación. Lo anterior fue demostrado por Pelicano y colaboradores al exponer los diferentes subtipos celulares a altas concentraciones de glucosa y observar que TNBC aumenta considerablemente sus tasas de proliferación dependiendo de la concentración de glucosa en el medio. Los anteriores hallazgos abren la posibilidad de explotar estas diferencias metabólicas específicas como un novedoso blanco terapéutico en el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

Recientemente, nuestro grupo de investigación desarrolló el mimético de superóxido dismutasa, Mito-SG1, un nitróxido lineal de [(N-tertbutil-N-[1-dietilfosfono-(2,2-dimetilpropil)]], enlazado a un catión lipofílico de trifenilfosfina (TPP^+) por medio de una cadena alifática de 10 carbonos; y la mito-metformina, el sensibilizador de insulina metformina, también enlazada a TPP^+ y con cadena alifática de 10 carbonos. Estos compuestos catiónicos lipofílicos, conocidos como mito-compuestos, presentan una acumulación selectiva en la mitocondria tumoral, debido a su mayor potencial de membrana plasmática y mitocondrial (mayor negatividad interna) en comparación con las células sanas (55, 177-180). Este principio de potencial selectividad ha conllevado al desarrollo de numerosos cationes lipofílicos generando nuevas herramientas diagnósticas y agentes antitumorales menos tóxicos que los actualmente utilizados. Entre los agentes antitumorales selectivos dirigidos a la mitocondria, aquellos conjugados al catión TPP^+ , han demostrado ser más eficientes en inhibir la proliferación celular (181).

El éxito de los mito-compuestos depende además de la molécula de unión elegida al catión de TPP⁺, a la acumulación selectiva del compuesto en la mitocondria. La acumulación del mito-compuesto se debe no sólo a la carga de las moléculas y del potencial de membrana mitocondrial, sino también a la dinámica del proceso de equilibrio, el cual es significativamente dependiente de la lipofilicidad del catión. La energía de barrera de algunos compuestos hidrofílicos puede ser tan alta que aún, el conjugarlos a un catión de TPP⁺ no es suficiente para conducirlos a la mitocondria (182, 183). Una alternativa demostrada para lograr aumentar la hidrofobicidad de la molécula es la elongación de la cadena alifática. Este hecho ha demostrado que aumenta la toma del mito-compuesto en la mitocondria, en comparación con un alquil simple de TPP⁺. Se ha determinado que la cadena alifática de 10 carbonos genera suficiente lipofilicidad para lograr la acumulación, disminuyendo la toxicidad general del compuesto. Un compuesto con menos carbonos es menos tóxico, pero no se acumula de forma preferente, mientras que uno con una cadena alifática mayor a 10 carbonos, es tóxico hasta para las células sanas (52, 184). Los actuales mito-compuestos que han demostrado actividad antitumoral y acumulación selectiva como, Mito-Q, Mito-CP o Mito-Tempol, están formados con cadenas alifáticas de 10 carbonos (7, 11, 58, 137-139).

En este trabajo se reporta por primera vez el estudio de las propiedades antitumorales de los compuestos Mito-Met y Mito-SG1 en TNBC, ambos compuestos sintetizados y caracterizados por los doctores Micael J. Hardy y Olivier Ouari del laboratorio SREP de la Universités Aix-Marseille, Francia. Para el presente estudio se definieron dos tipos de líneas celulares: TNBC y no TNBC. Las células TNBC utilizadas fueron MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Ambas líneas celulares son triple negativas, es decir, no presentan receptores para estrógenos, progesterona y HER2. Las dos líneas celulares presentan mutación del oncogén TP53, afectando la expresión de la proteína conocida como guardián del genoma p53. Adicionalmente estas dos líneas celulares fueron escogidas porque cada una de ellas presenta diferentes vías de señalización sobre-expresadas, que ayudan en sus altas tasas de proliferación y supervivencia, como lo son: mutaciones en Ras, en el caso de MDA-MB-231; y en la vía Akt, por mutación en el supresor PTEN, en el caso de MDA-MB-468. Dentro del grupo no TNBC, se incluyó T47D y MCF7, esta última, debido a que es la única línea celular que no tiene mutación del gen TP53. Ambas líneas celulares presentan mutación en *PIK3CA*, encargado de codificar PI3K, importante mediador en la vía PI3K/AKT/mTOR.

Una vez evaluados los dos compuestos (Mito-Met y Mito-SG1), se eligió el compuesto que presentó actividad antitumoral en las 4 líneas celulares evaluadas a la menor concentración, como lo fue Mito-SG1, cuya dosis IC₅₀ evaluada por el ensayo de MTT para todas las líneas celulares analizadas fue menor a 3 µM, en comparación con Mito-Met que presentó IC₅₀'s mayores a 100 µM. Los resultados obtenidos con Mito-Met en cáncer de seno no fueron los esperados, dado los prometedores resultados evidenciados en cáncer de páncreas, donde se observó la dosis IC₅₀ a concentraciones de 1 µM de Mito-Met, mil veces menor que con su

compuesto parental metformina (147). Se espera con recursos de próximos proyectos sintetizar nuevas y más estables formas del compuesto, dado su gran potencialidad antitumoral.

Por su parte, Mito-SG1 demostró actividad citotóxica antitumoral en el ensayo de MTT, SYTOX Green e inhibición de la proliferación celular (Figura II- 2, 4 y 5), más no sus compuestos parentales SG1 y TPP (Figura II- 3 y 4). Lo cual demuestra que su actividad antitumoral esta dada por sus propiedades como mito-compuesto y no por toxicidad de los compuestos parentales. Como lo esperábamos, Mito-SG1 no generó muerte celular en la línea celular epitelial de seno MCF10A a las concentraciones con actividad antitumoral del compuesto, demostrando así su selectividad y seguridad en el tratamiento de cáncer de seno.

Una de las características de las células tumorales es su capacidad de formar colonias, lo que nos permite evaluar su capacidad de división y crecimiento. El ensayo de formación de colonias es el método de elección para la evaluación de nuevos compuestos antitumorales. Como lo podemos observar en la Figura II- 6, Mito-SG1 más no SG1, a concentraciones micromolares logró una disminución en la formación de colonias tanto en líneas celulares de TNBC, como en no TNBC. Adicionalmente las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas con Mito-SG1, presentaron una disminución en la migración celular como podemos observar en la Figura II- 7. En conjunto los anteriores resultados respaldan el potencial antitumoral que ejerce Mito-SG1 en TNBC y no TNBC, independiente del estatus de p53, y de la vía de señalización sobre-expresada en cada subtipo celular.

Después de determinar los efectos citotóxicos selectivos procedimos a evaluar si, al igual que otros mito-compuestos (58, 138, 185), el mecanismo de muerte celular estimulado por Mito-SG1 era apoptosis, lo que confirmaría también la disrupción mitocondrial. La disrupción de la apoptosis ha tenido importantes implicaciones en varios tejidos tumorales y es actualmente explotada como una estrategia antitumoral. Unido al hecho de que la apoptosis causa un mínimo daño a los tejidos vecinos con una mínima respuesta inflamatoria, las terapias basadas en la muerte celular por apoptosis se han convertido en el centro de atracción para el desarrollo de drogas antitumorales.

Como primer estudio, se procedió a determinar la afectación de la morfología nuclear por medio de la tinción con DAPI, en células expuestas a diferentes concentraciones de Mito-SG1 Figura II- 9. Este ensayo nos permitió el uso eficiente de los recursos, porque pudimos elegir las concentraciones y el tiempo de tratamiento adecuados para lograr identificar con otros test, parámetros claves de la apoptosis. La anexina V es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidil serina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática, y es un biomarcador efectivo en células apoptóticas (186, 187), en este trabajo se encontró que tanto las líneas celulares TNBC como no TNBC, presentaron traslocación de la fosfatidil serina

(Figura II- 10, 11 y 12). Sin embargo, a pesar de usar un doble marcador con SYTOX Green para MCF7 y Ioduro de propidio para las líneas celulares TNBC, no era posible diferenciar la apoptosis tardía de la necrosis con exposición de fosfatidil serina. Una característica temprana de la apoptosis presentada por Mito-SG1 fue la despolarización de la membrana mitocondrial de forma dosis dependiente, independiente del estatus de p53 como podemos observar en las líneas celulares TNBC y MCF7 (Figura II- 16). Los cambios en el potencial de membrana pueden ocasionarse dado a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, permitiendo la liberación del citocromo c, al citosol tal como lo podemos observar por medio de la técnica de western blot en la Figura II- 14. La liberación de citocromo c, activa a la proteína APAF1 y en presencia de dATP, se forma el apoptosoma responsable de la activación de la procaspasa 9, la cual activa las caspasas efectoras 3/7, lo que fue detectado por citometría de flujo (Figura II- 13).

Los anteriores resultados soportan los efectos antitumorales y apoptóticos del compuesto Mito-SG1 en las líneas celulares TNBC y no TNBC, independiente de las vías de señalización sobre-expresada en las líneas celulares evaluadas. La afectación de Mito-SG1 sobre la respiración celular, genera aumento de ROS mitocondrial Figura II- 18-20, que podría ser el responsable de la activación de apoptosis. Por otra parte, también podría ser un mecanismo por medio del cual se genere la permeabilización del poro de transición mitocondrial. Es importante adelantar futuros estudios para determinar el papel que juegan proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas, así como, específicamente que vía de caspasas lidera el proceso, dado la importancia de la apoptosis en los procesos de resistencia que presenta TNBC a las terapias convencionales.

3.2 AFECTACIÓN DE LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL COMO MECANISMO ANTITUMORAL DE MITO-SG1

La mitocondria es un organelo bioenergético, biosintético y encargado de múltiples vías de señalización que sensan los cambios del ambiente para permitir la adaptación celular. Es por esto, que no es sorprendente que la mitocondria sea un importante mediador de la tumorigénesis, dado que este proceso requiere flexibilidad para adaptar las células a los cambios del ambiente, así como, a los generados por los tratamientos actualmente desarrollados.

La mayoría de las células tumorales metabolizan glucosa a lactato bajo condiciones aeróbicas, lo cual es conocido como efecto Warburg (86). La razón del porqué las células tumorales eligen la glicólisis a pesar de su baja eficiencia para la producción de ATP es desconocida hasta el momento. Warburg propuso que la mitocondria de este tipo de células era disfuncional, forzando a las células a depender de la glicólisis para suplir su demanda energética. Estudios posteriores demostraron que la mayoría de las células de cáncer tienen una mitocondria funcional, tal como lo observamos en la línea celular MDA-MB-231 en el presente estudio (Figura II- 22), al potencializar la respiración mitocondrial reemplazando la glucosa como fuente de carbono por galactosa. Estudios más recientes con el uso de los mito-compuestos como Mito-CP y Mito-Tempol (135, 138, 183), mostraron por primera vez evidencia que la afectación de la respiración celular generaba efectos antiproliferativos en células tumorales. Hasta este momento, todos los esfuerzos en el desarrollo de nuevos tratamientos con dianas metabólicas estaban dirigidos a la inhibición de la glicólisis. Ahora entendemos que, mientras en algunos casos el daño mitocondrial conduce el efecto Warburg, muchas células tumorales que presentan un metabolismo tipo Warburg, poseen una respiración mitocondrial intacta y algunos subtipos de cáncer realmente dependen de la respiración mitocondrial.

Existe una fuerte evidencia que correlaciona altas tasas de proliferación celular y agresividad del fenotipo tumoral, con un aumento de la glicólisis (188-191). Y por esta razón, por años estuvo en segundo plano la respiración celular como diana terapéutica en cáncer, debido a que se pensaba había una disfunción mitocondrial que generaba una dependencia de la glicólisis para soportar el crecimiento tumoral. Gracias a décadas de estudio sobre la respiración mitocondrial en cáncer se han abierto nuevas fronteras, generando un marco de trabajo mucho más amplio, con funciones adicionales de la mitocondria en cáncer e identificando un importante rol pleiotrópico en el proceso tumorigénico. Por mucho tiempo se pensó que la principal función de la mitocondria era únicamente la producción de ATP, por lo cual ha recibido el apodo de “*powerhouse of the cell*”. Sin embargo, la mitocondria esta a cargo de funciones más allá de la producción de energía, entre las que se incluyen la generación de ROS, moléculas redox, metabolitos, regulación de procesos de

señalización y muerte celular, así como, del metabolismo biosintético. Este abanico de funciones de la mitocondria en las células sanas es muy importante para sensar el estrés celular y permitir las adaptaciones celulares al ambiente. En el caso de las células malignas no existe un único rol en el papel de la mitocondria en el desarrollo tumoral o agresividad del fenotipo tumoral. La flexibilidad mitocondrial juega un importante papel en el crecimiento y supervivencia tumoral, en ambientes hostiles como en la hipoxia, depleción de nutrientes y en los mismos tratamientos antitumorales. Las características de la mitocondria en los diferentes subtipos de cáncer varían dependiendo de la genética, ambiente y tipo de tejido del cual se originan.

En el caso de cáncer de seno, se ha observado una diferencia marcada en la tasa de glicólisis y la respiración celular entre los subtipos de cáncer de seno triple negativo y receptores-positivos (ó no TNBC). El aumento de la glicólisis en este subtipo de cáncer se correlaciona con un aumento en la expresión de transportadores de glucosa y de hexoquinas, así como, la disminución de la respiración se correlaciona con una disminución en la expresión de proteínas de los complejos mitocondriales I y III. A pesar de que TNBC presenta una disminución en la respiración celular demostrado por una menor tasa de consumo de oxígeno (OCR), que las líneas celulares no TNBC, existe una dependencia de la misma para asegurar el mantenimiento de la proliferación celular.

Lo anterior es evidenciable con la actividad antiproliferativa de Mito-SG1 en TNBC, la cual es debida a la afectación que genera en la respiración celular. Mito-SG1 de manera dosis-tiempo-dependiente generó disminución de la tasa de consumo de oxígeno en TNBC (Figura II- 26 y 27). De la misma forma, el tratamiento por 24 horas con Mito-SG1 a concentraciones micromolares disminuyó la tasa de consumo de oxígeno basal, la máxima capacidad respiratoria, la reserva de la capacidad respiratoria y la respiración acoplada (Figura II- 29). Al evaluar el mapa bioenergético se observa que al aumentar la concentración o el tiempo de exposición de las líneas celulares a Mito-SG1, existe una disminución en la respiración celular con un aumento en la tasa de acidificación extracelular que, en determinado punto, se vuelve insuficiente para mantener la demanda energética y se refleja en la inhibición del crecimiento y proliferación celular (Figura II- 4, 5 y 6). Al estudiar a fondo la afectación del fenotipo energético se encuentra que, Mito-SG1 a una concentración de 1 μ M, drásticamente genera una disrupción mitocondrial afectando la capacidad celular de aumentar su respiración, y conllevando a soportar a través de la glicólisis los requerimientos energéticos celulares (Figura II- 33, 34 y 35).

Por otra parte, se propuso en este estudio la traslación del concepto de índice bioenergético (IB) propuesto por el Dr Victor Darley Usmar (171), al análisis dinámico del impacto bioenergético de Mito-SG1 en TNBC. El concepto de BI el cual, inicialmente se desarrolló como un test clínico para determinar la progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento por medio de la determinación de la función energética de leucocitos y plaquetas, contempla el análisis conjunto de 4

parámetros claves de la respiración celular. Según la propuesta del Dr Usmar, un bajo índice energético está asociado con baja capacidad de reserva y de la respiración acoplada, así como, con un aumento de la respiración no mitocondrial y la fuga de protones. En este estudio se evidenciaron tempranas disrupciones del metabolismo mitocondrial generadas por el tratamiento con Mito-SG1 por 24 horas, y que no fueron detectadas cuando dichos parámetros fueron analizados individualmente. Mito-SG1 a concentraciones de 0.1 y 0.3 μM , afectan el metabolismo mitocondrial en MDA-MB-468 y MDA-MB-231 respectivamente (Figura II- 36A y B), en comparación con la dosis de 1 μM que logra diferencias significativas al evaluar la tasa de consumo basal, la máxima capacidad respiratoria, la reserva de la capacidad respiratoria y la respiración acoplada, como parámetros de análisis individuales. Los resultados demuestran la aplicabilidad que se le puede dar al IB para la evaluación de la bioenergética mitocondrial en cultivos celulares y en el desarrollo de agentes dirigidos a la mitocondria.

Al evaluar el efecto de Mito-SG1 en la bioenergética, también es importante determinar la afectación del potencial metabólico. Al calcular los cambios relativos en el potencial metabólico de las células tratadas y no tratadas con Mito-SG1, se encontró que Mito-SG1 suprime la habilidad celular para responder a los cambios en la demanda energética por inhibición tanto de la respiración mitocondrial como de la glicólisis (Figura II- 33B y Figura II- 34B), pero únicamente inhibe el potencial metabólico glicolítico de la línea celular no TNBC, MCF7 (Figura II- 35B). Lo anterior puede ser debido al mayor potencial glicolítico presente en las líneas celulares no TNBC.

Para entender los cambios a nivel del metabolismo glicolítico, se evaluó por medio del XF Cell Glycolysis Stress Test Kit de Seahorse Bioscience, la afectación directa de Mito-SG1 sobre la tasa de glicólisis, máxima capacidad glicolítica y reserva glicolítica. Se determinó que Mito-SG1 afecta de forma dosis dependiente la glicólisis y genera una disminución en la reserva glicolítica. Es decir, Mito-SG1 aumenta la tasa de glicólisis de TNBC por disminución en la respiración, lo cual genera que la célula disminuya su reserva glicolítica, afectando la habilidad de las células para responder a demandas energéticas que soportan la actividad antitumoral del compuesto (Figura II- 37).

Por último, fue relevante determinar si la afectación en la respiración celular generada por Mito-SG1, se correlaciona con la disminución o aumento de la dependencia de una fuente de carbono específica, o a una afectación directa sobre los complejos mitocondriales. En este proyecto se evaluó por primera vez la contribución de las principales fuentes de carbono en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, y la afectación del tratamiento de Mito-SG1 sobre la dependencia, capacidad y flexibilidad de las mismas; sin embargo, no se determinó el efecto de Mito-SG1 sobre los complejos mitocondriales, por limitantes presupuestales.

Al estudiar el uso de la glucosa como fuente de carbono para la respiración celular, se observó que la línea celular MDA-MB-468 tiene una mayor dependencia de glucosa en comparación de las otras dos fuentes de carbono (Figura II- 41); sin embargo, MDA-MB-231, soporta su respiración celular no sólo en la glucosa como fuente de carbono, sino también en la utilización de los ácidos grasos (Figura II- 40). Es de resaltar que, en el caso de MDA-MB-231, a pesar de tener inhibida la utilización de glucosa y glutamina para el sostenimiento de la respiración celular, la tasa de consumo de oxígeno puede sostenerse únicamente por la oxidación de ácidos grasos (Figura II- 40).

Es de resaltar que las líneas celulares TNBC estudiadas, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, presentan comportamientos diferentes en el uso de las fuentes de carbono, siendo común en el tratamiento con Mito-SG1, la afectación de forma significativa en la flexibilidad y capacidad del uso de la glutamina para el mantenimiento de la tasa de consumo de oxígeno. Tal como publicó recientemente Geldermalsen y colaboradores (192), TNBC presenta un mayor consumo de glutamina, así como altas tasas de glutaminólisis, requeridas para la activación de la vía sensible a nutrientes mTORC1, la cual regula el crecimiento celular. Por otra parte, Visagie y colaboradores (193), demostraron la inducción de apoptosis en MDA-MB-231 en condiciones de privación de glutamina. Entendiendo el importante rol de la glutamina tanto como sustrato para la oxidación del ciclo TCA, así como, para la síntesis de macromoléculas, la afectación de su metabolismo por Mito-SG1 puede contribuir a los efectos citotóxicos encontrados en TNBC. El nitrógeno aportado por la glutamina sirve de soporte para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos; el carbono, se utiliza para síntesis de glutatión, aminoácidos y lípidos; su metabolismo se ha observado aumentado en muchos subtipos de cáncer siendo impulsado por la regulación positiva de la glutaminasa (GLS), que convierte la glutamina en glutamato y amoníaco. El glutamato se oxida a α -ceto-glutarato (α -KG) por la GDH, proporcionando el punto de entrada al ciclo TCA. La glutamina es centro de biosíntesis de macromoléculas esenciales y soportado en los resultados encontrados en nuestro estudio, podemos suponer que en parte la afectación de Mito-SG1 sobre la respiración celular, es debida a la disminución de la capacidad de la glucosa y la glutamina para soportar la OCR cuando las vías alternas son inhibidas; así como, la habilidad de incrementar la oxidación de las tres principales fuentes de carbono, en orden de compensar dicha inhibición.

La eficacia de Mito-SG1 en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, sugiere que la mitocondria puede ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de TNBC. La mitocondria es el organelo intracelular clave responsable de la generación de ATP (catabolismo), así como, de los bloques de estructurales (anabolismo), en donde son requeridas un conjunto de enzimas de la cadena respiratoria y del TCA. La glicólisis aerobia detectada en diferentes células tumorales (efecto Warburg), inicialmente lideró varias hipótesis que sobreestimaron el papel de la respiración celular y del papel de la mitocondria en el metabolismo en cáncer (194). Ahora es claro el papel de la mitocondria y de la reprogramación de

su metabolismo para soportar la demanda energética y biosintética en las células tumorales, que asegure la proliferación y supervivencia de las mismas. Es un hecho que la fosforilación oxidativa es crítica para satisfacer la demanda creciente para la producción de los bloques de construcción y energía requerida en TNBC, así como, en otras diferentes líneas celulares derivadas de diferentes tejidos como piel, cérvix, pulmón entre otros (195-201). Existe evidencia no solo a nivel *in vitro*, del rol del metabolismo mitocondrial en la tumorigénesis. Estudios *in vivo* demuestran que la mitocondria es esencial para el desarrollo tumoral, donde la pérdida de la proteína TFAM (requerida para la replicación y mantenimiento del número de copias de ADN mitocondrial), disminuye la tumorigenicidad del adenocarcinoma de pulmón en modelos oncogénicos K-ras de ratón (8).

Los anteriores resultados soportan que la afectación de la bioenergética mitocondrial generada por el tratamiento con Mito-SG1 en TNBC, podría ser la responsable de los efectos antitumorales del compuesto y presentan la mitocondria, como prometedora diana terapéutica en el desarrollo de nuevos agentes antitumorales en cáncer de seno triple negativo.

3.3 POTENCIAL ROL DE LA VIA RAS/MEK/ERK EN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE MITO-SG1

Uno de los principales mecanismos de acción propuestos que median la proliferación celular tumoral fue la señalización redox por las especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido y peróxido de hidrógeno, originados como bioproductos del metabolismo (8). Los elevados niveles de ROS han sido asociados con el principio de estrés oxidativo lo cual sugiere que ROS induce patología por peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ADN (202). Sin embargo, en las pasadas dos décadas se ha descubierto el relevante rol de ROS como moléculas de señalización que regulan importantes procesos celulares fisiológicos y biológicos (203, 204). Al parecer, durante el proceso evolutivo se desarrolló una selección natural de ROS como mecanismo de señalización para permitir la adaptación celular a los cambios ambientales en cuanto a disponibilidad de nutrientes y ambientes oxidativos (205).

Así, los efectos antiproliferativos y antitumorales de ciertos antioxidantes fueron atribuidos a su habilidad para mitigar la producción de ROS. El desarrollo de mito-nitróxidos miméticos de SOD, se originó con base en este principio. Se especuló que, al desarrollar un antioxidante con acumulación preferencial en la mitocondria, podría disminuir el estrés oxidativo y, por ende, mediar la señalización celular generada por superóxido desencadenando la inhibición de la proliferación y la activación de apoptosis. Sin embargo, estudios recientes proponen que los nitróxidos catiónicos dirigidos a la mitocondria inhiben la proliferación celular del tumor por un mecanismo en su mayoría, independiente de su capacidad antioxidante (138).

En el presente estudio evidenciamos que Mito-SG1 no disminuye los niveles de ROS, por el contrario, aumenta los niveles de superóxido mitocondrial, generando estrés oxidativo (Figura II- 18, 19 y 20). Nuestros resultados se correlacionan con los hallazgos publicados recientemente para otros mito-compuestos donde se evidencia que el tratamiento con compuestos como Mito-CP y Mito-Tempol genera aumento de la producción de ROS en mesotelioma (137), carcinoma medular de tiroides (58), cáncer de seno (139) entre otros (139). En la actualidad se conoce que los mito-compuestos inhiben la bionergética mitocondrial, pero no es claro el mecanismo y papel que juega ROS en este proceso.

La activación de ciertos oncogenes, como Ras, lideran el incremento en la producción de oxidantes celulares, una respuesta metabólica que en la mayoría de los tejidos sanos conllevaría a la senescencia celular (206). Es bien conocido que las células tumorales evaden la senescencia y toleran incrementos constitutivos en la producción de oxidantes celulares, a través de la pérdida de puntos de control o

respuestas adaptativas, entre las que se incluyen el aumento de la producción de enzimas antioxidantes. En mesotelioma por ejemplo, el aumento del estado oxidativo esta acompañado de una respuesta adaptativa aumentando los antioxidante mitocondriales TR2-TRX2-PRX3 (207), permitiendo un incremento de la proliferación y evasión de la apoptosis por un cambio del estado redox en favor de la vía pro-proliferación mediada por oxidantes sin activación de las vías pro-apoptóticas. Por ende, una desregulación de la cascada antioxidante, o aumento de los niveles de superóxido conllevan a niveles intolerables de oxidantes con la consiguiente muerte celular (137). En cáncer gástrico se demostró que el aumento de ROS y la disrupción del potencial de membrana indujo la supresión de la fosforilación de ERK y activación de caspasa 3. Adicionalmente, demostraron que la inhibición de la producción de ROS prevenía la supresión de ERK (196). Así como, en reportes previos se observó que Mito-CP inhibe la fosforilación de ERK en cáncer medular de tiroides (58).

Dados los antecedentes planteados, procedimos a evaluar (data preliminar) el estado de activación de ERK encontrando una inhibición dosis dependiente de la fosforilación de ERK1/2 a 48 horas del tratamiento con Mito-SG1 en la línea celular MDA-MB-468 (Figura II- 21). Por lo cual nos planteamos la hipótesis del potencial papel del aumento de ROS por el tratamiento con Mito-SG1, en la regulación negativa de la vía Ras/MEK/ERK, como uno de los mecanismos antitumorales del compuesto. La vía ERK es activada por MEK, cuya activación es mediada por Raf. Raf, es una MAP3K, activada por Ras-GTPasa, que a su vez es inducida por los receptores tirosin-kinasa, tales como EGF (208). La señalización de Ras es una importante vía de transducción celular, frecuentemente activada en cáncer y que media procesos de estrés oxidativo, regulación del ciclo celular, proliferación y apoptosis. Por ende, se plantea para futuras investigaciones dos interesantes hipótesis del potencial rol de la via Ras/MEK/ERK en la actividad antitumoral de Mito-SG1.

A pesar de los hallazgos del rol de ROS durante el proceso tumorigénico en células pro-oncogénicas Kras positivas (8), es claro que, este varía dependiente del tipo celular, estadio, condiciones nutricionales, así como, disponibilidad de oxígeno. Por otra parte se ha demostrado recientemente una nueva ruta de inhibición de la vía Ras/MEK/ERK, mediada por JNK en respuesta a estrés celular (209). Esta ruta al parecer es dependiente del contexto y presenta una naturaleza dual. Cuando el estrés generado es irreversible, se bloquea la activación de Ras, promoviendo por medio de ERK la activación de la apoptosis ante la falta de señales de supervivencia y crecimiento. Cuando el estrés es transitorio, JNK podría funcionar como una señal de punto de control, asegurando que el estrés y el daño inducido haya sido solucionado, antes de permitir que las células respondan a las señales de crecimiento inducidas por Ras. Es así como en nuestra primera hipótesis planteamos que: ¿Puede Mito-SG1 por medio del aumento del estrés oxidativo, activar JNK y mediar la inhibición de la fosforilación de ERK e inducir apoptosis, a través de la modulación de Ras?

Nuestra segunda hipótesis se origina con base en el estudio publicado del fármaco anfifílico catiónico clorpromazina (CPZ) (210). Se observó que CPZ reduce la asociación de K-Ras con la membrana plasmática aumentando el pool citoplasmático del K-Ras. Como es sabido, K-Ras debe anclarse a la membrana plasmática para interactuar con los receptores tirosin kinasa y mediar de esta forma la migración y crecimiento celular. Si se inhibe el anclaje de K-Ras, se genera inhibición de la vía Ras/MEK/ERK con la consecuente regulación negativa de esta vía de supervivencia y crecimiento celular tumoral. Este efecto al parecer es generado por las interacciones electrostáticas del compuesto. La CPZ es una fenotiazina anfipática catiónica, empleada como droga neuroléptica en tratamiento de esquizofrenia y alivio de los síntomas en cáncer terminal. En cultivos celulares, la CPZ afecta la forma y composición de la membrana plasmática. En eritrocitos la parte hidrofóbica de CPZ se inserta en la membrana interna, mientras que su parte catiónica interactúa electrostáticamente con los fosfolípidos cargados negativamente, alterando las propiedades fisicoquímicas de la membrana. Por ende, proponemos que el agente catiónico Mito-SG1 puede alterar las características físico-químicas de la membrana plasmática generando una inhibición del anclaje de Ras y, por ende, logrando una inhibición de la vía.

Gracias a la presente propuesta se abren numerosas alternativas de investigación que redireccionan el campo de estudio de la actividad antitumoral de los mito-compuestos, así como se propone una novedosa alternativa para el tratamiento de cáncer de seno triple negativo.

3.4 POTENCIAL SINERGICO DE MITO-SG1 CON LAS TERAPIAS CONVENCIONALES

El tratamiento de TNBC sigue siendo un desafío, las opciones actuales son restrictivas y los agentes antitumorales empleados presentan una gran toxicidad y peligrosos efectos colaterales. Mito-SG1, además de ser un compuesto selectivo, podría utilizarse simultáneamente con las terapias actualmente aprobadas para TNBC (como doxorrubicina), con el objeto de: potencializar los efectos citotóxicos sobre las células tumorales; minimizar la dosis efectiva de la quimioterapia; y, por consiguiente, reducir los efectos adversos.

En el presente estudio se determinó por medio del método de Chou y Talalay el potencial sinérgico de Mito-SG1 con doxorrubicina y 2DG. Se eligió el método de Chou-Talalay para la evaluación de combinación de drogas, el cual se encuentra basado en la ecuación de efecto-medio derivada del principio de ley de acción de masas. Este principio es considerado como una teoría unificada, que provee un link común entre una entidad singular y múltiples entidades. Esta ecuación general incorpora las ecuaciones de área de bioquímica y biofísica de Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch y Scatchard. El índice de combinación resultante (CI, por sus siglas en inglés Combination Index) del teorema de Chou-Talalay ofrece una definición cuantitativa para efecto aditivo ($CI=1$), sinergismo ($CI<1$) y antagonismo ($CI>1$) en combinaciones de drogas. Adicionalmente y siguiendo las recomendaciones de Chou (176) para el análisis del potencial sinérgico de dos compuestos, se evaluaron los isobologramas IC_{50} , IC_{75} e IC_{90} y el IRD de cada fracción afectada analizada. Este método es diferente de otros publicados en la literatura biomédica, porque usa parámetros cuantitativos como la potencia, forma y conformidad de la data con el principio de la ley de acción de masas; y su aplicación se puede dar con un número bajo de puntos para la curva de dosis respuesta.

La doxorrubicina es un agente intercalante del ADN cuyo mecanismo de acción no está claramente definido. Existen dos mecanismos propuestos, el primero, debido a que doxorrubicina es un intercalante del ADN se cree que interrumpe la reparación del ADN por no permitir el paso de la topoisomerasa II; segundo, generación de radicales libres y su consecuente daño a la membrana celular, ADN y proteínas (211). En resumen, la doxorrubicina se oxida a semiquinona, un metabolito que es inestable, el cual se convierte de nuevo a doxorrubicina en un proceso que libera ROS. ROS conduce la peroxidación de lípidos de membrana, oxidación del ADN y desencadena vías apoptóticas de muerte celular. Al evaluar el potencial uso de Mito-SG1 con doxorrubicina encontramos que, a pesar de no encontrar sinergismo en todas las dosis (IC_{50} , IC_{75} e IC_{90}), la interacción entre Mito-SG1 y doxorrubicina genera un IRD (Tabla II- 8) mayor a 1 a dosis citotóxicas hasta del 90%, lo que

significa que se logra disminuir la dosis de ambos compuestos para lograr el mismo efecto terapéutico deseado con una disminución de los efectos colaterales. La reducción en la dosis de Mito-SG1 debida a doxorubicina oscila entre 1.93 a 53 veces; mientras que la reducción de la dosis de doxorubicina, entre 1.29 a 15 veces.

Por otra parte, recientes investigaciones en el desarrollo de alternativas terapéuticas se han enfocado en explotar las diferencias bioquímicas en el metabolismo de las células tumorales y las normales (172). Se han estudiados diversos agentes que inhiben la glicólisis en sistemas celulares y en modelos animales con resultados positivos; sin embargo, son pocos los resultados similares en humanos, la mayoría debido a los efectos adversos a la dosis-límite utilizada (173). Uno de los compuestos anti-glicolíticos más frecuentemente utilizados es el compuesto 2-deoxy-D-glucosa (2-DG), el cual es fosforilado por las hexoquinasas y subsecuentemente inhibe la síntesis de ATP por la vía glicolítica. No obstante, debido a la alta concentración de 2DG donde logra la inhibición de la producción del ATP (~20 mmol/L), la eficacia del tratamiento se ha visto limitada por la toxicidad sistémica presentada en los ensayos clínicos para el tratamiento de glioma (174). En el presente estudio se encontró que Mito-SG1 presenta efectos sinérgicos con 2DG a un ratio de 1:1000, demostrado por el CI (Tabla II- 7), isoblograma (Figura II- 44) y el IRD (Tabla II- 9) para las dos líneas celulares de TNBC evaluadas, soportando el potencial uso de terapias mixtas moduladoras del metabolismo para el tratamiento de TNBC. El uso combinado de mito-compuesto con agentes antiglicolíticos, es una potencial estrategia para hipersensibilizar las células tumorales debido a la doble inhibición de las vías (respiración celular y glicólisis), constituyéndose en una prometedora estrategia terapéutica dado el potencial sinérgico de Mito-SG1 con 2DG observado en TNBC.

CONCLUSIONES

1. Mito-SG1, más no sus compuestos parentales SG1 y TPP, induce de forma dosis dependiente efectos citotóxicos en las líneas celulares de TNBC y no TNBC. Mito-SG1 inhibe la proliferación celular, la habilidad para la formación de colonias, la migración, e induce muerte celular a concentraciones micromolares en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 y T47D, más no en la línea celular de epitelio mamario sano MCF10A.
2. Mito-SG1 induce apoptosis como mecanismo de muerte celular, determinado por cambios dependientes de la concentración en el potencial de membrana mitocondrial, así como, condensación nuclear, traslocación de fosfatidil serina y activación de caspasas 3/7.
3. La represión de la función bioenergética de la mitocondria y consiguiente estimulación del metabolismo glicolítico, es una característica del tratamiento con Mito-SG1 y es dependiente de la concentración y tiempo de exposición del compuesto. Mito-SG1 induce una disminución dosis dependiente del índice bioenergético celular, afectando la habilidad de las células tumorales para responder a requerimientos energéticos tanto a nivel basal, como en condiciones de estrés energético, características requeridas para la supervivencia de la célula tumoral.
4. El uso combinado de mito-compuesto con agentes antiglicolíticos, es una potencial estrategia para hipersensibilizar las células tumorales con el uso combinado de inhibidores mitocondriales como Mito-SG1 y 2DG. La doble inhibición de las vías se propone como una prometedora estrategia terapéutica dado el potencial sinérgico de Mito-SG1 con 2DG observado en TNBC a una razón de 1:1000.
5. Mito-SG1 potencia los efectos antitumorales de doxorubicina a concentraciones equimolares, logrando una reducción de la dosis y, por ende, de la toxicidad del compuesto en las células no tumorales. Mito-SG1 podría retrasar la inducción de la Resistencia a doxorubicina por el aumento de superóxido e inducción de apoptosis.
6. TNBC no es una sola entidad, presenta diferente comportamiento tanto a nivel basal como en respuesta a Mito-SG1, lo que indica la necesidad de estudiar individualmente cada paciente para establecer tratamientos personalizados que mejoren la respuesta y sobrevida.

RECOMENDACIONES

Debido a los efectos observados de Mito-SG1 sobre el metabolismo mitocondrial, es necesario evaluar el rol del importante regulador energético AMPK en la inhibición de la respiración acoplada y, por ende, en la producción de ATP. AMPK reprime la expresión del factor de transcripción FOXM1, por la vía de señalización AKT/FOXO3 liderando regresión del crecimiento celular de cáncer cervical. Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con MitoCP inhibe FOXM1 en cáncer de pulmón. El Dr Kalyanaraman, propone una posible vía de acción de los mito-nitróxidos como Mito-CP, en la cual se activa AMPK y se disminuye la expresión de FOXM1, subrayando la importancia de la vía AKT/FOXO3/FOXM1 como potencial blanco terapéutico.

Por otra parte, es importante evaluar el rol del estrés oxidativo, determinando el efecto de Mito-SG1 sobre peróxido de hidrógeno, peroxinitritos y niveles de óxido nítrico. Así como, evaluar la vía de las MAP quinasas, debido a que son importantes mediadores celulares en respuesta al estrés oxidativo. Es necesario evaluar la contribución de un circuito de regulación entre JNK y ERK, mediado por ROS, como mecanismo de inhibición de ERK.

Adicionalmente, sería relevante establecer el papel de Ras en la respuesta antitumoral de Mito-SG1. Evaluar la hipótesis de la inhibición del anclaje de Ras a la membrana plasmática y, por ende, ruptura de la señal de supervivencia generada por la vía Ras/RAF/MEK/ERK.

En la evaluación de la potencialidad de Mito-SG1 en TNBC, es fundamental pasar de los estudios *in vitro*, a los estudios *in vivo*, para evaluar no sólo la actividad antitumoral del compuesto, sino la capacidad de prevenir el desarrollo del proceso tumoral en estadíos tempranos. Dado que Mito-SG1 actúa de manera selectiva, se puede evaluar la posibilidad de que el tratamiento con Mito-SG1 inhiba la formación de tumores en modelos *in vivo*, al lograr un desequilibrio energético en las células tumorales en etapas tempranas.

PERSPECTIVAS

Mito-SG1 es un compuesto que tiene una amplia proyección en diferentes tipos de cáncer donde se encuentre hiperpolarizada la membrana asegurando la acumulación selectiva del compuesto. En la actualidad nuestro grupo se encuentra trabajando en dos tipos de cáncer de mal pronóstico y limitadas opciones de tratamiento como los son: hepatocarcinoma y cáncer gástrico.

Hepatocarcinoma:

El hepatocarcinoma (HCC) se encuentra dentro de las 10 primeras causas de muerte en todo el mundo. Se estiman que 626,000 casos de cáncer hepático son diagnosticados cada año, de los cuales el 96% fallecen. En Colombia el cáncer hepático es la séptima causa más común de cáncer. Debido a que los signos y síntomas aparecen usualmente en etapas tardías, rara vez se diagnostica oportunamente, haciendo difícil una intervención terapéutica a tiempo. Por otra parte, las opciones de tratamiento son limitadas, y a pesar de los esfuerzos, la patología es fatal usualmente dentro los 3 a 6 meses siguientes al diagnóstico. Adicionalmente se caracterizan por su resistencia a la quimioterapia y por la dificultad de la remoción quirúrgica. En la mayoría de los casos diagnosticados tempranamente, el trasplante del órgano aparece como la mejor opción. En consecuencia, el cáncer en Colombia representa un desafío económico para la familia del paciente y para el sistema de seguridad social en salud, haciendo necesario y prioritario la implementación de estrategias que contribuyan a minimizar la incidencia de esta patología.

Por esta razón, en el año 2012 se iniciaron los estudios preliminares de Mito-SG1 en la línea celular HepG2 encontrando una prometedora oportunidad del uso del compuesto en el desarrollo de terapias antitumorales para hepatocarcinoma, siendo aprobada la presentación de los resultados preliminares en la *19th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine*, en San Diego, Ca, EEUU. El trabajo presentado tenía por título: "Cytotoxic Effects of Mitochondria-Targeted Nitroxide Mito-SG1 on Hepatic Cancer Cells". En el 2014 fue aprobada la propuesta titulada "Agentes antioxidantes mitocondriales y sensibilizadores de insulina para el tratamiento de cáncer hepático", por la Fundación Para La Promoción De La Investigación Y La Tecnología, según convenio 201408. Sin embargo, el monto de máximo de apoyo a las propuestas por medio de esta fundación es de 18 millones de pesos. Razón por la cual, dentro del alcance de la propuesta estuvimos limitados para desarrollar experimentos en otras líneas celulares, así como en hepatocitos normales.

En hepatocarcinoma encontramos que Mito-SG1, más no su compuesto parental SG1 inhibe la proliferación celular y la habilidad para formar colonias Figura P- 1.

Adicionalmente encontramos por evaluación de la morfología nuclear con DAPI, evaluación de la traslocación de FS y actividad de caspasas 3/7 (data no presentada), que el mecanismo de muerte celular estimulado por Mito-SG1 fue apoptosis.

Se pudo evaluar en la línea celular HepG2, las implicaciones del compuesto en la bioenergética mitocondrial, observando de la misma forma que en las líneas celulares de TNBC, una disminución dosis dependiente de la tasa de consumo de oxígeno, así como de la máxima capacidad respiratoria y de la respiración acoplada. Como podemos observar en la Figura P- 2, Mito-SG1 a concentraciones de 2 μM logra una fuerte afectación en la tasa de

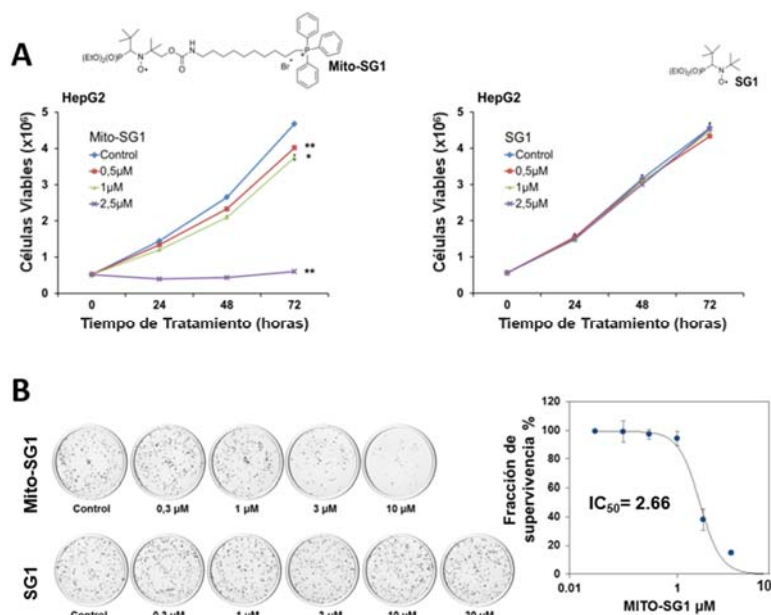


Figura P- 1 Efectos de Mito-SG1 sobre la proliferación celular y clonogenicidad de la línea celular HepG2

A) La línea celular de Hepatocarcinoma HepG2 fue tratada con SG1 o Mito-SG1 (0,5-2,5 μM) por 24, 48 y 72 horas. La densidad celular fue contada con hemocitometro. (n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). B) La habilidad para la formación de colonias de las células de HepG2 fue evaluada posterior al tratamiento por 24 horas a diferentes concentraciones de Mito-SG1 y SG1, y se determinó la eficiencia de la formación de colonias y la fracción de supervivencia para determinar el IC_{50} .

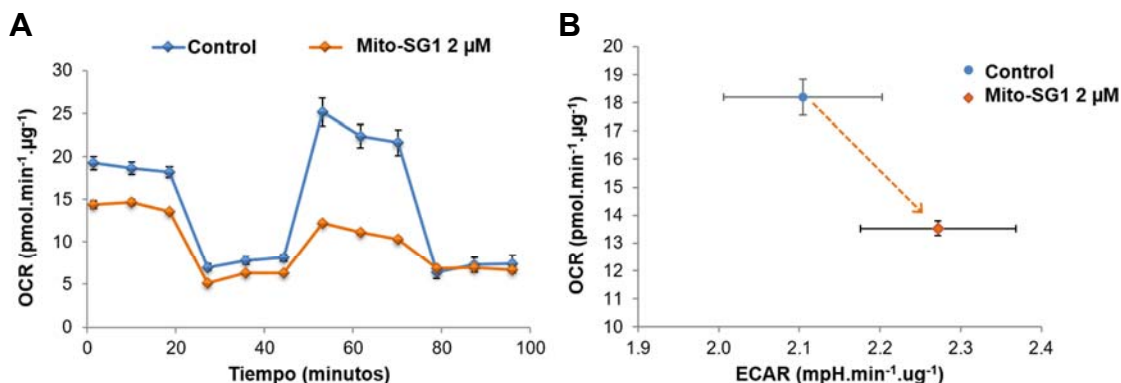


Figura P- 2 Efectos de Mito-SG1 sobre la respiración mitocondrial.

Evaluación de los efectos sobre la respiración mitocondrial del tratamiento por 24 horas de Mito-SG1 sobre la línea celular de HepG2 por medio del test MitoStrest test de Seahorse (bioscience, part of Agilent). A) Comportamiento de la tasa de consumo de oxígeno vs Tiempo. B) Mapa energético.

consumo de oxígeno. En el mapa energético se puede apreciar que el compuesto disminuye la respiración celular y compensa con aumento de glicólisis la demanda energética, de manera similar a lo observado en TNBC.

En hepatocarcinoma vemos un gran potencial del compuesto Mito-SG1, por lo que esperamos en futuras oportunidades conseguir los recursos económicos para financiar el estudio en la línea celular de hepatocarcinoma Hep 3B2.1-7, así como en hepatocitos sanos THLE3.

Cáncer Gástrico:

El Cáncer Gástrico CG es la segunda causa de muerte relacionada, y la cuarta causa de cáncer en el mundo, donde el 70% de los casos se presenta en países en vías de desarrollo, constituyéndose en un problema de salud pública, dada su frecuencia, pobre pronóstico y limitadas opciones de tratamiento. En Colombia, el CG se constituye en la principal causa de mortalidad relacionada con cáncer, por encima de otros tumores con mayor incidencia. Recientes hallazgos evidencian que los tumores difieren en el nivel de expresión de un alto número de genes y mutaciones, incluso entre pacientes con el mismo tipo de tumor. Lo que nos lleva a concluir que, será improbable suprimir el cáncer empleando terapias dirigidas a un único gen o a una sola vía de señalización que pueden diferir entre un paciente u otro, o dentro del mismo tumor. Dado la hiperpolarización de la membrana mitocondrial evidenciada en este tipo de cáncer, así como el aumento de las tasas glicolíticas, se propuso el proyecto “Tratamiento Selectivo de Cáncer Gástrico Afectando la Bioenergética Mitocondrial”, en la convocatoria de Salud 744-2016 de COLCIENCIAS, siendo seleccionado dentro de las mejores 20 propuestas presentadas en el país. El proyecto inicio desarrollo en diciembre del 2016, con vinculación de estudiante de doctorado en ciencias biomédicas, quien actualmente se encuentra vinculado a la Universidad del Valle.

Con este estudio pretendemos ampliar el conocimiento de los mecanismos de acción del compuesto, así como, las vías de señalización que se encuentran reguladas por Mito-SG1. Se pretende sintetizar nuevas muestras de Mito-Met y estudiar los efectos citotóxicos selectivos de los dos compuestos sobre el CG en un modelo *in vitro*. Dado que el cáncer gástrico es la principal causa de mortalidad relacionada en nuestro país, y que las estrategias terapéuticas curativas se limitan a la resección quirúrgica del tumor loco-regional y en estadios tempranos, más del 50% de los pacientes con CG que son diagnósticas en Colombia en etapas tardías, no tienen oportunidad de recuperación.

Como primer objetivo, evaluaremos los efectos apoptóticos de los mitocompuestos, donde esperamos encontrar una citotoxicidad en células de CG (AGS y KATO III) en concentraciones submicromolares, sin afectación en las células sanas. El mecanismo de muerte esperado es apoptosis vía mitocondria, el cual suponemos por estudios previos de compuestos mitocondrio-tóxicos. Para lo cual se espera un

aumento en la liberación de citocromo C al citosol, ó la activación de caspasa 3, así como una prueba de TUNEL positiva, por ruptura del ADN por endonucleasas liberadas del espacio intermembranal mitocondrial, aspecto típico en procesos apoptóticos. Se espera que a concentraciones que inhiban la proliferación celular de las líneas celulares de CG, se logre una inhibición de las características claves de las células cancerosas como son la migración, invasión y formación de colonias.

En el segundo objetivo determinaremos las vías de señalización involucradas, así que una vez evaluado los efectos citotóxicos selectivos de los compuestos, esperamos determinar el papel de la vía de señalización AMPK, dado que la metformina active AMPK, que a su vez regula el metabolismo de ácidos grasos, provocando una inhibición dependiente de la concentración de la actividad del complejo I mitocondrial disminuyendo los niveles de intracelulares de ATP. Siendo la mito-metformina un derivado de la metformina, esta podría interactuar similarmente, por ende, se esperamos encontrar estimulada positivamente la vía de señalización AMPK. Anticipamos posibles efectos en la regulación de las vías Ras-Raf-MEK-ERK (MAPK) como vía utilizada por la célula transformada para su supervivencia y proliferación, así como en la vía PPAR-gamma y PI3-Akt por los dos mito-compuestos.

Es claro el papel de ROS en la célula cancerosa, y como a través del aumento de los antioxidantes la célula cancerosa evade la apoptosis, por ende, creemos que los mito-compuestos pueden romper el equilibrio del estrés oxidativo/respuesta antioxidante, así como la bioenergética mitocondrial, y que este sea el mecanismo por el cual se desencadenen los efectos pro-apoptóticos. Por lo tanto, en nuestro objetivo 3 examinaremos el rol del estrés oxidativo, el cual esperamos se encuentre aumentado, posiblemente a expensas del anión superóxido. También esperamos que se evidencie una disminución en la glicólisis y un aumento de la respiración mitocondrial, logrando una despolarización de la membrana y la desestabilización de la célula cancerosa.

Por último, por medio de la prueba de citotoxicidad MTT y siguiendo el método Chou-Talalay, anticipamos sinergia en la respuesta celular de CG a diferentes concentraciones de los mitocompuestos con los agentes citotóxicos utilizados en la quimioterapia convencional. Esperamos que los compuestos doxorubicina y sorafenib tengan un CI (coeficient index) menor de 1, calculado por el software Calcsyn, lo que se interpreta como sinergia entre los compuestos dada nuestra experiencia previa en líneas celulares de hepatocarcinoma y cáncer de seno. Se espera alguna interacción entre los mitocompuestos y 5-fluoruracilo, actual compuesto clave en la mayoría de terapias multimodales empleadas en CG. Con este proyecto esperamos contribuir a la generación de nuevo conocimiento traslacional en el área de las enfermedades crónicas no-transmisibles, específicamente en las temáticas de cáncer gástrico y tratamientos dirigidos a la mitocondria. De comprobar la hipótesis de que los mito-compuestos Mitometformina y Mito-SG1 actúan de forma selectiva afectando la bioenergética mitocondrial, como

se ha evidenciado con otros mito-compuestos y otros tipos de cáncer, generaríamos nuevo conocimiento y una posible oportunidad de tratamiento para los pacientes con CG. Con la ejecución de este proyecto se espera vincular y formar estudiantes de pregrado de Bacteriología o medicina, así como, ya se encuentra en formación el estudiante Giovanni Lineros del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle.

BIBLIOGRAFIA

1. Mirzania M. Approach to the Triple Negative Breast Cancer in New Drugs Area. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2016;10(2):115-9.
2. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2007;7:134.
3. Narod SA, Dent RA, Foulkes WD. CCR 20th Anniversary Commentary: Triple-Negative Breast Cancer in 2015-Still in the Ballpark. *Clin Cancer Res.* 2015;21(17):3813-4.
4. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008;321(5897):1801-6.
5. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807-12.
6. Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC, Jr., Joseph J, et al. Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res.* 2012;72(10):2634-44.
7. Mukhopadhyay P, Horvath B, Zsengeller Z, Zielonka J, Tanchian G, Holovac E, et al. Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(2):497-506.
8. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(19):8788-93.
9. Cheng G, Lopez M, Zielonka J, Hauser AD, Joseph J, McAllister D, et al. Mitochondria-targeted nitroxides exacerbate fluvastatin-mediated cytostatic and cytotoxic effects in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2011;12(8):707-17.
10. Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, et al. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol.* 2006;175(6):913-23.
11. Chacko BK, Srivastava A, Johnson MS, Benavides GA, Chang MJ, Ye Y, et al. Mitochondria-targeted ubiquinone (MitoQ) decreases ethanol-dependent micro and macro hepatosteatosis. *Hepatology.* 2011;54(1):153-63.
12. Biasutto L, Dong LF, Zoratti M, Neuzil J. Mitochondrially targeted anti-cancer agents. *Mitochondrion.* 2010;10(6):670-81.
13. Pathania D, Millard M, Neamati N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(14):1250-75.

14. Correa P, Piazuelo MB. Gastric cancer: The colombian enigma. *Rev Col Gastroenterol*. 2010.
15. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
16. Matesich SM, Shapiro CL. Second cancers after breast cancer treatment. *Semin Oncol*. 2003;30(6):740-8.
17. Liu Y, Tobias DK, Sturgeon KM, Rosner B, Malik V, Cespedes E, et al. Physical activity from menarche to first pregnancy and risk of breast cancer. *Int J Cancer*. 2016;139(6):1223-30.
18. Strasser-Weippl K, Ramchandani R, Fan L, Li J, Hurlbert M, Finkelstein D, et al. Pregnancy-associated breast cancer in women from Shanghai: risk and prognosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149(1):255-61.
19. Hellquist BN, Czene K, Hjalml A, Nystrom L, Jonsson H. Effectiveness of population-based service screening with mammography for women ages 40 to 49 years with a high or low risk of breast cancer: socioeconomic status, parity, and age at birth of first child. *Cancer*. 2015;121(2):251-8.
20. Ramon JM, Escriba JM, Casas I, Benet J, Iglesias C, Gavalda L, et al. Age at first full-term pregnancy, lactation and parity and risk of breast cancer: a case-control study in Spain. *Eur J Epidemiol*. 1996;12(5):449-53.
21. Moorman PG, Havrilesky LJ, Gierisch JM, Coeytaux RR, Lowery WJ, Peragallo Urrutia R, et al. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2013;31(33):4188-98.
22. Zhong S, Jiang T, Ma T, Zhang X, Tang J, Chen W, et al. Association between physical activity and mortality in breast cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol*. 2014;29(6):391-404.
23. Schmid D, Leitzmann MF. Association between physical activity and mortality among breast cancer and colorectal cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2014;25(7):1293-311.
24. Feola A, Ricci S, Kouidhi S, Rizzo A, Penon A, Formisano P, et al. Multifaceted Breast Cancer: The Molecular Connection With Obesity. *J Cell Physiol*. 2017;232(1):69-77.
25. Saxena NK, Sharma D. Multifaceted leptin network: the molecular connection between obesity and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2013;18(3-4):309-20.
26. Myers ER, Moorman P, Gierisch JM, Havrilesky LJ, Grimm LJ, Gbate S, et al. Benefits and Harms of Breast Cancer Screening: A Systematic Review. *JAMA*. 2015;314(15):1615-34.
27. Nichols M. New directions for drug-resistant breast cancer: the CDK4/6 inhibitors. *Future Med Chem*. 2015;7(12):1473-81.
28. Clarke R, Tyson JJ, Dixon JM. Endocrine resistance in breast cancer--An overview and update. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;418 Pt 3:220-34.

29. Fan W, Chang J, Fu P. Endocrine therapy resistance in breast cancer: current status, possible mechanisms and overcoming strategies. *Future Med Chem.* 2015;7(12):1511-9.
30. Blau CA, Ramirez AB, Blau S, Pritchard CC, Dorschner MO, Schmechel SC, et al. A Distributed Network for Intensive Longitudinal Monitoring in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016;14(1):8-17.
31. Telli M. Evolving treatment strategies for triple-negative breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2015;13(5 Suppl):652-4.
32. Chekhun VF, Zhylchuk VE, Lukyanova NY, Vorontsova AL, Kudryavets YI. Expression of drug resistance proteins in triple-receptor-negative tumors as the basis of individualized therapy of the breast cancer patients. *Exp Oncol.* 2009;31(2):123-4.
33. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(19):10869-74.
34. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(14):8418-23.
35. Heitz F, Rochon J, Harter P, Lueck HJ, Fisseler-Eckhoff A, Barinoff J, et al. Cerebral metastases in metastatic breast cancer: disease-specific risk factors and survival. *Ann Oncol.* 2011;22(7):1571-81.
36. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(8):1275-81.
37. Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel).* 2013;8(2):102-9.
38. Ollila DW, Cirrincione CT, Berry DA, Carey LA, Sikov WM, Hudis CA, et al. Axillary Management of Stage II/III Breast Cancer in Patients Treated with Neoadjuvant Systemic Therapy: Results of CALGB 40601 (HER2-Positive) and CALGB 40603 (Triple-Negative). *J Am Coll Surg.* 2017;224(4):688-94.
39. Golshan M, Cirrincione CT, Sikov WM, Berry DA, Jasinski S, Weisberg TF, et al. Impact of neoadjuvant chemotherapy in stage II-III triple negative breast cancer on eligibility for breast-conserving surgery and breast conservation rates: surgical results from CALGB 40603 (Alliance). *Ann Surg.* 2015;262(3):434-9; discussion 8-9.
40. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2015;33(1):13-21.
41. Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med.* 2015;12(2):106-16.

42. Kwan ML, Quesenberry CP, Jr., Caan BJ. RE: Body Mass Index, PAM50 Subtype, and Outcomes in Node-Positive Breast Cancer: CALGB 9741. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(1).
43. Ligibel JA, Cirrincione CT, Liu M, Citron M, Ingle JN, Gradishar W, et al. Body Mass Index, PAM50 Subtype, and Outcomes in Node-Positive Breast Cancer: CALGB 9741 (Alliance). *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(9).
44. Harris LN, Broadwater G, Abu-Khalaf M, Cowan D, Thor AD, Budman D, et al. Topoisomerase II α amplification does not predict benefit from dose-intense cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil therapy in HER2-amplified early breast cancer: results of CALGB 8541/150013. *J Clin Oncol.* 2009;27(21):3430-6.
45. Pelicano H, Zhang W, Liu J, Hammoudi N, Dai J, Xu RH, et al. Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5):434.
46. Neuzil J, Dong LF, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion.* 2013;13(3):199-208.
47. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Rigoni A, Vacchelli E, et al. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med.* 2010;31(1):1-20.
48. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(6):447-64.
49. Ubah OC, Wallace HM. Cancer therapy: Targeting mitochondria and other sub-cellular organelles. *Curr Pharm Des.* 2014;20(2):201-22.
50. Rohlena J, Dong LF, Neuzil J. Targeting the mitochondrial electron transport chain complexes for the induction of apoptosis and cancer treatment. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(3):377-89.
51. Liberman EA, Topaly VP, Tsofina LM, Jasaitis AA, Skulachev VP. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. *Nature.* 1969;222(5198):1076-8.
52. Porteous CM, Logan A, Evans C, Ledgerwood EC, Menon DK, Aigbirhio F, et al. Rapid uptake of lipophilic triphenylphosphonium cations by mitochondria in vivo following intravenous injection: implications for mitochondria-specific therapies and probes. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(9):1009-17.
53. Dhanasekaran A, Kotamraju S, Karunakaran C, Kalivendi SV, Thomas S, Joseph J, et al. Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(5):567-83.
54. Modica-Napolitano JS, Aprille JR. Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. *Cancer Res.* 1987;47(16):4361-5.
55. Modica-Napolitano JS, Aprille JR. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;49(1-2):63-70.
56. Cai Z, Zhao JS, Li JJ, Peng DN, Wang XY, Chen TL, et al. A combined proteomics and metabolomics profiling of gastric cardia cancer reveals characteristic dysregulations in glucose metabolism. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9(12):2617-28.
57. Miller SM, Goulet DR, Johnson GL. Targeting the Breast Cancer Kinome. *J Cell Physiol.* 2017;232(1):53-60.

58. Starenki D, Park JI. Mitochondria-targeted nitroxide, Mito-CP, suppresses medullary thyroid carcinoma cell survival in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):1529-40.
59. Boyer-Chammard A, Taylor TH, Anton-Culver H. Survival differences in breast cancer among racial/ethnic groups: a population-based study. *Cancer Detect Prev.* 1999;23(6):463-73.
60. Ademuyiwa FO, Olopade OI. Racial differences in genetic factors associated with breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22(1):47-53.
61. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994;266(5182):66-71.
62. Fernandes GC, Michelli RA, Galvao HC, Paula AE, Pereira R, Andrade CE, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget.* 2016.
63. Yao L, Sun J, Zhang J, He Y, Ouyang T, Li J, et al. Breast cancer risk in Chinese women with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;156(3):441-5.
64. Nielsen HR, Petersen J, Krogh L, Nilbert M, Skytte AB. No evidence of increased breast cancer risk for proven noncarriers from BRCA1 and BRCA2 families. *Fam Cancer.* 2016;15(4):523-8.
65. van den Broek AJ, van 't Veer LJ, Hooning MJ, Cornelissen S, Broeks A, Rutgers EJ, et al. Impact of Age at Primary Breast Cancer on Contralateral Breast Cancer Risk in BRCA1/2 Mutation Carriers. *J Clin Oncol.* 2016;34(5):409-18.
66. Carolin KA, Pass HA. Prevention of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;33(3):221-38.
67. Udukala DN, Wang H, Wendel SO, Malalasekera AP, Samarakoon TN, Yapa AS, et al. Early breast cancer screening using iron/iron oxide-based nanoplateforms with sub-femtomolar limits of detection. *Beilstein J Nanotechnol.* 2016;7:364-73.
68. Lamyian M. Improving early detection behavior in women at risk of breast cancer: persuasion-based health monitoring model. *Climacteric.* 2016;19(4):409-10.
69. Trecate G, Sinues PM, Orlandi R. Noninvasive strategies for breast cancer early detection. *Future Oncol.* 2016;12(11):1395-411.
70. Shah C, Arthur DW, Wazer D, Khan A, Ridner S, Vicini F. The impact of early detection and intervention of breast cancer-related lymphedema: a systematic review. *Cancer Med.* 2016;5(6):1154-62.
71. Mantas D, Markopoulos C. Screening mammography: Usefulness beyond early detection of breast cancer. *Atherosclerosis.* 2016;248:1.
72. Allred DC. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2010;2010(41):134-8.
73. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, Olson N, Russo I, Russo J, et al. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod Pathol.* 2005;18(8):1067-78.

74. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Mobus V, et al. 13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (zurich 2013). *Breast Care (Basel)*. 2013;8(3):221-9.
75. Senn HJ. St. Gallen consensus 2013: optimizing and personalizing primary curative therapy of breast cancer worldwide. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(2):101.
76. Falck AK, Ferno M, Bendahl PO, Ryden L. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases--aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial. *BMC Cancer*. 2013;13:558.
77. Rakha E, Ellis I, Reis-Filho J. Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymous? *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):618; author reply -9.
78. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-74.
79. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008;123(1):236-40.
80. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*. 2009;41(1):40-7.
81. Fornier M, Fumoleau P. The paradox of triple negative breast cancer: novel approaches to treatment. *Breast J*. 2012;18(1):41-51.
82. Srinivasaraghavan V, Strobl J, Agah M. Microelectrode bioimpedance analysis distinguishes basal and claudin-low subtypes of triple negative breast cancer cells. *Biomed Microdevices*. 2015;17(4):80.
83. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:61-70.
84. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KC, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4):406.
85. Zaharia M, Gomez H. [Triple negative breast cancer: a difficult disease to diagnose and treat]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2013;30(4):649-56.
86. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
87. Basu S, Chen W, Tchou J, Mavi A, Cermik T, Czerniecki B, et al. Comparison of triple-negative and estrogen receptor-positive/progesterone receptor-positive/HER2-negative breast carcinoma using quantitative fluorine-18 fluorodeoxyglucose/positron emission tomography imaging parameters: a potentially useful method for disease characterization. *Cancer*. 2008;112(5):995-1000.
88. Lim SO, Li CW, Xia W, Lee HH, Chang SS, Shen J, et al. EGFR Signaling Enhances Aerobic Glycolysis in Triple-Negative Breast Cancer Cells to Promote Tumor Growth and Immune Escape. *Cancer Res*. 2016;76(5):1284-96.
89. Nakai K, Hung MC, Yamaguchi H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2016;6(8):1609-23.

90. Kim MJ, Kim DH, Jung WH, Koo JS. Expression of metabolism-related proteins in triple-negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(1):301-12.
91. Ayyasamy V, Owens KM, Desouki MM, Liang P, Bakin A, Thangaraj K, et al. Cellular model of Warburg effect identifies tumor promoting function of UCP2 in breast cancer and its suppression by genipin. *PLoS One*. 2011;6(9):e24792.
92. Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis*. 2005;26(12):2095-104.
93. Lu W, Hu Y, Chen G, Chen Z, Zhang H, Wang F, et al. Novel role of NOX in supporting aerobic glycolysis in cancer cells with mitochondrial dysfunction and as a potential target for cancer therapy. *PLoS Biol*. 2012;10(5):e1001326.
94. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):579-91.
95. Hagland H, Nikolaisen J, Hodneland LI, Gjertsen BT, Bruserud O, Tronstad KJ. Targeting mitochondria in the treatment of human cancer: a coordinated attack against cancer cell energy metabolism and signalling. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(8):1055-69.
96. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
97. Ortega-Molina A, Serrano M. PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(4):184-9.
98. Smith U. PTEN--linking metabolism, cell growth, and cancer. *N Engl J Med*. 2012;367(11):1061-3.
99. Martin PL, Yin JJ, Seng V, Casey O, Corey E, Morrissey C, et al. Androgen deprivation leads to increased carbohydrate metabolism and hexokinase 2-mediated survival in Pten/Tp53-deficient prostate cancer. *Oncogene*. 2016.
100. Chen Z, Wang Y, Warden C, Chen S. Cross-talk between ER and HER2 regulates c-MYC-mediated glutamine metabolism in aromatase inhibitor resistant breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;149:118-27.
101. Snezhkina AV, Krasnov GS, Lipatova AV, Sadritdinova AF, Kardymon OL, Fedorova MS, et al. The Dysregulation of Polyamine Metabolism in Colorectal Cancer Is Associated with Overexpression of c-Myc and C/EBPbeta rather than Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Infection. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2353560.
102. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*. 2012;18(20):5546-53.
103. Kane DA, Anderson EJ, Price JW, 3rd, Woodlief TL, Lin CT, Bikman BT, et al. Metformin selectively attenuates mitochondrial H₂O₂ emission without affecting respiratory capacity in skeletal muscle of obese rats. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(6):1082-7.
104. Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, et al. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(2):246-50.

105. Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension*. 2006;47(6):1183-8.
106. Ban JO, Kwak DH, Oh JH, Park EJ, Cho MC, Song HS, et al. Suppression of NF-kappaB and GSK-3beta is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone. *Chem Biol Interact*. 2010;188(1):75-85.
107. Ong MM, Latchoumycandane C, Boelsterli UA. Troglitazone-induced hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities. *Toxicol Sci*. 2007;97(1):205-13.
108. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes*. 2004;53(4):1052-9.
109. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 2014;510(7506):542-6.
110. Hou X, Song J, Li XN, Zhang L, Wang X, Chen L, et al. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(2):199-205.
111. Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA, Bae-Jump VL. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol*. 2010;116(1):92-8.
112. Kefas BA, Cai Y, Kerckhofs K, Ling Z, Martens G, Heimberg H, et al. Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(3):409-16.
113. Ota S, Horigome K, Ishii T, Nakai M, Hayashi K, Kawamura T, et al. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(2):311-6.
114. Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, Dominiczak MH, Stepinski JK, Angielski S. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(2):268-73.
115. Zordoky BN, Bark D, Soltys CL, Sung MM, Dyck JR. The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: implications for cancer therapy and prevention. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(6):1943-57.
116. Liu H, Scholz C, Zang C, Scheffe JH, Habbel P, Regierer AC, et al. Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro. *Anticancer Res*. 2012;32(5):1627-37.
117. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(20):1938-48.

118. Wahdan-Alaswad R, Fan Z, Edgerton SM, Liu B, Deng XS, Arnadottir SS, et al. Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy. *Cell Cycle*. 2013;12(24):3759-69.
119. Deng XS, Wang S, Deng A, Liu B, Edgerton SM, Lind SE, et al. Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle*. 2012;11(2):367-76.
120. Marini C, Salani B, Massollo M, Amaro A, Esposito AI, Orengo AM, et al. Direct inhibition of hexokinase activity by metformin at least partially impairs glucose metabolism and tumor growth in experimental breast cancer. *Cell Cycle*. 2013;12(22):3490-9.
121. Wahdan-Alaswad RS, Cochrane DR, Spoelstra NS, Howe EN, Edgerton SM, Anderson SM, et al. Metformin-induced killing of triple-negative breast cancer cells is mediated by reduction in fatty acid synthase via miRNA-193b. *Horm Cancer*. 2014;5(6):374-89.
122. Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2002;1(1):3-25.
123. Tronstad KJ, Gjertsen BT, Krakstad C, Berge K, Brustugun OT, Doskeland SO, et al. Mitochondrial-targeted fatty acid analog induces apoptosis with selective loss of mitochondrial glutathione in promyelocytic leukemia cells. *Chem Biol*. 2003;10(7):609-18.
124. Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep*. 2002;3(5):420-5.
125. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*. 2007;401(1):1-11.
126. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*. 2006;25(34):4647-62.
127. Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*. 2006;25(34):4663-74.
128. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*. 2006;10(3):175-6.
129. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999;11(1):1-14.
130. Liu L, Zhang H, Sun L, Gao Y, Jin H, Liang S, et al. ERK/MAPK activation involves hypoxia-induced MGr1-Ag/37LRP expression and contributes to apoptosis resistance in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(4):820-9.
131. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*. 2004;7(2):97-110.
132. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):333-43.
133. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(4):775-94.
134. Zhao Y, Xue Y, Oberley TD, Kiningham KK, Lin SM, Yen HC, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation

by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. *Cancer Res.* 2001;61(16):6082-8.

135. Cheng G, Zielonka J, McAllister D, Tsai S, Dwinell MB, Kalyanaraman B. Profiling and targeting of cellular bioenergetics: inhibition of pancreatic cancer cell proliferation. *Br J Cancer.* 2014;111(1):85-93.

136. Yung MM, Chan DW, Liu VW, Yao KM, Ngan HY. Activation of AMPK inhibits cervical cancer cell growth through AKT/FOXO3a/FOXO1 signaling cascade. *BMC Cancer.* 2013;13:327.

137. Cunliffe B, Benson K, Stumpff J, Newick K, Held P, Taatjes D, et al. Mitochondria-targeted nitroxides disrupt mitochondrial architecture and inhibit expression of peroxiredoxin 3 and FOXO1 in malignant mesothelioma cells. *J Cell Physiol.* 2013;228(4):835-45.

138. Cheng G, Zielonka J, McAllister D, Hardy M, Ouari O, Joseph J, et al. Antiproliferative effects of mitochondria-targeted cationic antioxidants and analogs: Role of mitochondrial bioenergetics and energy-sensing mechanism. *Cancer Lett.* 2015.

139. Cheng G, Zielonka J, McAllister DM, Mackinnon AC, Jr., Joseph J, Dwinell MB, et al. Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death. *BMC Cancer.* 2013;13:285.

140. Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov Today.* 2016;21(1):5-10.

141. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(8):935-46.

142. Dickler MN, Rugo HS, Eberle CA, Brogi E, Caravelli JF, Panageas KS, et al. A phase II trial of erlotinib in combination with bevacizumab in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(23):7878-83.

143. Cobleigh MA, Langmuir VK, Sledge GW, Miller KD, Haney L, Novotny WF, et al. A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 2003;30(5 Suppl 16):117-24.

144. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, et al. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(4):792-9.

145. Robert NJ, Dieras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1252-60.

146. Lang I, Inbar MJ, Kahan Z, Greil R, Beslija S, Stemmer SM, et al. Safety results from a phase III study (TURANDOT trial by CECOG) of first-line bevacizumab in combination with capecitabine or paclitaxel for HER-2-negative locally recurrent or metastatic breast cancer. *Eur J Cancer.* 2012;48(17):3140-9.

147. Cheng G, Zielonka J, Ouari O, Lopez M, McAllister D, Boyle K, et al. Mitochondria-Targeted Analogues of Metformin Exhibit Enhanced Antiproliferative

- and Radiosensitizing Effects in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* 2016;76(13):3904-15.
148. Bertin D, Gimes D, Marque SRA, Tordo P. N-tert-Butyl-1-diethylphosphono-2,2-dimethylpropyl Nitroxide. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
 149. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53(3):661-74.
 150. Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 1978;14(11):911-5.
 151. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2315-9.
 152. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956;103(5):653-66.
 153. Geback T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques.* 2009;46(4):265-74.
 154. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
 155. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(41):15038-43.
 156. Matthews H, Deakin J, Rajab M, Idris-Usman M, Nirmalan NJ. Investigating antimalarial drug interactions of emetine dihydrochloride hydrate using CalcuSyn-based interactivity calculations. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173303.
 157. Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol.* 2011;731:421-34.
 158. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55.
 159. Grootjans S, Hassannia B, Delrue I, Goossens V, Wiernicki B, Dondelinger Y, et al. A real-time fluorometric method for the simultaneous detection of cell death type and rate. *Nat Protoc.* 2016;11(8):1444-54.
 160. Cieciura SJ, Marcus PI, Puck TT. Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues. *J Exp Med.* 1956;104(4):615-28.
 161. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
 162. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
 163. Daniel B, DeCoster MA. Quantification of sPLA2-induced early and late apoptosis changes in neuronal cell cultures using combined TUNEL and DAPI staining. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004;13(3):144-50.

164. Eidet JR, Pasovic L, Maria R, Jackson CJ, Utheim TP. Objective assessment of changes in nuclear morphology and cell distribution following induction of apoptosis. *Diagn Pathol*. 2014;9:92.
165. Cummings BS, Wills LP, Schnellmann RG. Measurement of cell death in Mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012;Chapter 12:Unit12 8.
166. Ghosh A, Kanthasamy A, Joseph J, Anantharam V, Srivastava P, Dranka BP, et al. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2012;9:241.
167. Cheng G, Zielonka J, McAllister D, Hardy M, Ouari O, Joseph J, et al. Antiproliferative effects of mitochondria-targeted cationic antioxidants and analogs: Role of mitochondrial bioenergetics and energy-sensing mechanism. *Cancer Lett*. 2015;365(1):96-106.
168. Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol*. 1992;48(2):122-6.
169. Caicedo A, Fritz V, Brondello JM, Ayala M, Dennemont I, Abdellaoui N, et al. MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Sci Rep*. 2015;5:9073.
170. Smith MR, Vayalil PK, Zhou F, Benavides GA, Beggs RR, Golzarian H, et al. Mitochondrial thiol modification by a targeted electrophile inhibits metabolism in breast adenocarcinoma cells by inhibiting enzyme activity and protein levels. *Redox Biol*. 2016;8:136-48.
171. Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Benavides GA, Mitchell T, Dranka BP, et al. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clin Sci (Lond)*. 2014;127(6):367-73.
172. Barger JF, Plas DR. Balancing biosynthesis and bioenergetics: metabolic programs in oncogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(4):R287-304.
173. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 2006;25(34):4633-46.
174. Dwarakanath BS, Singh D, Banerji AK, Sarin R, Venkataramana NK, Jalali R, et al. Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: present status and future prospects. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2009;5 Suppl 1:S21-6.
175. Kurtoglu M, Lampidis TJ. From delocalized lipophilic cations to hypoxia: blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(1):68-75.
176. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):621-81.
177. Bernal SD, Lampidis TJ, Mclsaac RM, Chen LB. Anticarcinoma activity in vivo of rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye. *Science*. 1983;222(4620):169-72.
178. Manetta A, Gamboa G, Nasser A, Podnos YD, Emma D, Dorion G, et al. Novel phosphonium salts display in vitro and in vivo cytotoxic activity against human ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol*. 1996;60(2):203-12.

179. Rideout DC, Calogeropoulou T, Jaworski JS, Dagnino R, Jr., McCarthy MR. Phosphonium salts exhibiting selective anti-carcinoma activity in vitro. *Anti-cancer drug design*. 1989;4(4):265-80.
180. Rideout D, Bustamante A, Patel J. Mechanism of inhibition of FaDu hypopharyngeal carcinoma cell growth by tetraphenylphosphonium chloride. *Int J Cancer*. 1994;57(2):247-53.
181. Millard M, Pathania D, Shabaik Y, Taheri L, Deng J, Neamati N. Preclinical evaluation of novel triphenylphosphonium salts with broad-spectrum activity. *PLoS One*. 2010;5(10).
182. Ross MF, Filipovska A, Smith RA, Gait MJ, Murphy MP. Cell-penetrating peptides do not cross mitochondrial membranes even when conjugated to a lipophilic cation: evidence against direct passage through phospholipid bilayers. *Biochem J*. 2004;383(Pt. 3):457-68.
183. Zielonka J, Joseph J, Sikora A, Hardy M, Ouari O, Vasquez-Vivar J, et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chemical reviews*. 2017.
184. Ross MF, Prime TA, Abakumova I, James AM, Porteous CM, Smith RA, et al. Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. *Biochem J*. 2008;411(3):633-45.
185. Rao VA, Klein SR, Bonar SJ, Zielonka J, Mizuno N, Dickey JS, et al. The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitquinone. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(45):34447-59.
186. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
187. Pozarowski P, Grabarek J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry of apoptosis. *Current protocols in cytometry*. 2003;Chapter 7:Unit 7 19.
188. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews Cancer*. 2004;4(11):891-9.
189. Masoudi-Nejad A, Asgari Y. Metabolic cancer biology: structural-based analysis of cancer as a metabolic disease, new sights and opportunities for disease treatment. *Seminars in cancer biology*. 2015;30:21-9.
190. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*. 2014;35(3):515-27.
191. Granchi C, Minutolo F. Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *ChemMedChem*. 2012;7(8):1318-50.
192. van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, Marshall AD, Thoeng A, Gao D, et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2016;35(24):3201-8.
193. Visagie MH, Mqoco TV, Liebenberg L, Mathews EH, Mathews GE, Joubert AM. Influence of partial and complete glutamine-and glucose deprivation of breast- and cervical tumorigenic cell lines. *Cell & bioscience*. 2015;5:37.
194. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 2012;21(3):297-308.

195. Chen ZX, Velaithan R, Pervaiz S. mitoEnergetics and cancer cell fate. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(5):462-7.
196. Yu P, Shi L, Song M, Meng Y. Antitumor activity of paederosidic acid in human non-small cell lung cancer cells via inducing mitochondria-mediated apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2017;269:33-40.
197. Danese A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Previati M, Giorgi C, et al. Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochim Biophys Acta*. 2017;1858(8):615-27.
198. Corbet C, Feron O. Cancer cell metabolism and mitochondria: Nutrient plasticity for TCA cycle fueling. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1868(1):7-15.
199. Ma D, Pignatelli C, Tarade D, Gilbert T, Noel M, Mansour F, et al. Cancer Cell Mitochondria Targeting by Pancratistatin Analogs is Dependent on Functional Complex II and III. *Sci Rep*. 2017;7:42957.
200. Woldetsadik AD, Vogel MC, Rabeh WM, Magzoub M. Hexokinase II-derived cell-penetrating peptide targets mitochondria and triggers apoptosis in cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2017;31(5):2168-84.
201. Cui Q, Wen S, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach: recent updates. *Future Med Chem*. 2017;9(9):929-49.
202. Martinez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 1995;77(3):147-61.
203. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194(1):7-15.
204. Pereira EJ, Smolko CM, Janes KA. Computational Models of Reactive Oxygen Species as Metabolic Byproducts and Signal-Transduction Modulators. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:457.
205. Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. 2003;300(5619):650-3.
206. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(12):7936-40.
207. Newick K, Cunliffe B, Preston K, Held P, Arbiser J, Pass H, et al. Peroxiredoxin 3 is a redox-dependent target of thiostrepton in malignant mesothelioma cells. *PLoS One*. 2012;7(6):e39404.
208. Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(12):2707-19.
209. Ritt DA, Abreu-Blanco MT, Bindu L, Durrant DE, Zhou M, Specht SI, et al. Inhibition of Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Signaling by a Stress-Induced Phospho-Regulatory Circuit. *Molecular cell*. 2016;64(5):875-87.
210. Eisenberg S, Giehl K, Henis YI, Ehrlich M. Differential interference of chlorpromazine with the membrane interactions of oncogenic K-Ras and its effects on cell growth. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(40):27279-88.

211. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(7):727-41.

ANEXO 1

**Certificado Beca Doctoral del Programa de Doctorados
Nacionales del Instituto para el Desarrollo de Ciencia y
Tecnología de Colombia COLCIENCIAS
(COLCIENCIAS/Colfuturo 567/2012).**



Libertad y Orden

Departamento Administrativo de
Ciencia, Tecnología e Innovación
Colciencias
República de Colombia

**Prosperidad
para todos**



20125200131441

FFI

Bogotá, D.C., 02/11/2012

LA DIRECTORA DE REDES DEL CONOCIMIENTO DEL DEPARTAMENTO
ADMINISTRATIVO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN - COLCIENCIAS

CERTIFICA:

Que **SANDRA MILENA SANABRIA BARRERA** identificada con c.c. 37.899.528 hace parte del Banco de Financiables de la "Convocatoria nacional para Estudios de Doctorado en Colombia año 2012".

Los candidatos del Banco de Financiables serán beneficiarios de un crédito educativo condonable hasta por 305 millones de pesos, los cuales se encuentran especificados en el numeral 6 FINANCIACIÓN Y CONDICIONES de los términos de referencia de la Convocatoria 567 de 2012.

La ejecución del crédito educativo condonable es hasta máximo de 60 meses, iniciando la financiación a partir del primer semestre de 2013 e incluye los siguientes rubros:

- Matrícula
- Sostenimiento mensual hasta por 6 SMMLV
- Pasantía en el exterior: sostenimiento, seguro médico y tiquete aéreo
- Gastos de presentación y defensa de tesis.

Cordialmente,

SONIA E MONROY VARELA
Directora de Redes del Conocimiento

VoBo: LFGÓMEZ fc

ELABORÓ: YPCARDONA

Carrera 7 B bis N° 132-28
Teléfono: (57-1) 625 8480
Fax: (57-1) 625 1788
Bogotá D.C. - Colombia
www.colciencias.gov.co

ANEXO 2

Certificado presentación poster “Cytotoxic Effects of Mitochondria-Targeted Nitroxide Mito-SG1 on Hepatic Cancer Cells”.



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

**19th Annual Meeting of the
Society for Free Radical Biology and Medicine**

This certifies that

Sandra Milena Sanabria Barrera

**has attended and presented a poster presentation at the 19th Annual Meeting of the
Society of Free Radical Biology and Medicine (SFRBM),
held November 14 - 18, 2012 at the Hilton San Diego Bayfront
in San Diego, CA, USA.**

Lori D. Pearson
Meeting Manager
November 18, 2012

ANEXO 3

Artículo publicado: Abstract “Cytotoxic Effects of Mitochondria-Targeted Nitroxide Mito-SG1 on Hepatic Cancer Cells”.

Chrysin Suppresses Renal Carcinogenesis Via Amelioration of Hyperproliferation, Oxidative Stress and Inflammation: Plausible Role of NF- κ B

Muneeb U Rehman¹, Mir Tahir¹, Farrah Ali¹, Abdul Quaiyoom Khan¹, Rehan Khan¹, Abdul Lateef¹, Oday O Hamiza¹, Wajhul Qamar¹, and Sarwat Sultana¹

¹Jamia Hamdard, India

Flavonoid family is a rich source of polyphenolic compounds and hence possess strong antioxidant and anti inflammatory properties. The aim of this study was to determine the efficacy of chrysin; a bio-active flavonoid as an anticancer agent. Renal cancer was initiated by single intraperitoneal (i.p) injection of N-nitrosodiethylamine (DEN 200 mg/kg BW body weight) and promoted by twice weekly administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) 9mg Fe/Kg BW for 16 wk. In the present study, we report the chemopreventive effects of chrysin against (Fe-NTA) induced renal oxidative stress, Inflammation, hyperproliferative response, and two-stage renal carcinogenesis. To ascertain the molecular mechanism implicated in the antitumor promoting activity of chrysin, its effect was investigated on markers of tumor promotion and inflammation: ornithine decarboxylase (ODC) activity, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), inducible Nitric oxide synthase (iNOS) and Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression, and on levels of proinflammatory cytokines Interleukin-6 (IL-6), Tumor Necrosis factor- α (TNF- α), and Prostaglandin E₂ (PGE₂). Pretreatment of animals with chrysin at both doses (20 and 40 mg/kg body weight) markedly inhibited all. Further, Fe-NTA enhances renal lipid peroxidation, with concomitant reduction in reduced glutathione content (GSH), antioxidant enzymes, and phase II metabolizing enzymes. It induces serum toxicity markers viz, Blood urea nitrogen (BUN), creatinine and Lactate Dehydrogenase (LDH). Prophylactic treatment of animals with chrysin before the administration of Fe-NTA was effective in modulating oxidative and renal injury markers and resulted in the diminution of Fe-NTA mediated injury. These results suggest chrysin as an effective chemopreventive agent having the capability to obstruct DEN initiated and Fe-NTA promoted renal cancer in the rat model.

Keywords: Chrysin, ferric nitrilotriacetate, inflammation and tumor Promotion.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.133

Cytotoxic Effects of Mitochondria-Targeted Nitroxide Mito-SG1 on Hepatic Cancer Cells

Sandra Milena Sanabria-Barrera^{1,2}, Greys Carolina Avila-Rojas^{1,3}, Micael Hardy⁴, Olivier Ouari⁴, and Marcos Lopez^{1,2}

¹Fundación Cardiovascular de Colombia, ²Universidad del Valle, Colombia, ³Universidad de Santander, Colombia, ⁴Universités d'Aix-Marseille, France

Hepatic cancer is the third cause of cancer mortality worldwide. Since signs and symptoms do not usually appear until later stages, it is seldom diagnosed early. Although novel drugs like Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) have shown promise, still, therapies that induce selective toxicity to cancer cells remain a challenge. Mitochondria-targeted nitroxides have been shown to exert selective cytotoxic effects in breast cancer but not in normal cells. Translating the experience obtained in breast cancer, the main objective of this study was to evaluate the anti-cancer properties of a novel mitochondria-targeted nitroxide, Mito-SG1 ((N-tert-butyl-N-[1-diethylphosphono-(2,2-dimethylpropyl)]

nitroxide) conjugated to an alkyl triphenylphosphonium cation, based on the acyclic β -phosphorylated SG1, in hepatic cancer cells. To this end, we first investigated the effects of Mito-SG1 and parent nitroxide SG1 on hepatic cancer cell growth and viability. Mito-SG1 was shown to inhibit HepG2 cell growth at concentrations as low as 2.5 μ M at 24 h. In addition, Mito-SG1 dose-dependently induced apoptosis in HepG2 and Hep 3B cells but not SG1. Also, Mito-SG1 was found to synergize with Sorafenib and doxorubicin enhancing their cytotoxicity in hepatic cancer cells. Taken together, our results suggest that Mito-SG1 could be potentially useful as a novel adjuvant approach to treat hepatic cancer.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.134

Telomerase Regulates the Cellular Response to Oxidative Stress Via Mitochondrial ROS

Paula Green¹, Nilesh Sharma^{1,2}, Andrew Thomas¹, Marcelo Bonini³, and Janine Santos^{1,2}

¹University of Medicine and Dentistry, New Jersey, ²National Institute of Environmental Health Sciences, ³University of Illinois at Chicago

Telomerase is a ribonucleoprotein primarily responsible for telomere maintenance that is a frequent target in cancer therapy. Since the catalytic component of telomerase (TERT) is also mitochondrial, it is anticipated that inhibition of telomerase will not only affect telomere biology but also mitochondrial function. Consistent with this hypothesis, we previously showed that lack of TERT specifically in mitochondria (nucTERT) causes mitochondrial dysfunction and increases basal levels of autophagy (Sharma et al., 2012). Recently, it was demonstrated that inhibition of telomerase in a mouse model led to an initial phase of tumor regression followed by resumption of growth of resistant tumors that, interestingly, had dysfunctional mitochondria (Hu et al., 2012). These findings together with our previous data that cells expressing nucTERT are highly resistant to oxidative stress (Santos et al., 2006) led to the hypothesis that the absence of TERT in mitochondria sets in motion a mitochondrially-driven signaling cascade that eventually allows cells to adapt to stress. Using normal fibroblasts expressing wild type or nucTERT , here we show that this signaling cascade is TERT and mitochondrial ROS-driven, that it involves AMP-activated protein kinase (AMPK) and autophagy, and that it leads to resistance to exogenous oxidative stress. Taken together, our data indicate that inhibition of telomerase for cancer therapy should include evaluation of the subcellular localization of TERT.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.135

Increased Expression of IL-24 mRNA in Murine Mammary Cancer Cells by Palm Tocotrienols

Kanga Rani Selvaduray¹, Ammu K Radhakrishnan², Methil Kannan Kutty³, and Kalanithi Nesaretnam¹

¹Malaysian Palm Oil Board, Malaysia, ²International Medical University, Malaysia ³University Technology Mara, Malaysia

Several mechanisms have been postulated for the anti-cancer effects of tocotrienols. In this study, the anti-cancer mechanism of tocotrienols is for the first time linked to increased expression of interleukin-24 (IL-24) mRNA, a cytokine reported to have anti-tumor effects in many cancer models. The anti-proliferative effects

ANEXO 4

Aprobación proyecto en calidad de Co-Investigadora por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología (2014). Proyecto No. 3371: “Agentes antioxidantes mitocondriales y sensibilizadores de insulina para el tratamiento de cáncer hepático”.

Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología

NIT. 860.056.110-3

F.P.I.T. - 239

Bogotá, D.C., 3 de abril de 2014

Doctora

María Margarita Díaz Martínez

Representante Legal

Fundación Cardiovascular de Colombia

Floridablanca

REF.: Proyecto No. **3371: Agentes antioxidantes mitocondriales y sensibilizadores de insulina para el tratamiento de cáncer hepático**

Apreciada doctora Díaz:

Me refiero a la solicitud de financiación presentado por el doctor *Marcos López Casillas*, para adelantar la investigación de la referencia.

Al respecto me complace informarle que nuestra Junta Directiva, con base en los conceptos emitidos por el Comité Técnico, aprobó financiar su propuesta por un valor total y único de \$18.000.000,00 con una duración de doce (12) meses. Se remiten los comentarios hechos por el comité evaluador, con el propósito de que sean tenidos en cuenta en el desarrollo de la investigación de la referencia.

Para proceder a los trámites administrativos a que haya lugar, le solicitamos hacernos llegar una representación legal actualizada, fotocopia del RUT y de las cédulas de los investigadores.

Estaremos siempre a sus órdenes para colaborar con usted en la exitosa realización de la investigación, conforme a los términos que conjuntamente pactaremos.

Dado que mantendremos con usted una relación contractual de varios meses le solicitamos informarnos oportunamente de cualquier dirección postal, electrónica o telefónica, así como cualquier modificación de sus datos bancarios.

Con un saludo muy cordial.



ROBERTO ORTIZ ENRIQUEZ

Secretario Junta Directiva

c.c. Doctor Marcos López Casillas
Investigador Principal

c.c. Doctora Sandra Milena Sanabria Barrera
Co-Investigador

Carrera 5 No. 11-68 Tels. 343 17 74 – 343 11 11 Exts.: 1959 y 1900 Bogotá D.C., Colombia
e-mail: ortizen@banrep.gov.co

ANEXO 5

**Certificado como CONFERENCISTA 4TO Seminario
Nacional en Ciencias Aplicadas: “Terapias selectivas
contra cáncer hepático y de seno, dirigidas a la
bioenergética mitocondrial”.**



**Universidad
de Santander**
Resolución MinEducación No. 6216 - 22/12/05
UDES

*Sede Administrativa Cra. 29 N° 47-32
PBX. 6434977 Fax. 6436002
Campus Universitario Lagos del Cacique.
Calle 70 N° 55-210
PBX. 6516500 - Fax. 6516492
Bucaramanga - Colombia
Web Site: www.udes.edu.co*

**LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICAS Y NATURALES
UDES**

Certifica que:

SANDRA MILENA SANABRIA BARRERA, asistió en calidad de Conferencista al 4°SEMINARIO NACIONAL DE CIENCIAS APLICADAS, "Avances en Ciencias de la Salud y Biotecnología", realizado los días 12 Y 13 de Mayo en el Campus Universitario Lagos del Cacique de la Universidad de Santander UDES Bucaramanga, con la conferencia Titulada: Terapias selectivas contra Cáncer Hepático y de Seno, dirigidas a la Bioenergética Mitocondrial.

La presente certificación se expide a solicitud de la interesada a los trece (13) días del mes de mayo del 2015

M.Sc, FABIOLA AGUILAR GALVIS

Decana

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

ANEXO 6

Artículo publicado: Abstract “Terapias selectivas contra cáncer hepático y de seno, dirigidas a la bioenergética mitocondrial”.

Innovaciencia 2015; 3 (1)sup 1: 8 - 9

TERAPIAS SELECTIVAS CONTRA CÁNCER HEPÁTICO Y DE SENO, DIRIGIDAS A LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Sandra Milena Sanabria Barrera^{1,2}, Lissette Carolina Sánchez Aranguren^{1,2},
Marcos López Casillas^{1,2,3}, Micael Hardy⁴, Olivier Ouari⁵

Grupo de Investigación. COL 0016944-Grupo de Investigación Biomédica Traslacional. Clasificación COLCIENCIAS: A1

Cómo citar este artículo: Sanabria Barrera SM, Sánchez Aranguren LC, López Casillas M, Hardy M, Olivier Ouari⁵. Terapias selectivas contra cáncer hepático y de seno, dirigidas a la bioenergética mitocondrial. Innovaciencia facultad cienc. exactas fis. naturales. 2015; 3(1) sup 1: 8 - 9

Artículo recibido el 20 de abril de 2015 y aceptado para publicación el 10 junio de 2015

RESUMEN

El Cáncer Hepático o Carcinoma Hepatocelular (HCC) y el Cáncer de Seno Triple Negativo (por sus siglas en inglés TNBC, Triple Negative Breast Cancer), son problemas de salud pública en el mundo, por su difícil tratamiento y alta resistencia a la quimioterapia. En el caso del HCC, dado la aparición tardía de los síntomas y signos de la enfermedad, rara vez se diagnostica a tiempo, siendo fatal dentro de los 3 a 6 meses siguientes a su diagnóstico. TNBC representa aproximadamente el 15-20% de todos los casos de cáncer de mama, y generalmente se considera como el más severo subgrupo, dado que no expresa los genes para los receptores de estrógenos, progesterona y HER2 (por sus siglas en inglés, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), por lo tanto, no responde a la hormonoterapia (como tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa) ni a las terapias dirigidas a los receptores de HER2, como Herceptin (nombre genérico:

trastuzumab), conllevando un mayor riesgo de recaída y una tasa de mortalidad más alta en comparación con otros subtipos de cáncer de mama.

En la actualidad, los fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer, como la doxorubicina, son agentes citostáticos que causan arresto celular, y que inducen apoptosis por aumento de niveles de Bax y p38 MAPK, mediados por la inhibición de Akt. Desafortunadamente, la Doxorubicina, a pesar de sus propiedades contra el cáncer, induce miocardiopatía severa, aparentemente por la inhibición de la Citocromo C oxidasa Subunidad Vb y por aumentar la producción de ROS. Otros enfoques incluyen inhibidores de la vía MAPK kinasa como el Nexavar® (Sorafenib), e inhibidores Tirosin-Kinasa con actividad contra los receptores del factor de crecimiento epidérmico 1 y 2, como el Tacerva® (Erlotinib). Sin embargo,

Palabras clave: Bioenergética, Cáncer hepático, Cáncer de Mama

1. Fundación Cardiovascular de Colombia. Correspondencia: direccioncientificabt@fcv.org

2. Universidad del Valle, Colombia. E-mail: lisette.sanchez@correounivalle.edu.co

3. Profesor Univalle y UDES. Universidad de Santander, Colombia. Email: marcoslopez@fcv.org

4. Assistant Professor. Universites d'Aix-Marseille, France. E-mail: micaelhardy@aol.com

5. Associate Professor. Universites d'Aix-Marseille, France. E-mail: olivier.ouari@univ-amu.fr

ninguno de ellos son eficaces, no sólo porque no son capaces de inhibir totalmente la proliferación tumoral, sino también porque afectan a las células normales conduciendo en la mayoría de los casos a insuficiencia renal aguda y muerte.

Se conoce que tanto el HCC y el TNBC se caracterizan por la disfunción mitocondrial, la glicólisis elevada, el aumento en el metabolismo glutaminólisis, la producción de lactato y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Actualmente, está ampliamente aceptado que el metabolismo mitocondrial está normalmente reprogramado para permitir el crecimiento de células de cáncer y la proliferación. Por ejemplo, la fosforilación oxidativa mitocondrial en el cáncer es esencial para satisfacer la creciente demanda de la biosíntesis de metabolitos necesarios para la proliferación de células tumorales sin restricciones. Del mismo modo, los niveles alterados de ciertos subproductos metabólicos de las mitocondrias, tales como ROS, han sido implicados en la iniciación del tumor y mantenimiento, así como son esenciales para tumorigenicidad mediada por Kras.

Las terapias selectivas dirigidas a la afectación de la bioenergética mitocondrial de HCC y TNBC, se convierten en una estrategia potencial con resultados prometedores. Recientemente hemos sintetizado dos compuestos dirigidos a la mitocondria MTA (Mitochondria Target Agent), MitoSG1 y Mitometformina, cuyos compuestos parenterales son SG1 y Metformina respectivamente, son conjugado a un catión de alkyl triphenylphosphonium. Dado las diferencias del potencial de membrana de las células tumorales, estos compuestos tienen una acumulación selectiva permitiendo su acción directa sobre la mitocondria de las células de HCC y TNBC.

En nuestros resultados preliminares encontramos que MitoSG1 inhibe el crecimiento de la línea celular de HCC HepG2, a concentraciones de $2.5\mu\text{M}$ a las 24 horas de tratamiento. MitoSG1 ejerce efectos citotóxicos con una IC_{50} de $3.6\mu\text{M}$, con intervalos entre $2.28\mu\text{M}$ y $5.9\mu\text{M}$. Adicionalmente MitoSG1 genera una afectación del potencial de membrana a las 24 horas de tratamiento, evidenciando una inducción temprana a apoptosis vía mitocondrial. Por su parte la Mitometformina presentó sobre la línea celular HepG2 una IC_{50} de $358.7\mu\text{M}$, una concentración mayor que la requerida por MitoSG1, concluyendo en HCC que la línea celular es más susceptible al desequilibrio del estado REDOX ocasionado por MitoSG1, que a la posible afectación causada

por la activación de AMPK o inhibición de la Glicerofosfato Deshidrogenasa, ocasionada por Mitometformina.

MitoSG1 genera efectos citotóxicos en las líneas celulares Triple Negativas de seno MDA MB231 y MDA MB468, con IC_{50} que oscilan entre 1 y $2\mu\text{M}$ del compuesto, así como una afectación del potencial de membrana, indicándonos que la mitocondria es su blanco de acción.

MitoSG1 presentó efectos sinérgicos con Erlotinib y Doxorubicina en la línea Celular HepG2, así como un efecto aditivo con Sorafenib. En el caso de MDA MB231, MitoSG1 potencia los efectos citotóxicos de Doxorubicina, sugiriéndonos su potencial uso como coadyuvante del tratamiento.

Aspectos éticos. En el desarrollo de esta investigación no se incluyeron estudios en humano o animales, por lo que su desarrollo no implicó ningún tipo de riesgo y por ende, no le aplican las consideraciones de las Resolución 8430 de 1993. Los experimentos fueron realizados en líneas celulares comerciales.

ANEXO 7

Soporte ponencia oral “Targeting triple-negative breast cancer metabolism and bioenergetics by mitochondria-targeted SG-1 nitroxide (Mito-SG1)”. Evento internacional: 22nd Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine. Noviembre 18-21, Boston, MA, USA.

SFRBM 2015 • Oral Presentation Schedule • Boston, MA

DAY 1: THURSDAY, NOVEMBER 19, 2015

SESSION 1 Diabetes and Metabolic Syndrome

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	Rinesh Godfrey	University Hospital Münster	Hyperglycemia-induced deregulation of thioredoxin system contributes to the functional impairment of monocytes resulting in compromised collagen synthesis
2:50 pm - 3:10 pm	James Galligan	Vanderbilt University	Histones are Major Targets for Modification by Glucose-Derived Methylglyoxal
3:10 pm - 3:30 pm	Rocio Foncea	University of Minnesota	Mitochondrial dysfunction and fragmentation induced by inflammation and oxidative stress is prevented by SERCA2 activation in adipocytes
3:30 pm - 3:50 pm	Amy Hauck	University of Minnesota	Histone carbonylation is a novel redox-regulated epigenomic modification in adipose tissue of obese C57/BL6 mice
3:50 pm - 4:10 pm	Hon-Chi Lee	Mayo Clinic	The Role of Nrf2 Signaling in the Regulation of Vascular BK Channels in Diabetes

SESSION 2 Novel Methods

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	Melissa Kemp	Georgia Institute of Technology	A novel microtubule bound protein reporter for spatial resolution of intracellular oxidation
2:50 pm - 3:10 pm	Murugaeson Kumar	Baylor University	Sulfonamides and Nitrofurantoin: Characterizations of S- and N-based speciation in reactions of GSNO with H ₂ S
3:10 pm - 3:30 pm	Joshua Chandler	Emory University	Quantified Redox Proteomic and Metabolomic Effects of Switching Peroxidase-Derived Oxidants in Human Lung Epithelial Cells
3:30 pm - 3:50 pm	Jacek Zielonka	Medical College of Wisconsin	Spin trapping with fluorescence detection: Novel method for specific and sensitive fluorimetric detection of superoxide radical anion
3:50 pm - 4:10 pm	Troy Langford	MIT	FRET-based Probe for H ₂ O ₂ -induced Peroxiredoxin-2 Oxidation

SESSION 3 Neuroscience

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	Jessica Nichols	University of Alabama at Birmingham	Evaluation of a Catalytic Oxidoreductant in Reducing Oxidative Stress and Neuroinflammation following Repeated Mild Traumatic Brain Injury
2:50 pm - 3:10 pm	Eugenio Barone	Sapienza University of Rome	Biliverdin Reductase-A Inactivation Promotes Insulin Resistance in Alzheimer Disease: A New Paradigm
3:10 pm - 3:30 pm	Willayat Wani	University of Alabama at Birmingham	Role of O-GlcNAcylation in Autophagy, Protein Homeostasis, and Neuronal Bioenergetics
3:30 pm - 3:50 pm	Allan Butterfield	University of Kentucky	Insulin Resistance and Autophagy Dysfunction in Brain in the Progression of Alzheimer Disease: Role of Elevated Oxidative Stress and Link of 1
3:50 pm - 4:10 pm	Fabio Di Domenico	Sapienza University of Rome	OXIDATIVE SIGNATURE OF CSF FROM MILD COGNITIVE IMPAIRMENT AND ALZHEIMER DISEASE PATIENTS

DAY 2: FRIDAY, NOVEMBER 20, 2015

SESSION 4 Cancer and Cell Migration

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	Sandra Sanabria-Barrera	Fundación Cardiovascular de Colombia	Targeting triple-negative breast cancer metabolism and bioenergetics by mitochondria-targeted SG-1 nitroxide (Mito-SG1)
2:50 pm - 3:10 pm	Sanjit Dhar	University of Kentucky	Inhibition of autophagy reveals a novel mechanism by which DNA polymerase gamma (Pol- γ) prevents cancer development
3:10 pm - 3:30 pm	Bartosz Szczesny	The University of Texas Medical Branch	H ₂ S: a supporter of mitochondrial DNA repair and cellular bioenergetics in lung cancer cells
3:30 pm - 3:50 pm	Sophia Park	University of Arizona	The clinical antimalarial mefloquine induces lethal ER and oxidative stress targeting BRAF-kinase inhibitor-resistant malignant melanoma cells
3:50 pm - 4:10 pm	Thomas Leto	NIH, NIAID	Peroxiredoxin 6 (Prdx6) supports NADPH oxidase1 (Nox1)-based reactive oxygen species generation and cell migration

SESSION 5 Inflammation and Immunity

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	Clare Hawkins	Heart Research Institute	The myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid induces extracellular trap formation and promotes the inflammatory response in primary
2:50 pm - 3:10 pm	Adam Speen	University of North Carolina	Ozone-derived Oxysterols and LXR Signaling: An Emerging Mechanism Behind Inflammation in the Human Airway
3:10 pm - 3:30 pm	Adam Case	University of Nebraska	Inverse Regulatory Effects of Mitochondrial Superoxide in Resting and Activated T-lymphocytes
3:30 pm - 3:50 pm	Jeffrey Keenan	Duke University	Mitochondrial Transcription Factor A Heterozygosity Leads to Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Cardiac Injury in <i>S. aureus</i> Sepsis in
3:50 pm - 4:10 pm	Vlad Serbulea	University of Virginia	Oxidized phospholipids control adipose tissue macrophage bioenergetics and inflammatory capacity through a TLR2-Syk-Ceramide dependent

SESSION 6 Cardiovascular Disease

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	Brandon Schickling	The University of Iowa	Coordinated microRNA silencing of Nox4 NADPH oxidase and myocardin regulates smooth muscle cell dedifferentiation in vascular disease.
2:50 pm - 3:10 pm	Sergey Dikalov	Vanderbilt University	The Redox Sensitive Inactivation of Mitochondrial Sirt3, SOD2 Hyperacetylation and Complex I Superoxide Production in Endothelial Dysfunction
3:10 pm - 3:30 pm	Lucia Lopes	University of São Paulo	Redox-dependent interaction between protein disulfide isomerase and p47phox activates Nox1 NADPH oxidase in vascular disease.
3:30 pm - 3:50 pm	Rebecca Charles	Kings College London	Nitro-oleic acid inhibits soluble Epoxide Hydrolase via adduction at Cys521 to provide cardioprotection against ischemia and reperfusion injury
3:50 pm - 4:10 pm	Benoit Boivin	Montreal Heart Institute	Cardiac-specific deletion of protein tyrosine phosphatase 1B exacerbates pressure overload-induced hypertrophy and heart failure in mice

DAY 3: SATURDAY, NOVEMBER 21, 2015**SESSION 7** **Aging & Antioxidants**

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	Akshaya Chandrasekaran	SUNY Polytechnic Institute	Redox-dependent calcium-mediated signaling networks that control the senescence associated secretory phenotype (SASP)
2:50 pm - 3:10 pm	Matthew Campbell	University of Washington - Seattle	Reducing oxidative stress restores thiol proteome and improves energetics and performance in aged mouse skeletal muscle
3:10 pm - 3:30 pm	Matthew Hancock	King's College London	Nox4 regulates exercise performance and cardiac function during acute exercise in mice
3:30 pm - 3:50 pm	Artak Tovmasyan	Duke University	Mn porphyrin-based SOD mimic and vitamin C enhance radiation-induced tumor growth inhibition
3:50 pm - 4:10 pm	Mitchell Coleman	The University of Iowa	Intraarticular Administration of N-Acetylcysteine Prevents Progression of Post-Traumatic Osteoarthritis in a Large Animal Model of Intraarticular

SESSION 8 **Pulmonary Disease**

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	David McMillan	University of Vermont	TLK117-induced GSTP inhibition attenuates TGF- β -induced lung fibrotic remodeling
2:50 pm - 3:10 pm	Yun-Min Zheng	Albany Medical College	Crosstalk between Rieske iron-sulfur protein-mediated mitochondrial ROS and ryanodine receptor-mediated sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ release
3:10 pm - 3:30 pm	Qian Li	University of Alabama at Birmingham	Attenuation of Hyperoxia-Induced Lung Developmental Deficits by Aurothioglucose in Newborn Mice is Associated with Thioredoxin Reducase-1
3:30 pm - 3:50 pm	David Heppner	University of Vermont	A role for DUOX1 and NOX2 in the redox regulation of EGFR signaling in the airway epithelium.
3:50 pm - 4:10 pm	Olga Rafikova	University of Arizona	Reductive stress associated with male gender contributes to the pulmonary hypertension and right ventricle dysfunction

SESSION 9 **Protein Oxidation in Disease**

TIME	PRESENTER	AFFILIATION	ABSTRACT TITLE
2:30 pm - 2:50 pm	Jos van der Velden	University of Vermont	Glutathione S-Transferase P1-catalyzed Protein S-Glutathionylation in lung cancer
2:50 pm - 3:10 pm	Stacey Mont	Vanderbilt University	Identification of isoketal-modified proteins and genes that regulate their formation.
3:10 pm - 3:30 pm	Michael Davies	University of Copenhagen	Reactions of oxidants with disulfide bonds: evidence for selective reactivity at specific sites
3:30 pm - 3:50 pm	Maryam Karimi	Heart Research Institute	Characterisation of the products of disulfide bond oxidation by the inflammatory oxidant hypochlorous acid (HOCl)
3:50 pm - 4:10 pm	Matthew Smith	University of Alabama at Birmingham	Mitochondrial protein thiols control metabolism by modulating activity and levels of key metabolic enzymes

ANEXO 8

Artículo publicado: Abstract “Targeting triple-negative breast cancer metabolism and bioenergetics by mitochondria-targeted SG-1 nitroxide (Mito-SG1)”.

abnormal clonal plasma cells in the bone marrow. Despite recent advancements in anti-myeloma therapies, MM remains an incurable disease with only a slight increase in the median survival rate to 5 years. Therefore, more effective therapies are needed. Antioxidant molecules are upregulated in many human cancers, correlating with tumor proliferation, survival, and drug-resistance and therefore, have been suggested as potential therapeutic targets. This study investigated the cross-talk between two major antioxidant molecules, thioredoxin reductase 1 (TrxR1) and heme oxygenase-1 (HO-1), and their therapeutic implications in MM. We found that TrxR1 levels are upregulated in MM cells compared to normal cells. We therefore tested the effect of TrxR1 inhibition using a specific inhibitor, auranofin, on MM cell growth. Although auranofin significantly inhibited TrxR1 activity at the lower concentrations, MM cell proliferation was only inhibited at the higher concentrations of auranofin. Interestingly, inhibition of TrxR1 activity upregulated another oxidative stress-responsive protein, HO-1, which has been shown to act as a secondary anti-apoptotic protein in other cancers. Inhibition of TrxR1 in conjunction with HO-1 significantly inhibited MM cell growth and induced apoptosis. Thus, HO-1 acts as a secondary anti-apoptotic mechanism in MM. Results showed that TrxR1 regulates HO-1 via the Nrf2 signalling pathway. These findings indicate that TrxR1 alone or in conjunction with HO-1 may serve as an effective therapeutic target to treat MM. Hence, this research highlights how understanding the cross-talk between these antioxidant systems may help in designing more effective therapeutic strategies to cure MM.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.188

148

Chrysin Attenuates 5- Fluorouracil Induced Renal Toxicity: Possible Role of Oxidative Stress and Apoptosis

Summya Rashid¹ and Sarwat Sultana¹
¹Jamia Hamdard, India

5-Fluorouracil (5-FU) is an effective anticancer drug commonly used for the treatment of various malignancies. It has varied undesirable effects such as hepatotoxicity, nephrotoxicity and cardio toxicity which limit its broad and widespread clinical practice. It is found to result in remarkable organ toxicities along with increased oxidative stress and apoptosis. Chrysin (CH) is a natural flavonoid having anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-cancerous activities. It is found in many plant extracts, blue passion flower, honey and propolis. The present study was designed to investigate the efficacy of CH against 5-FU induced renal toxicity in Wistar rats by biochemical, histopathological and immunohistochemical approaches.

Rats were subjected to prophylactic oral treatment of CH for 21 days at a lower dose of 50mg/kg b.wt. and a higher dose of 100mg/kg b.wt. against renal toxicity induced by single intra peritoneal injection of 5-FU (150 mg/kg bwt). The probable mechanism of 5-FU induced renal toxicity is the generation of free radicals resulting in oxidative stress; activation of apoptotic pathway by upregulation of p53, bax, caspase-3 and down regulating Bcl-2. On the contrary, prophylactic treatment of CH decreased renal serum toxicity markers, increased renal anti-oxidant armory as well as regulated apoptosis in kidneys of Wistar rats. Histopathological alterations further confirmed the biochemical and immunohistochemical data. Hence, results of the present finding suggest that CH may be a positive modulator in alleviating 5-FU induced renal toxicity and may be used in combinational therapy before further pre-clinical and clinical testing.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.189

149

Targeting Triple-Negative Breast Cancer Metabolism and Bioenergetics by Mitochondria-Targeted SG-1 Nitroxide (Mito-SG1)

Sandra Milena Sanabria-Barrera^{1,2}, Lissette Carolina Sanchez-Aranguren^{1,2}, Cindy Tatiana Espinosa-Gonzalez¹, Laura Maria Gonzalez-Ortiz¹, Micael Hardy³, Olivier Ouari³, and Marcos Lopez^{1,2}
¹Cardiovascular Foundation of Colombia, Santander, Colombia, ²Universidad del Valle, Cali, Colombia, ³Aix Marseille Université, France

Triple-negative breast cancer (TNBC), are aggressive forms of breast cancer that are negative for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression and do not respond well to chemotherapy. Thus, still an unmet challenge is to develop selective, safe and clinically useful therapies to treat TNBC. Recently, it has been reported that TNBC is characterized by mitochondrial dysfunction, elevated glycolysis, and increased generation of reactive oxygen species (ROS) as compared to receptor positive breast cancer cells. Thus, a viable strategy to treat TNBC is by targeting the biochemical differences between cancer and normal cell metabolism and mitochondrial bioenergetics with mitochondria-targeted nitroxides (MTNs). MTNs have been shown to exert selective cytotoxic effects in breast cancer but not in normal cells. To this end, we analyzed the mitochondrial bioenergetics effects of Mito-SG1 [(N-tert-butyl-N-[1-diethylphosphono-(2,2-dimethylpropyl)] nitroxide conjugated to an alkyl triphenylphosphonium cation, in TNBC (MDA MB231 and MDA MB468), non-TNBC (MCF7 and T47D) and normal breast epithelial cells (MCF-10A). We found that Mito-SG1 selectively induced a dose dependent inhibition of cell viability and growth in TNBC and non-TNBC cells but not in normal MCF-10A cells. Treatment with Mito-SG1 also induced a concentration dependent change in mitochondrial membrane potential as measured by JC-1 flow cytometry and an increase in superoxide production detected by Mito-Sox fluorescence in TNBC. In addition, using a Seahorse Biosciences XFe24 extracellular flux analyzer, we established that Mito-SG1 induced a dose dependent decrease in oxygen consumption rate (OCR), maximal respiration and spare respiratory capacity in TNBC and non-TNBC cells. We also discovered that treatment with Mito-SG1 prompted a switch in both TNBC baseline and stressed metabolic phenotypes suggesting that it impaired the cells ability to meet their energetic demands for survival by targeting mitochondrial OCR. Also, Mito-SG1 was found to synergize with current TNBC treatment doxorubicin (DOX), enhancing its toxicity at submicromolar concentrations. Our results demonstrate that mitochondria-targeted nitroxide Mito-SG1 could be used as a novel alternative for the treatment of triple negative breast cancers.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.190

150

The Selective Toxicity of Pharmacological Ascorbate Is Mediated by Alterations in Iron Metabolism

Joshua D Schoenfeld¹, Zita A. Sibenaller¹, Claire M. Doskey¹, Kranti A. Mapuskar¹, Kalpaj R. Parekh¹, John C. Keech¹, Joseph J. Cullen¹, Garry R. Buettner¹, Douglas R. Spitz¹, and Bryan G. Allen¹
¹University of Iowa, USA

ANEXO 9

**Travel Award Society for Redox Biology and Medicine,
Noviembre 2 de 2015.**

The Officers and Council of the



are pleased to recognize

Sandra Milena Sanabria-Barrera

as a recipient of a

TRAVEL AWARD

Established in 1987, the Society for Redox Biology and Medicine is a professional organization comprised of scientists and clinicians with an interest in the research and medical applications of free radical chemistry, redox biology and antioxidants.

November 21, 2015

Date

Neil Hogg Ph.D., President

ANEXO 10

**Soporte Travel Award Seahorse Bioscience,
Noviembre 2015.**

Zimbra:

sandrasanabria@fcv.org

Seahorse Travel Award!

De : Naomi Goumillout
<NGoumillout@seahorsebio.com>

jue, 05 de nov de 2015 10:15

Asunto : Seahorse Travel Award!

Para : sandrasanabria@fcv.org

Dear Sandra,

On behalf of Seahorse Bioscience, I am delighted to advise that you are being awarded a \$900 Seahorse Travel Award for your presentation - Targeting Triple-Negative Breast Cancer Metabolism and Bioenergetics by Mitochondria-Targeted SG-1 - to be presented at the conference: Targeting Triple-Negative Breast Cancer Metabolism and Bioenergetics by Mitochondria-Targeted SG-1 Nitroxide (Mito-SG1) being held Nov 20, 2015 in Boston, MA.

Well done! Your work meets our goal of enabling new discoveries on the role of cellular bioenergetics in pathophysiology. We look forward to uploading your presentation to our web site.

To process your travel award, please could you supply the following bank information so that we can wire you the funds.

* Beneficiary Full Name:

* Beneficiary Home Address:

* IBAN#

* BIC/ABA/Swift#:

* Bank Name:

* Bank Account Number

* Bank City & Province:

* Bank Country:

Again, congratulations!

Regards,
Naomi

Naomi Goumillout | Marketing Communications Manager | **Seahorse Bioscience, a part of Agilent Technologies** | +1 978 671 1619

ANEXO 11

Ponencia Oral sometida “Targeting Triple-Negative Breast cancer Metabolism and Bioenergetics by Mitochondria-Targeted SG-1 Nitroxide (Mito-SG1): Effects Beyond Mitochondria” Evento Internacional: Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies. Septiembre 24-28 de 2017. Split, Croacia.

Targeting Triple-Negative Breast Cancer Metabolism and Bioenergetics by Mitochondria-Targeted SG-1 Nitroxide (Mito-SG1): Effects Beyond Mitochondria

Sanabria-Barrera SM^{1,2}, Hardy M³, Ouari O³, Lopez M^{1,2}

¹*Translational Biomedical Research Group, Cardiovascular Foundation of Colombia, Carrera 5a No. 6-33, Floridablanca, Santander, Colombia*

²*Graduate Program of Biomedical Sciences, Faculty of Health, Universidad del Valle, Calle 4B No. 36-00, Cali, Colombia, Cali, Colombia*

³*Aix Marseille Univ, CNRS, ICR, Equipe SREP, Marseille, France*

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a hard-to-kill form of breast cancer that is negative for estrogen (ER), progesterone (PR), and human epidermal growth factor receptors (HER2) expression. Currently, there is no efficient therapy for TNBC. However, TNBC is characterized by mitochondrial dysfunction, elevated glycolysis, and increased generation of reactive oxygen species (ROS) as compared with receptor positive breast cancer cells. Then, targeting the biochemical differences between cancer and normal cell metabolism and mitochondrial bioenergetics with mitochondria-targeted nitroxides (MTNs) is a viable strategy. MTNs have been shown to exert selective cytotoxic effects in breast cancer but not in normal cells [1]. Here, we tested the cytotoxic effects of Mito-SG1 [(N-tert-butyl- N-[1-diethylphosphono-(2,2-dimethylpropyl)] nitroxide conjugated to an alkyl triphenylphosphonium cation, in TNBC and normal breast epithelial cells. Mito-SG1 selectively induced a dose-dependent inhibition of cell viability and growth in TNBC and non-TNBC cells but not in normal MCF-10A cells [2]. Treatment with Mito-SG1 also induced a concentration-dependent change in mitochondrial membrane potential and an increase in ROS production. We also established that Mito-SG1 targets mitochondria inducing a decrease in oxygen consumption rate (OCR), maximal respiration and spare respiratory capacity in TNBC and non-TNBC cells. We also discovered that treatment with Mito-SG1 prompted a switch in both TNBC baseline and stressed metabolic phenotypes, suggesting that it impaired the cells' ability to meet their energetic demands for survival by targeting mitochondria. Interestingly, we also found that Mito-SG1 effects are beyond targeting mitochondria. Treatment of TNBC cells demonstrated that Mito-SG1 also impacts the Ras-MEK-ERK pathway, preventing downstream phosphorylation of kinases. Our results demonstrate that mitochondria-targeted nitroxide Mito-SG1 could be used as a novel alternative for the treatment of TNBC and that its effects are beyond targeting mitochondria.

Acknowledgements: This work was supported by a grant from the Research Foundation of the Bank of the Republic of Colombia grant 201408 (ML).

[1] Zielonka J et al., Chem. Rev., 2017 Jun 27. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00042.

[2] Sanabria-Barrera SM et al., Free Radic. Biol. Med. 87, Supplement 1:S72, 2015.

ANEXO 12

**Proyecto aprobado Convocatoria de Salud de
COLCIENCIAS Conv 744-2016**

**“Tratamiento selectivo de cáncer gástrico afectando la
bioenergética mitocondrial”. Investigadora principal**

Sandra Milena Sanabria Barrera.

Código SIGP 65667155040.



20161100148391

SG

Bogotá, D.C., 9-12-2016

Doctora

MARIA MARGARITA DIAZ MARTINEZ

Representante Legal

FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA

Calle 155A No. 23-58 El Bosque Sector E-1

Floridablanca - Santander

Referencia: Legalización Contrato No. 729 de 2016

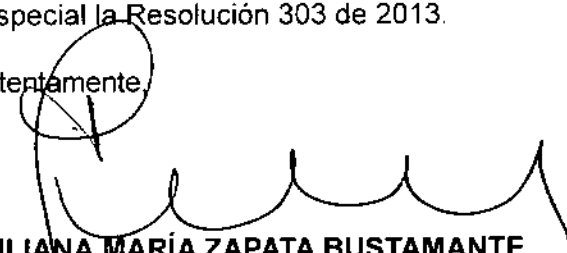
Respetada señora:

Por medio de la presente le envío copia del contrato de financiamiento No. 729 de 2016 celebrado con COLCIENCIAS, encontrándose cumplidos los requisitos para su perfeccionamiento y ejecución, habiéndose aprobado el 9 de diciembre del presente año la garantía presentada por la FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA, mediante la póliza No. 1738933-9 de la Aseguradora Suramericana.

En consecuencia le informo que la Gestora del Programa Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud de Colciencias, será su interlocutora con la entidad en su calidad de supervisora del mencionado contrato.

Adicionalmente es preciso señalar que el documento se regirá por la legislación Colombiana y las normas internas que al respecto ha expedido Colciencias, en especial la Resolución 303 de 2013.

Atentamente,

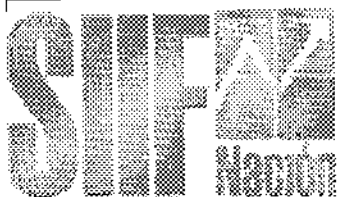

LILIANA MARÍA ZAPATA BUSTAMANTE

Secretaria General

Revisó: LKJaimés

Elaboró: MDPHerrera

Con copia a la Gestora del Programa Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud - Supervisora / Dirección Administrativa y Financiera para los fines pertinentes.



Reporte Compromiso Presupuestal de Gasto Comprometido

Usuario Solicitante:
Unidad / Subunidad:
Ejecutora Solicitante:MHfortiz
39-01-01-002LUISA FERNANDA ORTIZ CUELLAR
DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE
CIENCIA, TECNOLOGIA E INNOVACION -
FIS

Fecha y Hora Sistema:

2016-12-05 2:10 p. m.

REGISTRO PRESUPUESTAL DEL COMPROMISO

Con base en el CDP No: 116 de fecha 2016-03-01. Se hizo el registro presupuestal con el siguiente detalle

Numero:	2216	Fecha Registro:	2016-12-05	Unidad / Subunidad ejecutora:	39-01-01-002 DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE CIENCIA, TECNOLOGIA E INNOVACION - FIS		
Vigencia Presupuestal	Actual	Estado:	Generado	Tipo de Moneda:	COP-Posos	Tasa de Cambio:	0,00
Valor Inicial:	349.998.856,00	Valor Total Operaciones:		Valor Actual:	349.998.856,00	Saldo x Obligar:	349.998.856,00

TERCERO ORIGINAL

Identificación: NIT	890212568	Razon Social:	FUNDACION CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA	Medio de Pago:	Abono en cuenta		
CUENTA BANCARIA							
Numero:	650066632	Banco:	BANCO DE OCCIDENTE	Tipo:	Corriente	Estado:	Registrada

ORDENADOR DEL GASTO

Identificación:	42898796	Nombre:	LILIANA MARIA ZAPATA BUSTAMANTE	Cargo:	SECRETARIO GENERAL				
GAJA-MENOR				DOCUMENTO SOPORTE:					
Identificación:		Fecha de Registro:		Numero:	729-2016	Tipo:	CONVENIO	Fecha:	2016-12-05

ITEM PARA AFECTACION DE GASTO

DEPENDENCIA	POSICION CATALOGO DE GASTO	FUENTE	RECURSO RECURSO	SITUAC.	FECHA OPERACION	VALOR INICIAL	VALOR OPERACION	VALOR ACTUAL	SALDO X OBLIGAR
002 FIS	C-630-300-1 APORTES AL FONDO DE INVESTIGACION EN SALUD, ARTICULO 42, LITERAL B, LEY 643 DE 2001	Nación	16	SSF		349.998.856,00			
Total:						349.998.856,00		349.998.856,00	349.998.856,00

Objeto:	CTO FINAN 729-2016. VENCE: 36 MESES A PARTIR DEL DESEMBOLSO. COD 656674455040 PROYECTO: TRATAMIENTO SELECTIVO DEL CANCER GASTRICO AFECTANDO LA BIOENERGETICA MITOCONDRIAL.
---------	--

PLAN DE PAGOS

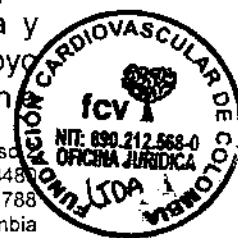
DEPENDENCIA DE AFECTACION DE PAC	POSICION DEL CATALOGO DE PAC	FECHA	VALOR A PAGAR	SALDO POR OBLIGAR	LINEA DE PAGO
002 FIS	CNS - INVERSION ORDINARIA NACION SSF	2016-12-31	349.998.856,00	349.998.856,00	NINGUNO

FIRMA(S) RESPONSABLE(S)

**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

Entre el **DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN - COLCIENCIAS**, organismo principal de la administración pública, transformado por la Ley 1286 de 2009, representado para estos efectos por **LILIANA MARÍA ZAPATA BUSTAMANTE**, identificada con la cédula de ciudadanía No. 42.898.796, nombrada mediante el Decreto 2751 del 24 de noviembre de 2013, y posesionada mediante el Acta No. 40 de 2013, quien obra en su calidad de Secretaria General, debidamente facultada por la Resolución No. 429 de 2016, quien en adelante se denominará **COLCIENCIAS**, por una parte y por la otra la **FUNDACION CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**, con Nit. No. 890212568-0, representada para efectos de este contrato por **MARIA MARGARITA DÍAZ MARTÍNEZ**, identificada con la cédula de ciudadanía No. 63.283.641, quien en adelante se denominará **LA ENTIDAD**, acuerdan celebrar el presente contrato para otorgar apoyo económico por parte de **COLCIENCIAS**, previas las siguientes consideraciones:

1. Que la competencia para firmar la contratación está radicada en cabeza de la Secretaría General en razón a que la cuantía del presente contrato es por la suma de **TRESCIENTOS CUARENTA Y NUEVE MILLONES NOVECIENTOS NOVENTA Y OCHO MIL OCHOCIENTOS CINCUENTA Y SEIS PESOS M/CTE (\$349.998.856)**, teniendo en cuenta que la Resolución N° 429-2016 faculta a la Secretaria General para suscribir contratos cuya cuantía vaya desde la mínima y que no supere la menor cuantía que es de \$448.145.100, así como las adiciones de este contrato.
2. Que COLCIENCIAS abrió la convocatoria No.744 de 2016 cuyo objeto es *"Generar estrategias que promuevan acciones dirigidas a mitigar el riesgo de ocurrencia y reducción de la carga de la enfermedad, a través de la financiación de proyectos de investigación, desarrollo tecnológico e innovación de alto impacto"*.
3. Que conforme a la Resolución No.1008 del 28 de septiembre de 2015, se publicó el banco definitivo de elegibles de la convocatoria No.744 de 2016, el cual contenía la propuesta presentada con el código 656674455040, ocupando el lugar 20 en el banco definitivo.
4. Que el Decreto Ley 591 de 1991, en su artículo 2º numerales 1º y 3º, señalan que son actividades científicas y tecnológicas entre otras la investigación científica y desarrollo tecnológico, desarrollo de nuevos productos y procesos, creación y apoyo a centros de investigación y tecnológicos y conformación de redes de investigación.



**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

información y los servicios científicos y tecnológicos que se refieren a la realización de planes, estudios, estadísticas y censos de ciencia y tecnología; a la homologación, normalización, metodología, certificación y control de calidad; a la prospección de recursos, inventario de recursos terrestres y ordenamiento territorial; a la promoción científica y tecnológica; a la realización de seminarios, congresos y talleres de ciencia y tecnología, así como a la promoción y gestión de sistemas de calidad total y de evaluación tecnológica.

5. Que el artículo 8º del Decreto Ley 591 de 1991 consagra la posibilidad que la Nación celebre contratos de financiamiento de actividades científicas y tecnológicas, entre otras, en la modalidad de recuperación contingente.

6. Que dentro de las funciones de **COLCIENCIAS** establecidas en la Ley 1286 de 2009, artículo 7º, numerales 6, 9, 11, 14 y 17, se encuentran las de fomentar instrumentos de gestión y promover la inversión para la investigación, el desarrollo científico y la innovación, así como propiciar las condiciones necesarias para que los desarrollos científicos, tecnológicos e innovadores favorezcan el mejoramiento de las condiciones de vida de los ciudadanos y coordinar la política nacional de ciencia y tecnología con las políticas nacionales, regionales y sectoriales del Estado, entre otras, en seguridad social y salud.

7. Que de conformidad con las anteriores consideraciones, el presente contrato de financiamiento se registrará por las siguientes **cláusulas**:

PRIMERA. OBJETO: Otorgar apoyo económico a la ENTIDAD por parte de COLCIENCIAS, en la modalidad de recuperación contingente, para la financiación del proyecto titulado: *"Tratamiento selectivo del cáncer gástrico afectando la bioenergética mitocondrial"*, con código No. 656674455040.

SEGUNDA. OBLIGACIONES DE LAS PARTES:

2.1. DE LA ENTIDAD: La ENTIDAD se obliga a desarrollar cabalmente el objetivo general, objetivos específicos del contrato, y lo establecido en el memorando de elaboración del contrato y, en especial a:

2.1.1. Entregar los resultados especificados en el numeral VI del memorando de solicitud del contrato.

2.1.2. Designar como investigador principal a Sandra Milena Sanabria Barrera



**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

garantizar su disponibilidad para ejercer la dirección del contrato, en caso de cambio deberá solicitar la autorización previa por escrito de COLCIENCIAS.

2.1.3. Aportar y obtener los recursos de contrapartida a que hace referencia la cláusula cuarta del presente contrato.

2.1.4. Aplicar los recursos del apoyo económico exclusivamente a las actividades del contrato, en las cuantías y para los rubros aprobados y solicitar la autorización previa de COLCIENCIAS por parte del supervisor para el traslado de recursos de un rubro a otro, que exceda del treinta por ciento (30%) del rubro de destino, en el presupuesto inicial.

2.1.5. Garantizar la dedicación de todos los investigadores y demás personal a las labores del contrato, y gestionar ante el investigador principal la vinculación de personal identificado en la propuesta solamente con perfil, respetando los términos de la convocatoria.

2.1.6. Presentar ante el supervisor dos (2) informes de avance técnico y financiero en archivo físico y magnético, uno al mes doce (12) y otro al mes veinticuatro (24) y un informe final técnico y financiero en el mes treinta y seis (36).

2.1.7. Rendir cuentas a COLCIENCIAS sobre la inversión de los recursos entregados a título de apoyo económico del contrato.

2.1.8. Adoptar criterios de eficiencia, transparencia y economía en la adquisición de bienes o servicios con destino al contrato, cumpliendo los términos de la convocatoria.

2.1.9. Usar los recursos públicos en la destinación específica establecida en el presente contrato.

2.1.10. Utilizar, durante el plazo del presente contrato, los bienes adquiridos con recursos del apoyo económico exclusivamente para los fines relacionados con la ejecución de éste contrato.

2.1.11. Llevar un sistema de contabilidad con los soportes exigidos por la normatividad vigente, que permita verificar el movimiento de los recursos de apoyo económico.



**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

2.1.12. Proporcionar toda la información que sea solicitada por COLCIENCIAS, o por los organismos de control del Estado en relación con el contrato.

2.1.13. Dar cumplimiento a las disposiciones vigentes en materia de manejo ambiental y obtener los permisos y licencias correspondientes por parte de las autoridades competentes, si a ello hubiere lugar.

2.1.14. Destacar en toda publicación, actividad o material divulgatorio relacionado con el contrato y su ejecución, que éste se financia con recursos de COLCIENCIAS.

2.1.15. Garantizar en caso de generarse la comercialización de productos como resultado del presente contrato, que en la imagen de los mismos se informe que éstos son el resultado de una investigación financiada por COLCIENCIAS.

2.1.16. Dar cumplimiento a sus obligaciones con los sistemas de salud, riesgos profesionales, pensiones de conformidad con lo establecido en las leyes 789 de 2002 y 828 de 2003 y demás normas concordantes y complementarias.

2.1.17. Comunicar oportunamente a COLCIENCIAS cualquier cambio de su domicilio.

2.1.18. Disponer los recursos necesarios para el mantenimiento eficiente de las obras y equipos financiados con recursos del contrato; operarlos y mantenerlos de acuerdo con las normas técnicas generalmente aceptadas.

2.1.19. Permitir el uso de los equipos adquiridos con recursos del apoyo económico, durante los cinco (5) años posteriores a la terminación del contrato, a Grupos de Investigación, Centros de Desarrollo Tecnológico cobrándoles por este servicio solamente los costos de operación atribuibles a la fracción del tiempo en que los usen.

2.1.20. Girar a la entidad que COLCIENCIAS le indique el 3% del valor del financiamiento otorgado, correspondiente a seguimiento y evaluación del contrato de conformidad al capítulo 8 numeral 8.2 de los términos de referencia de la Convocatoria No. 744 de 2016.

2.1.21. Las demás obligaciones inherentes a la naturaleza y objeto del presente contrato.



**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

2.2. DE COLCIENCIAS:

2.2.1. Otorgar apoyo económico a la ENTIDAD en la modalidad de recuperación contingente, para la financiación del objeto del contrato.

2.2.2. Efectuar el desembolso del apoyo económico de acuerdo con lo consignado en la cláusula tercera de este contrato.

2.2.3. Efectuar la supervisión del contrato mediante el seguimiento de la ejecución del contrato.

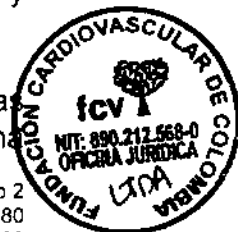
TERCERA. VALOR DEL CONTRATO Y DESEMBOLSO: COLCIENCIAS otorga a LA ENTIDAD apoyo económico por la suma de **TRESCIENTOS CUARENTA Y NUEVE MILLONES NOVECIENTOS NOVENTA Y OCHO MIL OCHOCIENTOS CINCUENTA Y SEIS PESOS M/CTE (\$349.998.856)**, de acuerdo con el certificado de disponibilidad presupuestal No. 116 del 1 de marzo de 2016, los cuales serán girados a la ENTIDAD en un solo desembolso al cumplirse los requisitos de perfeccionamiento y ejecución del contrato.

CUARTA. CONTRAPARTIDA: LA ENTIDAD se compromete a aportar la suma de **CUATROCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MILLONES TRESCIENTOS VEINTIÚN MIL SETECIENTOS CUARENTA Y OCHO PESOS M/CTE (\$489.321.748)**, de los cuales TRESCIENTOS CATORCE MILLONES QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL NOVECIENTOS NOVENTA PESOS M/CTE (\$314.571.990) son en especie y DOS MILLONES OCHOCIENTOS SETENTA Y TRES MIL PESOS M/CTE (\$2.873.000) son en dinero, y se compromete a obtener de la Fundación Cardiovascular de Colombia Zona Franca un aporte de CIENTO SETENTA Y UN MILLONES OCHOCIENTOS SETENTA Y SEIS MIL SETECIENTOS CINCUENTA Y OCHO PESOS M/CTE (\$171.876.758) en especie.

LA ENTIDAD declara que los recursos que ella y la COEJECUTORA aportan como contrapartida provienen de actividades lícitas.

QUINTA. PLAZO DEL CONTRATO: El plazo del contrato será de treinta y seis (36) meses, contados a partir del desembolso, previo registro presupuestal y aprobación de la garantía correspondiente.

SEXTA. SUPERVISIÓN: COLCIENCIAS supervisará el cumplimiento de las obligaciones contraídas por la ENTIDAD a través del Gestor del Programa



32

[Handwritten signature]

**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud de la Dirección de Fomento a la Investigación, o quien haga sus veces, quien vigilará el cumplimiento de las mismas. En desarrollo de su función, el supervisor cumplirá, en especial lo siguiente:

- 6.1. Atender el desarrollo de la ejecución del contrato.
- 6.2. Comunicar en forma oportuna a la Secretaría General, las circunstancias que afecten el normal desarrollo del contrato.
- 6.3. Elaborar técnica y oportunamente las actas y/o constancias requeridas para el cumplimiento y eficaz ejecución del contrato.
- 6.4. Comunicar en forma oportuna a la Secretaría General la ocurrencia de hechos constitutivos de mora o incumplimiento por parte de la ENTIDAD.
- 6.5. Verificar que la ENTIDAD efectúe el pago de aportes al Sistema de Seguridad Social de los trabajadores a su cargo.

El supervisor designado podrá ser variado por la Dirección General de COLCIENCIAS, según lo establecido en la Resolución N. 303 de 2013.

SÉPTIMA. PROPIEDAD INTELECTUAL: En los casos de proyectos de investigación y desarrollo de ciencia, tecnología e innovación y de tecnologías de la información y las comunicaciones, adelantados con recursos públicos que se llegaren a generar derechos de propiedad intelectual sobre los resultados que se obtengan o se pudieran obtener en el marco del desarrollo del presente convenio la titularidad sobre los mismos se regirá por lo establecido en el artículo 10 de la Ley 1753 de 2015. COLCIENCIAS podrá ceder a título gratuito, salvo por motivos de seguridad y defensa nacional, los derechos de propiedad intelectual que correspondan, y autorizar su transferencia, comercialización y explotación a quien adelante y ejecute el proyecto, sin que ello constituya daño patrimonial al Estado. Sin perjuicio de los derechos de propiedad intelectual establecidos, los resultados de las investigaciones y desarrollos tecnológicos y de innovación que se deriven del presente convenio, podrán ser divulgados por COLCIENCIAS.

OCTAVA. PROTECCIÓN CONTRACTUAL: COLCIENCIAS protegerá el patrimonio público a través de las siguientes cláusulas:



CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA

8.1. GARANTÍAS. LA ENTIDAD se compromete a constituir a favor de COLCIENCIAS, garantía única a favor de entidades estatales ante un banco o compañía de seguros legalmente establecida en Colombia, cuya póliza matriz esté aprobada por la Superintendencia Financiera de Colombia a fin de respaldar el cumplimiento de las obligaciones que surjan de la celebración, ejecución, terminación y liquidación del presente contrato con el objeto de amparar el riesgo de CUMPLIMIENTO, por una cuantía equivalente al veinte por ciento (20%) del valor del apoyo económico otorgado por COLCIENCIAS, y con vigencia por el plazo del contrato y seis (6) meses más. **PARÁGRAFO I.-** En caso que se prorrogue el plazo de ejecución del presente contrato o se adicione el valor LA ENTIDAD se compromete a presentar el certificado de modificación de las garantías de conformidad con el nuevo plazo y/o valor pactado. **PARÁGRAFO II.-** LA ENTIDAD deberá mantener la garantía en plena vigencia y validez en los términos expresados en esta cláusula y deberá pagar las primas y cualquiera otra expensa necesaria para constituirla, mantenerla, prorrogarla o adicionarla.

8.2. INDEPENDENCIA DE LAS PARTES E INEXISTENCIA DE RELACIÓN LABORAL. En todas las acciones derivadas del presente contrato y de los subsecuentes contratos específicos y/o derivados, las partes implementarán todo lo que esté a su cargo con total independencia, atendiendo a la normatividad legal y reglamentaria aplicable a cada una, y convienen en que el personal de cada institución que sea destinado a la realización de cada actividad, continuará en forma absoluta bajo la vinculación, dirección y dependencia exclusiva de la parte con la cual tiene establecida su relación laboral o contractual de cualquier naturaleza, independientemente de estar prestando servicios fuera de ella, o en las instalaciones de la institución a la que fuera remitido.

Si en la realización de una acción o actividad del contrato o de los contratos específicos que de éste se deriven, interviene personal ajeno a las partes, este continuará siempre bajo la dirección y/o dependencia de la parte o persona para la que esté contratado, por lo que su intervención no originará relación de carácter laboral o contractual de ninguna naturaleza, con la otra parte firmante.

Entre COLCIENCIAS y la ENTIDAD no existe ningún vínculo de tipo laboral y por tanto COLCIENCIAS no tendrá relación de trabajo alguna con el personal que la ENTIDAD asigne para el cumplimiento y ejecución de sus obligaciones en este contrato. Por lo anterior, le compete de manera exclusiva a la ENTIDAD la responsabilidad del personal que vincule para la ejecución del presente contrato.

**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

así como las prestaciones laborales, sociales y la seguridad industrial correspondiente.

8.3. INDEMNIDAD: La ENTIDAD mantendrá indemne a COLCIENCIAS contra todo reclamo, demanda, acción legal y costo que pueda causarse o surgir por daños o lesiones a personas o propiedades de terceros, ocasionados por aquél, sus subcontratistas o proveedores. En el evento en que la ENTIDAD no asuma debida y oportunamente la defensa de COLCIENCIAS, éste podrá hacerlo directamente, previa notificación escrita a la ENTIDAD y ésta pagará todos los gastos en que incurra por tal motivo. En caso de que así no lo hiciere el contratista, COLCIENCIAS tendrá derecho a descontar el valor de tales erogaciones de cualquier suma que adeude a la ENTIDAD por razón de los trabajos motivo del contrato.

8.4. CONFIDENCIALIDAD: Las partes se obligan recíprocamente a no divulgar y mantener bajo reserva, en calidad de información confidencial, la información que sea suministrada o que conozca directamente, en desarrollo del contrato, y, a no darle destinación diferente a la requerida para la ejecución del mismo. En tal sentido COLCIENCIAS y la ENTIDAD están obligados a observar la misma reserva y cuidado que utilizan para mantener su propia información.

8.5. RECUPERACIÓN CONTINGENTE: Cuando COLCIENCIAS, determine que LA ENTIDAD han incurrido en incumplimiento de alguna de sus obligaciones, podrá declarar el incumplimiento del contrato en cuyo caso exigirá el reintegro del capital dado en calidad de apoyo económico, más los intereses bancarios corrientes causados desde la fecha del desembolso, a las tasas vigentes en el momento de la restitución, previo agotamiento de los trámites necesarios que garanticen a la ENTIDAD su derecho de defensa y contradicción.

8.6. REINTEGRO: A la finalización del contrato, la ENTIDAD reintegrará a COLCIENCIAS los recursos recibidos y no ejecutados, más los intereses bancarios corrientes causados desde la fecha de terminación del plazo del contrato, a las tasas vigentes en el momento de la restitución, previo agotamiento de los trámites necesarios que garanticen a la ENTIDAD su derechos de defensa y contradicción. En caso de que la ENTIDAD no reintegre los dineros, la obligación se consignará en el acta de liquidación firmada por las partes o mediante resolución motivada. La ENTIDAD acepta que el acta de liquidación o la resolución que la establezca, presta mérito ejecutivo, y renuncia a toda clase de requerimientos para ser constituida en mora acerca de las obligaciones antes

CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA

establecidas.

NOVENA. SITUACIONES ADMINISTRATIVAS: COLCIENCIAS y la ENTIDAD podrán hacer uso de las siguientes cláusulas para garantizar el cumplimiento del objeto del contrato y de los fines del estado:

9.1. SOLUCIÓN DE CONTROVERSIAS CONTRACTUALES: Cualquier diferencia que surja entre las partes por la ejecución, interpretación, terminación o liquidación del presente contrato y en general, sobre los derechos y obligaciones derivados del mismo, durante su etapa precontractual, contractual y post contractual se solucionará primero por las partes, mediante arreglo directo, la cual tendrá una duración máxima de treinta (30) días hábiles. En caso de no llegar a un acuerdo, las partes convienen solucionarla por la vía de la conciliación prejudicial.

9.2. PRÓRROGAS, ADICIONES Y MODIFICACIONES: La solicitud de prórroga debe hacerse por lo menos dos meses antes del vencimiento del plazo de duración del contrato.

9.3 CESIÓN: Este contrato no podrá cederse ni en todo, ni en parte sin el previo consentimiento expreso y por escrito de COLCIENCIAS quien se reserva las razones que tenga para negar la autorización de la cesión.

9.4. SUSPENSIÓN: Las partes podrán suspender el presente contrato, mediante la suscripción de un acta en donde conste tal evento, cuando medie alguna de las siguientes causales: **1.** Por circunstancias de fuerza mayor o caso fortuito debidamente comprobados, y **2.** Por acuerdo entre las partes justificado en que no se afecta el proyecto.

El término de suspensión será computable para efecto del plazo de ejecución del contrato, pero no dará derecho a exigir indemnización, sobrecostos o reajustes, ni a reclamar gastos diferentes a los pactados en el contrato.

9.5. CAUSALES DE TERMINACIÓN: Este contrato se podrá dar por terminado por la ocurrencia de uno de los siguientes eventos:

9.5.1. Por cumplimiento del objeto del contrato.

9.5.2. Por vencimiento del plazo previsto en la cláusula quinta o el de una de sus prórrogas, si las tuviere.

9.5.3. Por mutuo acuerdo de las partes.

**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC N.º 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

9.5.4. Por incumplimiento de las obligaciones a cargo de la ENTIDAD.

COLCIENCIAS podrá dar por terminado unilateralmente en forma anticipada el presente contrato, mediante la expedición de un acto administrativo debidamente motivado, agotados los trámites que garanticen a la ENTIDAD su derecho de defensa y contradicción, de conformidad con la normatividad vigente.

9.6. LIQUIDACIÓN: Una vez culminado el plazo del contrato o cumplido el objeto del mismo o en el evento de presentarse alguna de las causales consignadas en la cláusula anterior, se procederá a su liquidación dentro de los cuatro (4) meses siguientes, lo cual deberá constar en acta debidamente suscrita por las partes o en acto administrativo que así lo disponga.

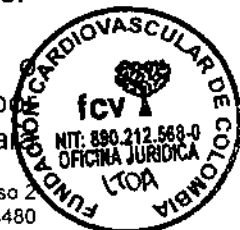
DÉCIMA. MÉRITO EJECUTIVO: El presente documento, una vez sea suscrito por las partes, contiene obligaciones claras, expresas y exigibles de acuerdo con el artículo 488 del Código de Procedimiento Civil, y por consiguiente, para todos los efectos, presta mérito ejecutivo, renunciando la ENTIDAD a los requerimientos legales o privados para ser constituida en mora.

DÉCIMA PRIMERA. INHABILIDADES E INCOMPATIBILIDADES: El representante legal de la ENTIDAD manifiesta bajo la gravedad del juramento que ni él ni la ENTIDAD que representa están incurso en causal de inhabilidad o de incompatibilidad. La inexactitud sobre ésta afirmación constituirá causal de incumplimiento y dará derecho a COLCIENCIAS para dar por terminado el presente contrato en el momento en que se verifique tal inexactitud.

Se deja constancia que para la fecha de firma del presente contrato se consultó el "Boletín de Responsables Fiscales" vigente, sin que aparezcan allí registrados la ENTIDAD o el representante legal de la misma.

DÉCIMA SEGUNDA. RÉGIMEN JURÍDICO: El contrato se rige por las disposiciones especiales vigentes sobre financiamiento de actividades de ciencia y tecnología, en particular las consagradas por la Ley 1286 de 2009, la Ley 29 de 1990, los Decretos Leyes 585 y los artículos vigentes del Decreto 591 de 1991, y en lo no establecido en ellas por la Ley 80 de 1993 y sus decretos reglamentarios.

DÉCIMA TERCERA. INVALIDEZ PARCIAL: Si cualquier estipulación o disposición de este contrato se considerase nula, inválida o no exigible por cualquier juez competente, dicha decisión será interpretada estrictamente para



**CONTRATO DE FINANCIAMIENTO RC No. 729 DE 2016 CELEBRADO
ENTRE COLCIENCIAS Y LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

dicha estipulación o disposición y no afectará la validez de ninguna otra estipulación del presente contrato.

DÉCIMA CUARTA. DOCUMENTOS- Hacen parte del contrato los siguientes documentos:

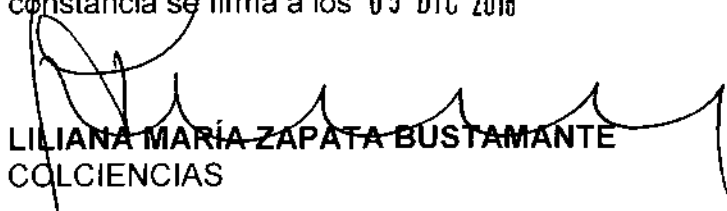
- 14.1. Los términos de referencia de la convocatoria No. 744 de 2016.
- 14.2. Resolución de apertura de la convocatoria No. 744 de 2016.
- 14.3. La Resolución No. 1008 de 2016 por medio del cual se publica el banco de elegibles de la convocatoria No. 744 de 2016.
- 14.4. El memorando de solicitud para la elaboración del contrato.
- 14.5. El Certificado de Disponibilidad y registro presupuestal.
- 14.6. Las prórrogas, adiciones y modificaciones que se suscriban entre las partes.

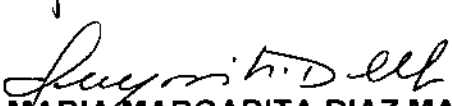
DÉCIMA QUINTA. REQUISITOS DE PERFECCIONAMIENTO: El contrato queda perfeccionado con la firma de las partes, y, para su ejecución requiere el registro presupuestal correspondiente.

DÉCIMA SEXTA. GASTOS: Todos los gastos que se deriven del presente contrato serán asumidos por la ENTIDAD.

DÉCIMA SÉPTIMA. DOMICILIO: Para todos los efectos legales del presente contrato se tendrá como domicilio contractual la ciudad de Bogotá.

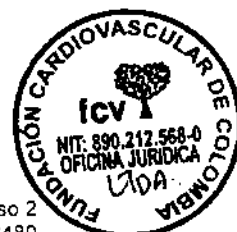
DÉCIMA OCTAVA. MANIFESTACIÓN: Las partes manifiestan libremente que han procedido a la lectura total y cuidadosa del texto del presente contrato, por lo que en consecuencia, se obligan a todo lo consignado y manifestado. Para constancia se firma a los 05 DIC 2016


LILIANA MARÍA ZAPATA BUSTAMANTE
COLCIENCIAS


MARIA MARGARITA DIAZ MARTINEZ
LA ENTIDAD

Revisó: LKJaimés
Elaboró: MDPHerrera

Página 11 de 11



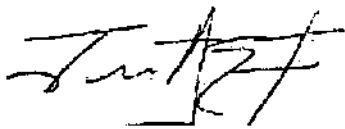
Av. Calle 26 N° 57-41 Torre 8 Piso 2
Teléfono: (57-1) 625 8480
Fax: (57-1) 625 1788
Bogotá D.C. - Colombia
www.colciencias.gov.co

SEGUROS GENERALES SURAMERICANA S.A

HACE CONSTAR

Que la garantía de Cumplimiento a favor de ENTIDADES ESTATALES en la póliza 1738933-9 expedida por la Compañía cuyo Tomador y/o Afianzado es: **FUNDACION CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA** y Asegurado y/o Beneficiario es: **DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE CIENCIA TECNOLOGIA E INNOVACION -COLCIENCIAS** y su documento 11857684 expedida el día 22 de Noviembre de 2016 no expirará por falta de pago de la prima o de los certificados anexos que se expidan con fundamento en ella o por la revocación unilateral por parte del tomador o de la compañía

Para constancia se firma en BUCARAMANGA a los 22 días del mes de Noviembre de 2016.



Firma Autorizada
SEGUROS GENERALES SURAMERICANA S.A

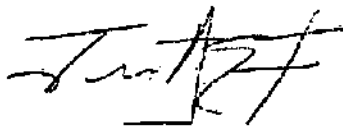
SEGUROS GENERALES SURAMERICANA S.A

HACE CONSTAR

Que la garantía de Cumplimiento a favor de ENTIDADES ESTATALES en la póliza 1738933-9 expedida por la Compañía cuyo Tomador y/o Afianzado es: **FUNDACION CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA** y Asegurado y/o Beneficiario es **DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE CIENCIA TECNOLOGIA E INNOVACION -COLCIENCIAS** y su documento 11857684 expedida el día 22 de Noviembre de 2016 se encuentra debidamente cancelados sus valores, discriminados así:

Prima	\$	\$734,710
Impuestos	\$	\$117,554
Total	\$	\$852,264

Para constancia se firma en BUCARAMANGA a los 22 días del mes de Noviembre de 2016.



Firma Autorizada
SEGUROS GENERALES SURAMERICANA S.A

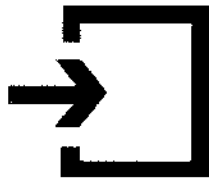
ACTA DE APROBACION DE GARANTIA

Se imparte aprobación a la garantía presentada por **LA FUNDACIÓN CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**, mediante póliza No. 1738933-9 de la Aseguradora **SURAMERICANA**, la cual cubre los riesgos exigidos en el numeral 8.1 de la cláusula octava del contrato No. 729 de 2016.

Dada en Bogotá D.C., a los nueve (9) días del mes de diciembre de 2016.


LILIANA MARIA ZAPATA BUSTAMANTE
Secretaria General

Revisó: LKJaimes
Elaboró: MDPHerrera 



SECOP I

[Inicio](#) | [Inicio de procesos](#) | [Seguimiento de procesos](#) | [Cuentas de usuarios](#) | [Tipos de contratos](#) | [Estado](#) | [Procesos](#) | [Consultas](#)

Detalle del Proceso Número CT729-2016

DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE LA CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN (COLCIENCIAS)

Información General del Proceso

Tipo de Proceso	Contratación Directa (Ley 1150 de 2007)
Estado del Proceso	Celebrado
Causal de Otras Formas de Contratación Directa	Contratos para el Desarrollo de Actividades Científicas y Tecnológicas (Literal E)
Régimen de Contratación	Estatuto General de Contratación
Grupo	[F] Servicios
Segmento	[85] Servicios de Salud
Familia	[8513] Ciencia médica: investigación y experimentación
Clase	[851317] Ciencia e investigación médica
Detalle y Cantidad del Objeto a Contratar	Otorgar apoyo económico a la ENTIDAD por parte de COLCIENCIAS, en la modalidad de recuperación contingente, para la financiación del proyecto titulado: <i>¿Tratamiento selectivo del cáncer gástrico afectando la bioenergética mitocondrial?</i> , con código No. 656674455040.
Cuántia a Contratar	\$ 349.999.856
Tipo de Contrato	Otro Tipo de Contrato
Respaldos Presupuestales Asociados al Proceso	

Tipo de respaldo presupuestal	Número del respaldo presupuestal	Cuántia del respaldo presupuestal
CDP	116	\$ 349.999.856

Ubicación Geográfica del Proceso

Departamento y Municipio de Ejecución	Bogotá D.C.
Departamento y Municipio de Obtención de Documentos	Bogotá D.C.
Dirección Física de Obtención de Documentos del Proceso	AV CALLE 26 NO. 57-41 TORRE B
Departamento y Municipio de Entrega de Documentos	Bogotá D.C.
Dirección Física de Entrega de Documentos del Proceso	Av. Calle 26 No. 57-41 Torre B Piso 2

Datos de Contacto del Proceso

Correo Electrónico: contratacion@colciencias.gov.co

Información de los Contratos Asociados al Proceso

Número del Contrato	CT729-2016
Estado del Contrato	Celebrado
Objeto del Contrato	Otorgar apoyo económico a la ENTIDAD por parte de COLCIENCIAS, en la modalidad de recuperación contingente, para la financiación del proyecto titulado: <i>¿Tratamiento selectivo del cáncer gástrico afectando la bioenergética mitocondrial?</i> , con código No. 656674455040.
Cuántia Definitiva del Contrato	\$349.998.856.00 Peso Colombiano
Nombre o Razón Social del Contratista	FUNDACION CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA
Identificación del Contratista	Nit de Persona Jurídica No. 890212568
País y Departamento/Provincia de ubicación del Contratista	Colombia : Bogotá D.C.
Dirección Física del Contratista	Calle 155A No. 23-58 El bosque
Nombre del Representante Legal del Contratista	MARIA MARGARITA DÍAZ MARTÍNEZ
Identificación del Representante Legal	Cédula de Ciudadanía No. 63283641
Valor Contrato Interventoría Externa	\$ 00

Fecha de Firma del Contrato	05 de diciembre de 2016
Fecha de Inicio de Ejecución del Contrato	05 de diciembre de 2016
Plazo de Ejecución del Contrato	36 Meses
Unidad/Subunidad ejecutora (SIIF)	39-01-01-002 - DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE CIENCIA, TECNOLOGIA E INNOVACION - FIS
Número compromiso presupuestal	2216
Destinación del Gasto	Funcionamiento
Origen de los recursos	Presupuesto Nacional/Territorial
Documentos del Proceso	

Nombre	Descripción	Tipo	Tamaño	Versión	Fecha de Publicación del Documento (dd-mm-aaaa)
Contrato	CONTRATO DE FINANCIAMIENTO		6.42 MB	1	05-12-2016 05:01 PM
Documento del Proceso	RESOLUCION DE JUSTIFICACION		163 KB	1	05-12-2016 04:56 PM

Hitos del Proceso

Descripción del Hito	Fecha y Hora de Ocurrencia
Celebración de Contrato	05 de December de 2016 05:01 P.M.
Creación de Proceso	05 de December de 2016 04:56 P.M.

[Ver Reporte Modificaciones](#)

En cumplimiento de la Ley 1581 de 2012, los datos personales contenidos en esta página son clasificados como dato personal público y la finalidad de su divulgación es dar cumplimiento a la ley de Transparencia y el derecho de Acceso a la Información Pública Nacional (Ley 1712 del 2014). Cualquier uso de la información distinto a su finalidad no es aprobado por Colombia Compra Eficiente.

Si desea presentar cualquier solicitud o petición relacionada con la protección de datos personales puede ingresar a la página web www.colombiacompra.gov.co en la opción de Contáctenos o comuníquese al teléfono en Bogotá: 7 456788 o Línea Nacional: 018000 520808 o por medio de www.colombiacompra.gov.co/sopORTE

5

El presente contrato es suscrito por el representante legal de la entidad contratante, en su calidad de representante legal, y el representante legal de la entidad contratada, en su calidad de representante legal, en presencia de dos testigos, quienes firman y sellan el presente contrato, el cual es suscrito en dos ejemplares, uno para cada parte, los cuales tienen igual validez. En fe de lo cual, se suscribe el presente contrato en Bogotá, D.C., a los 05 días del mes de Diciembre del 2016. _____ Representante legal de la entidad contratante _____ Representante legal de la entidad contratada _____ Testigo _____ Testigo	El presente contrato es suscrito por el representante legal de la entidad contratante, en su calidad de representante legal, y el representante legal de la entidad contratada, en su calidad de representante legal, en presencia de dos testigos, quienes firman y sellan el presente contrato, el cual es suscrito en dos ejemplares, uno para cada parte, los cuales tienen igual validez. En fe de lo cual, se suscribe el presente contrato en Bogotá, D.C., a los 05 días del mes de Diciembre del 2016. _____ Representante legal de la entidad contratante _____ Representante legal de la entidad contratada _____ Testigo _____ Testigo
--	--

El presente contrato es suscrito por el representante legal de la entidad contratante, en su calidad de representante legal, y el representante legal de la entidad contratada, en su calidad de representante legal, en presencia de dos testigos, quienes firman y sellan el presente contrato, el cual es suscrito en dos ejemplares, uno para cada parte, los cuales tienen igual validez. En fe de lo cual, se suscribe el presente contrato en Bogotá, D.C., a los 05 días del mes de Diciembre del 2016. _____ Representante legal de la entidad contratante _____ Representante legal de la entidad contratada _____ Testigo _____ Testigo	El presente contrato es suscrito por el representante legal de la entidad contratante, en su calidad de representante legal, y el representante legal de la entidad contratada, en su calidad de representante legal, en presencia de dos testigos, quienes firman y sellan el presente contrato, el cual es suscrito en dos ejemplares, uno para cada parte, los cuales tienen igual validez. En fe de lo cual, se suscribe el presente contrato en Bogotá, D.C., a los 05 días del mes de Diciembre del 2016. _____ Representante legal de la entidad contratante _____ Representante legal de la entidad contratada _____ Testigo _____ Testigo
--	--



Copyright ©

El contenido y diseño de esta página web está protegido por las leyes colombianas. La información incluida en esta página puede ser reproducida y descargable para usos personales de forma gratuita y sin necesidad de solicitar un permiso, bajo las siguientes condiciones:

Debe reproducirse el material de forma exacta y en su versión más actualizada.

No se debe usar el material en ninguna forma ofensiva, engañosa o confusa.

Debe reconocerse la fuente y los derechos de autor.

A pesar del esfuerzo hecho para asegurar la exactitud del contenido, Colombia Compra Eficiente no se hace responsable por errores o información incompleta.



20173600005431

PNCTIS
Bogotá, D.C., 12 de enero de 2017

Doctor
María Margarita Díaz Martínez
Representante Legal
Fundación Cardiovascular de Colombia
Calle 155ª No. 23 – 58
Floridablanca – Santander

ASUNTO: Carta de Inicio contrato 729-2016 proyecto 656674455040

Apreciada Doctora Díaz:

En relación con el Proyecto “Tratamiento selectivo del cáncer gástrico afectando la bioenergética mitocondrial.” Código 656674455040, el cual fue financiado en el marco de la convocatoria 744-2016, atentamente le solicitamos tener en cuenta la siguiente información para su ejecución:

1. Fecha de desembolso: 21 de diciembre de 2016
2. Valor del desembolso: \$349.998.856.00
3. Duración Proyecto: 36 meses
4. Fecha iniciación Proyecto : 21 de diciembre de 2016
5. Fecha Finalización del proyecto: 21 de diciembre de 2019
6. Fecha de entrega de informes :
 - 6.1 Diciembre 21 de 2017, primer Informe Técnico y Financiero de Avance
 - 6.2 Diciembre 21 de 2018, segundo Informe Técnico y Financiero de Avance
 - 6.3 Enero 21 de 2020, Informes, Técnico y Financiero Final
7. En el Memorando de Elaboración de Contrato, tener presente los numerales:
 - IV. Compromisos - Obligaciones de la Entidad
 - VI. Resultados Esperados
 - VIII. Condiciones de Financiamiento
 - XIV. Condiciones Adicionales

Así mismo, les solicitamos presentar oportunamente los Informes Técnico y Financiero, en los formatos establecidos, que pueden ser consultados en la página

Carrera 7 B bis N° 132-28
Teléfono: (57-1) 625 8480
Fax: (57-1) 625 1788
Bogotá D.C. - Colombia
www.colciencias.gov.co

de Colciencias en el siguiente enlace:
http://www.colciencias.gov.co/formularios_sigp

Por otro lado, nos permitimos anexar el cuadro del presupuesto ajustado y aprobado por las partes, para que lo tengan en cuenta durante el desarrollo del proyecto. Igualmente, se recuerda dar cumplimiento con el aporte de contrapartida establecido en la cláusula cuarta del contrato, información que deberá suministrarse en cada uno de los informes financieros establecidos en el numeral 2.1.6 del contrato.

Referente al giro de los recursos asignados al rubro de seguimiento y evaluación, el Programa posteriormente informará el trámite a seguir.

NOTA IMPORTANTE:

Según la cláusula Segunda, en su párrafo 2.1.4, y de acuerdo con el presupuesto detallado aprobado al proyecto, la solicitud previa a Colciencias para el traslado de recursos de un rubro a otro se hace solamente cuando este exceda del 30% del rubro de destino o se generen nuevos compromisos no establecidos en el presupuesto aprobado; cuando sea menor solamente deberá informarse al Programa de Salud.

Deseándoles éxitos en el desarrollo y ejecución de su proyecto.

Cordial Saludo,



Diana Milena Calderón N. PhD.
Gestora

Programa Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud

c.c. Dra.: Sandra Milena Sanabria Barrera
Investigadora Principal del Proyecto

 Reviso. Hilda P.
Elaboro. Emilia LI.