

Relación Estructura/Actividad de Híbridos Moleculares de
Tetrahydroquinolina/Isoxazolina Sobre el Metabolismo Bioenergético Mitocondrial

Ana Milena Pérez Silva

Trabajo de Grado para Optar el título de Químico

Director

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Dra. en Ciencias, Bioquímica

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa

Químico

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A MIS PADRES...

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar el más sincero agradecimiento, a quienes incondicionalmente han estado presentes a pesar de la distancia, mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible culminar mis estudios. A mi madre, Luz Marina, por su sacrificio y esfuerzo; a mi padre, Fausto José, por su constancia y dedicación; y a mi hermana, Andrea Carolina, por ser mi fuente de motivación e inspiración. Las palabras nunca serán suficientes para dar testimonio de mi aprecio y gratitud.

A mi directora de tesis, la Dr. Stelia Méndez, mi más amplio agradecimiento por haberme recibido en su grupo de investigación (GIBIM), por instruirme a ser perseverante ante las dificultades y por su valiosa dirección no solamente durante el desarrollo del proyecto, sino también en la formación como investigadora. Asimismo, a mi codirector de tesis, el estudiante Luis Carlos Vesga, por su coordinación, paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento sobre bioenergética en este proyecto.

Finalmente, agradezco al Instituto Experimental del Atlántico “José Celestino Mutis”, una fundación única en su género, inconcebible en Barranquilla y quizás en toda América Latina, un plantel ejemplar, concebido por un bendito inmigrante de gran visión cultural, en un país que por décadas ha sido abandonado por las injusticias y desigualdades, que con escasísimos medios y un puñado de abnegados educadores, nos formaron, exaltando el amor por las ciencias, artes e idiomas.

Aquí queda escrito su invaluable legado: *“No habrá desarrollo sin educación, ni progreso sin cultura”*.

Tabla de Contenido

Introducción.....	16
1. Objetivos.....	18
1.1 Objetivo General.....	18
1.2 Objetivos Específicos	18
2. Cuerpo del trabajo	19
2.1 Marco referencial.....	19
2.1.1 Acerca del cáncer.....	19
2.1.2 La mitocondria como diana farmacológica	21
2.1.3 La disfunción mitocondrial y el cáncer	21
2.1.4 Desregulación del metabolismo energético.....	23
2.1.5 Muerte Celular.....	26
2.1.6 Farmacología mitocondrial: La mitocondria como blanco terapéutico.....	29
2.1.7 Terapias contra el cáncer	31
2.1.8 Ejemplos de terapias y fármacos empleados en la actualidad.....	33
2.1.8.7 <i>Fármacos de interacción con canales de potasio</i>	38
2.1.8.8 <i>Tetrahydroquinolina y su importancia biológica.</i>	39
2.1.8.9 <i>Isoxazolina y su importancia biológica.</i>	41
2.1.9 La cadena respiratoria aporta la energía capturada en el metabolismo	42
2.2 Metodología.....	46
2.2.1 Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata	47
2.2.2 Evaluación de la actividad de los compuestos híbridos de THQ/Isoxazolina sobre la función bioenergética mitocondrial	48
2.2.3 Actividad enzimática mitocondrial.....	49

2.3 Resultados y Discusión.....	54
2.3.1 Efecto del compuesto A1 sobre los parámetros de la respiración mitocondrial.....	55
2.3.2 Efecto del compuesto A2 sobre los parámetros de la respiración mitocondrial.....	61
2.3.4 Efecto del compuesto A4 sobre los parámetros de la respiración mitocondrial.....	69
2.3.5 Efecto de los distintos híbridos moleculares de THQ/Isozaxolina sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.....	75
3. Conclusiones.....	82
Referencias bibliográficas	83
Apéndice	93

Lista de Tablas

Tabla 1	Fármacos que modulan la función mitocondrial.....	22
Tabla 2.	Proteínas en el metabolismo de células cancerígenas.....	23

Lista de Figuras

- Figura 1.** Intervención farmacológica en disfunción mitocondrial. Fuente: (M. Martínez, 2014)..... 30
- Figura 2.** Estructura de 1) Caracaine, 2) Ácido caracaine. Fuente: (Kouznetsov, 2012). 35
- Figura 3.** Diseño de potentes agentes anticancerígenos. Fuente: (Kouznetsov, 2012)..... 41
- Figura 4.** Estructura de un derivado de Isoxazolina, 3-fenil-4,5-dihidro-5-ácido isoxazoleacético Fuente: (Sarveswari & Vijayakumar, 2016) 42
- Figura 5.** Sitios de inhibición en la cadena respiratoria mitocondrial. Fuente: (Gonzales, 2007)..... 43
- Figura 6.** Acción de desacopladores en fosforilación oxidativa. Fuente: (Lemasters et al., 1998)..... 45
- Figura 7.** Híbrido molecular de THQ/Isoxazolina con un hidrógeno como sustituyente.... 56
- Figura 8.** Estructura molecular de la salinomicina 57
- Figura 9.** Consumo de oxígeno vía complejo I empleando glutamato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 81.8 ± 5.7 nmoles O/s mg proteína, 17.1 ± 13.5 nmoles O/s mg proteína, 3.2 ± 0.2 y 3.3 ± 0.3 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$ 59
- Figura 10.** Consumo de oxígeno vía complejo II empleando succinato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 168.7 ± 5.5 nmoles O/s mg proteína, 42.7 ± 2.6 nmoles O/s mg proteína, 1.9 ± 0.2 y 3.9 ± 0.4 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de

consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$ 60

Figura 11. Híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina con un metil como sustituyente. 61

Figura 12. Estructura molecular del linalool. 62

Figura 13. Consumo de oxígeno vía complejo I empleando glutamato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 48.7 ± 6.6 nmoles O/s mg proteína, 11.9 ± 5.7 nmoles O/s mg proteína, 3.1 ± 0.1 y 3.2 ± 1.9 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ 64

Figura 14. Consumo de oxígeno vía complejo II empleando succinato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 59.6 ± 6.5 nmoles O/s mg proteína, 16.7 ± 2.6 nmoles O/s mg proteína, 1.0 ± 0.2 y 3.5 ± 0.2 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ 65

Figura 15. Híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina con un metoxi como sustituyente. . 66

Figura 16. Consumo de oxígeno vía complejo I empleando glutamato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 65.0 ± 6.2 nmoles O/s mg proteína, 15.9 ± 5.5 nmoles O/s mg proteína, 3.3 ± 0.2 y 3.5 ± 0.5 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de

consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. *p<0,05..... 68

Figura 17. Consumo de oxígeno vía complejo II empleando succinato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 441.48 ± 78.63 nmoles O/s mg proteína, 78.58 ± 15.61 nmoles O/s mg proteína, 1.1 ± 0.4 y 6.1 ± 0.9 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. *p<0,05..... 69

Figura 18. Híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina con un cloro como sustituyente..... 70

Figura 19. Consumo de oxígeno vía complejo I empleando glutamato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 71.6 ± 20.9 nmoles O/min mg proteína, 20.8 ± 3.2 nmoles O/min mg proteína O/min mg proteína, 3.0 ± 0.3 y 3.4 ± 0.6 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. *p<0,05 72

Figura 20. Consumo de oxígeno vía complejo II empleando succinato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 56.7 ± 2.9 nmoles O/min mg proteína, 16.4 ± 1.8 nmoles O/min mg proteína O/min mg proteína, 1.2 ± 0.2 y 3.3 ± 0.2 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. *p<0,05 73

Figura 21. Efecto de los distintos híbridos moleculares de THQ/Isozaxolina sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondria. Los valores del 100% corresponden a: NADH oxidasa: 72.91 ± 14.7 nmol O₂ consumido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína mitocondrial; NADH deshidrogenasa: 1.72 ± 0.62 μmol de ferricianuro reducido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína mitocondrial; NADH citocromo c reductasa: 0.17 ± 0.01 μmol de citocromo c reducido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína mitocondrial; Succinato oxidasa: 10.46 ± 5.61 nmol O₂ consumido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína mitocondrial; Succinato deshidrogenasa: 0.013 ± 0.002 pmol of DCPIP reducido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína mitocondrial; Citocromo c oxidasa: 7.38 ± 1.28 nmol de citocromo c oxidado por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína mitocondrial..... 77

Figura 22. Efecto del compuesto A1 sobre la succinato citocromo c reductasa: El valor del 100% corresponde a: 20.42 ± 0.22 nmol of citocromo c reductasa por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína mitocondrial..... 78

Figura 23. Efecto de los distintos híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina sobre la actividad ATPasa en: a) mitocondrias fragmentadas b) mitocondrias íntegras. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. *significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$). La actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas e íntegras 100% de actividad corresponde a 7.29 ± 0.24 y 41.43 ± 5.49 μmol de Pi hidrolizado, respectivamente..... 79

Apéndices

Apéndice	a.	Estructura molecular de compuestos híbridos de Tetrahydroquinolinas/Isoxazolina evaluados.	93
----------	----	---	----

RESUMEN

TÍTULO: Relación Estructura/Actividad de Híbridos Moleculares de Tetrahydroquinolina/Isoxazolina Sobre el Metabolismo Bioenergético Mitocondrial

AUTOR: Ana Milena Pérez Silva**

PALABRAS CLAVE: Melanoma murino, agentes desacopladores, bioenergética.

DESCRIPCIÓN:

El melanoma invasivo de piel es considerado un problema de salud pública dado su incremento constante de incidencia en las últimas décadas. Anualmente se diagnostican alrededor de 200.000 nuevos casos de lesiones malignas de piel en el mundo y 46.500 muertes. Sin embargo, pese a la constante búsqueda de nuevos agentes con potencial anticancerígeno, los fármacos empleados no suelen ser selectivos hacia células cancerígenas, desencadenan efectos secundarios y son proclives a crear resistencia. En consecuencia, en el presente trabajo se evaluó el mecanismo de acción y el efecto de una serie de derivados de híbridos moleculares de Tetrahydroquinolina/Isoxazolina con sustituyentes (hidrógeno, metil, metoxi y cloro en el C-6 del anillo tetrahydroquinolínico) a 1, 5, 12.5 y 25 μ M sobre el metabolismo bioenergético mitocondrial, con base en resultados preliminares que indican que estos compuestos presentan efectos citotóxicos sobre las células de melanoma murino. Para alcanzar este objetivo se aislaron mitocondrias íntegras de hígado de rata Wistar siguiendo el método reportado por Voss, y se incubaron con los híbridos de THQ/Isoxazolina empleando glutamato y succinato como sustratos oxidables. El oxígeno consumido fue cuantificado empleando un oxígrafo Hansatech con un electrodo tipo Clark. Además, se evaluó el efecto de estos híbridos sobre las enzimas involucradas en el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial mediante métodos espectrofotométricos y polarográficos. Los resultados obtenidos indican que los híbridos moleculares evaluados poseen una posible actividad desacopladora, desarticulando la oxidación de sustratos con la síntesis de ATP mediante el transporte de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial. Esto genera la disminución del potencial de membrana y, en consecuencia, un aumento del transporte de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria para compensar esta pérdida.

Abstract

TITLE: Structure/Activity Relationships of Tetrahydroquinoline/Isloxazoline Molecular Hybrids of on Mitochondrial Bioenergetic Metabolism

AUTHOR: Ana Milena Pérez Silva

KEYWORDS: Invasive melanoma, uncoupling agents, bioenergetic.

DESCRIPTION:

Invasive melanoma is a public health problem due to its constant incidence in the recent global trends. Annually, there are almost 200.000 new cases of skin cancer diagnosed and 46.500 deaths around the world. However, despite the constant search for new agents with anticancer potential, the drugs used are not selective towards cancer cells, trigger side effects and induce resistance. Consequently, in this paper, we evaluated the mechanism of action and the effect of some molecular hybrid products of Tetrahydroquinoline/Isloxazoline with a substituent (hydrogen, methyl, methoxy and chlorine on the C-6 of the tetrahydroquinoline ring) at 1, 5, 12.5 and 25 μ M on mitochondrial bioenergetic metabolism, based on preliminary results that indicate that these compounds have cytotoxic effects on murine melanoma cells. To achieve this goal, intact Wistar rat liver mitochondria were isolated following the method reported by Voss, and they were incubated with the THQ/Isloxazoline hybrids using glutamate and succinate as oxidizable substrates. The oxygen consumed was quantified using a Hansatech oxygraph with a Clark type electrode. In addition, we evaluated the effect of these hybrids on the enzymes involved in the electron transport chain by using some spectrophotometric and polarographic methods. The results indicate that those molecular hybrids have a possible uncoupling activity, disarticulating the oxidation of substrates with the synthesis of ATP through the transport of protons from the intermembrane space to the mitochondrial matrix. This generates the decrease of the membrane potential and, consequently, an increase in the transport of electrons through the complexes of the respiratory chain to compensate this loss.

Introducción

Actualmente, debido a la demografía cambiante de la población y su incremento en la esperanza de vida media, se pronostica una mayor incidencia de enfermedades por disfunción mitocondrial a lo largo del siglo XXI; entre ellas, tumores malignos (cáncer) o enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por desórdenes resultantes de la deficiencia de una o más proteínas localizadas en las mitocondrias e involucradas en el metabolismo (Frew, 2001). Es por esto que, la modulación mitocondrial representa un papel importante en el tratamiento contra el cáncer; siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual estima cerca de 14 millones de víctimas por metástasis en el año 2012 (Torre et al., 2015) y un incremento constante el número de muertes. De hecho, se presentan cifras de 8.8 millones de nuevos casos por cáncer para el año 2015, número en ascenso para las próximas dos décadas (Ferlay et al., 2015). Sin embargo, estas estadísticas se registran principalmente en países de ingresos medios y bajos, pues sólo un 30% de los países afectados dispone de tratamientos y planes para impulsar políticas de lucha contra dicha enfermedad (Silverberg & Lubera, 1983).

Particularmente, en Colombia se presentan más de 80.000 casos anuales por cáncer, con mayor tendencia en el género femenino, según los datos reportados en el año 2015 la tasa de incidencia se aproxima a 98.944 víctimas mujeres y 148.827 hombres (SEOM, 2015). Además, a finales del año 2010, cerca del 16,9% del total de defunciones en el país fueron ocasionadas por el cáncer. En contraste, en el área metropolitana de Bucaramanga, la tasa de

mortalidad para una muestra de 100.000 habitantes osciló alrededor de 124 casos nuevos en hombres y 145 en mujeres (ESE, 2012).

Aunque actualmente se conocen más de 200 tipos de cáncer dependiendo del tejido del que se deriven, la OMS establece que aquellos con más alta frecuencia de afección son del tipo pulmonar, hepático, gástrico, mamario y de esófago (sin incluir el cáncer de piel). Sin embargo, el melanoma maligno (MM) cutáneo representa la forma más letal de cáncer de piel, con aproximadamente 77% del total de muertes por neoplasias (Tracey & Vij, 2015). Anualmente se diagnostican alrededor de 200.000 nuevos casos de MM en el mundo y 46.500 muertes. Incluso, en el 2014, la tasa mundial de incidencia aproximada de MM fue de 20/100.000 en hombres y 25/100.000 en mujeres (Ferlay et al., 2015)

Sin embargo, pese a la constante búsqueda de nuevos agentes con potencial anticancerígeno, los fármacos empleados no suelen ser selectivos hacia células cancerígenas, desencadenan efectos secundarios y, aún peor, son proclives a crear resistencia (Florea & Büsselberg, 2011). Es así como las industrias farmacéuticas centran su atención en la búsqueda de nuevos fármacos que permitan mejorar su especificidad hacia células cancerígenas y reducir los posibles efectos secundarios tras su administración (Sabroso & Suárez, 2013)

En consecuencia, el presente proyecto de investigación aborda como objetivo principal el estudio del efecto de distintos híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina sobre el metabolismo bioenergético mitocondrial, los cuales poseen una estructura similar con una variación en el sustituyente (X) del sexto carbono del núcleo tetrahydroquinolínico, A1 (X=H), A2 (X=CH₃), A3 (X=OCH₃) y A4 (X=Cl), siendo potenciales candidatos como

nuevos fármacos con un mayor potencial anticancerígeno y posibles moduladores de los parámetros propios de la respiración mitocondrial.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de los sustituyentes en cuatro híbridos moleculares de Tetrahydroquinolina/Isoxazolina sobre el metabolismo energético mitocondrial.

1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analizar las alteraciones de los parámetros de respiración mitocondrial por la acción de los cuatro híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina.

- ✓ Determinar el efecto de los cuatro híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina sobre la actividad de las enzimas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

2. Cuerpo del Trabajo

2.1 Marco referencial

2.1.1 Acerca del cáncer. Según la OMS, el cáncer es la segunda causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, justo después de las enfermedades cardíacas, y se estima que dicha cifra continuará en aumento en un 70% para los próximos 20 años (Torre et al., 2015). Específicamente, el melanoma invasivo de piel es considerado un problema de salud pública debido al incremento constante en su incidencia en las últimas décadas, de hecho se evidencia principalmente en regiones con poblaciones caucásicas como los Estados Unidos, Australia y Europa, presentado un incremento de 4 a 6 veces más en su tasa de incidencia; es decir, pasando de 3-4 casos a 12-18 casos/100.000 habitantes por año (Tracey & Vij, 2015). En el área metropolitana de Bucaramanga en 2012 esta enfermedad se diagnosticó en 85 personas (UNAB, 2012).

En consecuencia, existe actualmente una constante búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas basadas en la inhibición del mecanismo de acción propio de la proliferación de células cancerígenas. Para abordar esta problemática, una de las alternativas se enfoca en la vía glucolítica como terapia potencial o blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer, realizando una dieta baja en carbohidratos para disminuir el número de metabolitos que ingresan en el ciclo de Krebs (Ho & Leung, 2011). En consecuencia, se dispone a continuación, un breve recuento del mecanismo de acción de las células cancerígenas para obtener su energía y así poder desarrollar nuevos fármacos que inhiban alguna actividad

enzimática durante su proceso de proliferación y posteriormente induzcan muerte celular en tumores malignos (Gibbs, 2000).

Básicamente, las células cancerígenas poseen una serie de distintivos; sin embargo, las dos características más relevantes son: (1) Presentan un alto nivel de proliferación celular a pesar de los mecanismos de control normales. (2) Invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células (Lobo & Shimono, 2007). Por consiguiente, se producen alteraciones en la morfología y fisiología, provocando una serie de patologías altamente dañinas para el ser humano. De hecho, desde hace varias décadas existe evidencia que hay una relación cercana entre los cambios metabólicos y genéticos observados durante el crecimiento proliferativo, donde se presenta una disminución del metabolismo energético mitocondrial paralelo con un aumento en la tasa glicolítica, denominado “Efecto Warburg”, donde las células cancerosas prefieren la fermentación como fuente de energía en vez de una vía mitocondrial más eficiente como la fosforilación oxidativa (Cuezva & Krajewska, 2002).

Así, una vez establecido a grandes rasgos, el mecanismo de acción de las células cancerígenas para obtener energía y así lograr su veloz proliferación, se procede a estudiar la mitocondria como blanco terapéutico en tratamientos contra el cáncer por ser responsable de las distintas vías de señalización de muerte celular inducida, empleando como base los estudios preliminares acerca de estos fármacos para sintetizar híbridos con distintos sustituyentes que permitan posiblemente potencializar su actividad anticancerígena y de ahí, estudiar su mecanismo de acción.

2.1.2 La mitocondria como diana farmacológica. Recientemente, el estudio de la mitocondria no solamente está implicado en su papel sobre el metabolismo bioenergético, también constituye el primer plano del sector más influyente de la sociedad médica (Modica & Singh, 2004). En particular, durante las últimas décadas, muchos investigadores se han enfocado en su estudio, al ser considerada el lugar donde convergen diferentes vías de señalización de muerte celular por apoptosis, necrosis, autofagia y ferroptosis (Kroemer & Reed, 2000). Además, esta organela modula los flujos de calcio a través de la célula; en particular, produce especies reactivas de oxígeno y otros compuestos, responsables de la óxido-reducción y detección de la hipoxia, participando en la diferenciación celular y en la inmunidad innata (Wallace, 2005). Así, evidentemente, el estudio de la mitocondria como diana farmacológica se convierte en un elemento clave como tratamiento en diversas patologías como el cáncer (Murphy & Smith, 2000).

En resumen, es preciso abordar a continuación, las distintas enfermedades relacionadas con alteraciones mitocondriales y los fármacos empleados en la modulación de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante la introducción de estudios preliminares acerca de la disfunción mitocondrial y su relación con el cáncer.

2.1.3 La disfunción mitocondrial y el cáncer. La disfunción mitocondrial es la alteración de cualquiera de los papeles funcionales anteriormente descritos para dicha organela, lo cual impide responder a las necesidades básicas de la célula. Por ende, la alteración de su adecuado funcionamiento puede originarse a partir del crecimiento y proliferación de células cancerígenas con requerimientos terapéuticos (Modica & Singh, 2004).

En los últimos años, decenas de enfermedades se han asociadas al funcionamiento defectuoso de la mitocondria, donde diversos fármacos inhibidores o activadores de distintos tipos de muerte celular -como se indica en la *Tabla 1*- pueden conducir a un descenso en la producción de ATP, formación de radicales libres y alteraciones en la homeostasis del calcio en la célula, reduciendo así el potencial de membrana (de Moura, dos Santos, & Van Houten, 2010).

Tabla 1

Fármacos que modulan la función mitocondrial

Tabla 1 Fármacos que modulan la función mitocondrial	
Activadores de la apoptosis	Tapsigargina, Doxorubicina,
Moduladores del estrés oxidativo	N-acetil cisteína, Ac. pantoténico, tocoferol
Agonistas de canales de potasio	Cromacalina, Nicorandil, Diazóxido
Sulfonilureasas	Glibenclamida, Glipicida
Benzodiazepinas	Ro5-4864 (4'-clordiazepan)
Inmunosupresores	Ciclosporina A
Antivirales	Zidovudina
Anti-inflamatorios no esteroideos	Aspirina, Ibuprofeno
Anestésicos locales	Dibucaína, Bupivacaína
Moduladores del metabolismo lipídico	L-aminocarnitina
Otros	Amiodarona, Cloranfenicol

Por ende, en un tejido normal el proceso metabólico se inicia por la oxidación de la glucosa vía glucolítica hacia piruvato, seguido de su ingreso al ciclo de Krebs y posterior oxidación a CO₂ y H₂O en la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa, generando 30 ó 32 moléculas de ATP, proporcionando la energía necesaria para el abastecimiento de la célula (Warburg, 1956). En un tejido maligno, la obtención del mismo número de moléculas de ATP transcurre a través de una fermentación láctica, donde el piruvato es convertido a lactato, sin considerar cuán alta sea la concentración de oxígeno, proceso conocido como “Efecto de Warburg” (Heiden & Cantley, 2009). Así, la formación de un tumor maligno

equivaldría a la captación rápida de glucosa y secreción acelerada de lactato por cambios en la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa en células tumorales, produciendo un aumento o disminución de la respiración mitocondrial, según sea el caso. En consecuencia, las alteraciones en las vías metabólicas se convierten en un blanco terapéutico ideal para el tratamiento contra el cáncer, siendo la glucosa, el acetato, el piruvato y los ácidos grasos, sustratos necesarios para impulsar el crecimiento tumoral (Ferreira, 2010), por ende, se dispone a continuación, el mecanismo de acción de diversos fármacos que regulan la modulación mitocondrial como diana farmacológica.

2.1.4 Desregulación del metabolismo energético. En la carcinogénesis, el papel de la mayoría de protooncogenes y genes supresores de tumores es evadir la supresión del crecimiento y la muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2011); sin embargo, se ha propuesto la idea que estos evolucionaron para regular el metabolismo como función primaria; por ende, a continuación se presenta la reprogramación del proceso metabólico celular en la *Tabla 2*, detallando la expresión de las proteínas HIF y p53 en el cáncer y su efecto en el metabolismo energético (Mendiola & Soto, 2014).

Tabla 2.

Proteínas en el metabolismo de células cancerígenas

Proteína	Expresión en cáncer	Efecto en metabolismo
Piruvato cinasa isoforma M2	Expresión aumentada en tumores y líneas celulares de cáncer	Glucólisis aumentada
Glutaminasa	Expresión aumentada en cáncer	Uso de glutamina como fuente de ATP
Vía P13K/Akt	Desregulada en cáncer	Glucólisis aumentada
HIF-1 α	Sobre expresada en cáncer	Glucólisis aumentada

p53	Mutado en cáncer	p53 activo inhibe glucólisis, promueve fosforilación oxidativa
PDK	Aumentada en cáncer	Glucólisis aumentada
Kisspeptina	Supresor de metástasis en cáncer de ovario, pulmón y melanoma	Promueve metabolismo oxidativo inhibiendo glucólisis

2.1.4.1 HIF 1A (Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia). Altos niveles de expresión de HIF están asociados con una alta mortalidad en el cáncer (Semenza, 2010), pues su papel principal consiste en la transcripción de la cinasa, la cual actúa sobre la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) que fosforila e inactiva a la piruvato deshidrogenasa (PDH), impidiendo que el piruvato ingrese en el ciclo de Krebs y, por ende, disminuyendo el consumo de oxígeno mitocondrial (Kim & Tchernyshyov, 2006). Además, la HIF también promueve la conversión de piruvato a lactato por medio de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), aumentando las posibilidades de proliferación de células cancerígenas (Lu, Tan, & Cai, 2015).

Finalmente, cabe resaltar que recientemente se ha demostrado que la HIF es capaz de atenuar la generación de especies reactiva de oxígeno (ROS) vía complejo I y IV, mediante la expresión de NDUFA4L2 (por sus siglas en inglés, NADH Dehydrogenase (ubiquinona) 1 alpha subcomplex 4-Like 2), proteína que inhibe la actividad de la cadena transportadora de electrones en el Complejo I, atenuando así el consumo y producción de ROS (Tello et al., 2011).

2.1.4.2 p53. La p53 es una proteína supresora de tumores debido a sus actividades de detención del ciclo celular y la inducción de apoptosis en respuesta al estrés. Sus actividades están encaminadas a detener el crecimiento de células cancerígenas, pues es capaz de controlar la glucólisis, la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos, el balance redox y la glutaminólisis (Berkers, Maddocks, Cheung, Mor, & Vousden, 2013). En consecuencia, las células deficientes en p53 presentan una sobreproducción de lactato y una disminución en la respiración mitocondrial en comparación con células normales; es decir, la p53 es capaz de suprimir el efecto Warburg (Matoba, Wragg, & Boehm, 2002).

Esta regulación está involucrada con el balance entre la vía glucolítica y la cadena respiratoria, donde los niveles basales de p53 promueven la activación transcripcional de SCO₂, responsable de regular el ensamblaje del complejo IV en la cadena transportadora de electrones; donde, su inactivación promueve la entrada de piruvato hacia la mitocondria para activar el metabolismo oxidativo (Contractor & Harris, 2012). Además, es capaz de restringir el flujo glucolítico mediante la activación transcripcional de TIGAR, proteína que actúa como fructosa-2,6-bifosfatasa, disminuyendo la cantidad de fructosa-2,6-bifosfato y, en consecuencia, la actividad de la fosfofructo cinasa 1 (PFK1) (Bensaad et al., 2006). En conclusión, la p53 contrarresta el efecto Warburg, favoreciendo la fosforilación oxidativa y disminuyendo el flujo glucolítico; efectos sobre el metabolismo celular que contribuyen a la supresión del desarrollo y progresión tumoral.

Es así como los avances de investigación sobre el metabolismo del cáncer han ampliado el entendimiento de cómo las diversas alteraciones metabólicas sostienen los requerimientos metabólicos asociados con la proliferación celular presenciadas en el cáncer, lo cual permite

considerar alguna estrategia para el tratamiento del cáncer en la farmacología mitocondrial e inducir algunos de los distintos procesos de muerte celular mencionados a continuación.

2.1.5 Muerte Celular. Actualmente, se conocen distintos tipos de muerte celular; sin embargo, cada una posee su propio mecanismo de acción y consecuencia por inhibición. En grandes rasgos, la muerte celular es el cese de las funciones vitales de una célula, originando pérdidas en la integridad de la membrana e incapacidad para proliferar (R. Ellis, Yuan, & Horvitz, 2000). Entre las más comunes se destacan apoptosis, necrosis y autofagia, descritas a continuación.

2.1.5.1 Apoptosis. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular controlado genéticamente por el cual las células inducen su propia muerte como respuesta a ciertos estímulos, tales como el daño al ADN, la pérdida de la matriz extracelular, entre otras (Hu & Kavanagh, 2003). Este proceso ha adquirido fuerza en el área del cáncer, pues resulta útil conocer el mecanismo de acción de fármacos asociados a una enfermedad particular y la efectividad de sus tratamientos. Sin embargo, debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, la aparición de eventos relacionados y su detección depende de múltiples factores, entre ellos, cambios en la simetría de la membrana celular o activación de proteínas específicas (Machado & Eliécer, 2011).

En condiciones normales, la apoptosis resulta ser un mecanismo ideal para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, empleada como respuesta frente a cualquier tipo de agresión que supone la entrada de un microorganismo, o compuestos xenobióticos,

entre otras patologías, donde gran parte de las células del sistema inmune que contribuyen a impedir dicha ‘infección’, son eliminadas mediante este tipo de muerte. Sin embargo, en la apoptosis, la membrana celular no es destruida, impidiendo el escape de su contenido hacia el espacio extracelular, siendo así un proceso “silencioso” sin inflamación (R. Ellis et al., 2000).

Igualmente, ese proceso de muerte celular puede ser inducido mediante dos mecanismos distintos, la vía extrínseca y la vía mediada por la mitocondria o vía intrínseca.

a) Vía extrínseca

Mediante la vía extrínseca, se establecen conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales pro-apoptóticas desde el exterior. Dos familias de receptores son identificadas dentro de este grupo, tales como la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF). La primera se enlaza con un factor intermedio denominado FADD (Fas-associated protein with death domain) que se encarga de transmitir la señal de la muerte de la superficie hacia las vías de dominio intracelular mediante la activación de las caspasas 8 y 10, las cuales activan la fase de ejecución de la apoptosis mediante la caspasa 3 (Fulda & Debatin, 2006).

b) Vía intrínseca o mediada por la mitocondria

La muerte celular vía mitocondrial está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2, su activación genera un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana, tales como el citocromo c y la Smac/DIABLO, este primero una vez en el citosol, activa un complejo proteico (apoptosoma)

que permite la activación de la caspasa 9 y esta a su vez activa la caspasa 3 y 7, desencadenando las últimas fases de la apoptosis por fragmentación nuclear (Machado & Eliécer, 2011); mientras, la Smac/DIABLO se une a proteínas inhibitoras para impedir la detención del proceso apoptótico. Cabe aclarar que existen también diversos receptores y estímulos que pueden activar de igual manera este tipo de muerte celular, tales como la radiación o radicales libres, donde las principales consecuencias de un cambio de permeabilidad radican en la pérdida del potencial de membrana y la detención del funcionamiento mitocondrial (Lemasters et al., 1998). No obstante, este proceso de muerte celular también está regulado no sólo mediante la vía dependiente de caspasas, sino por proteínas pro-apoptóticas, tales como la endonucleasa G y el factor de inducción de la apoptosis (AIF), promoviendo la fragmentación del ADN (Green & Science, 1998).

c) Necrosis

La necrosis consiste en la ruptura de la membrana plasmática, seguido de la salida del material intracelular. Desde el punto de vista morfológico, la necrosis es el resultado de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática debido a una disminución de la actividad de las bombas dependientes de ATP (Skulachev, 2006), las cuales desencadenan la apertura de canales en la membrana citoplasmática y, como consecuencia, el ingreso de cationes que posteriormente resulta en un hinchamiento celular y una ruptura membranal (Golstein & Kroemer, 2007). Además, otro factor desencadenante de este proceso de muerte celular proviene del estrés ocasionado a raíz de un déficit en el aporte de O₂ y, por consiguiente, una disminución de moléculas de ATP, tal como se presencia en la región interna de ciertos tumores (Buja & Eigenbrodt, 1993).

Así mismo, en ciertas ocasiones, distintos ligandos extracelulares inducen necrosis mediante la sobreproducción de calcio mitocondrial o activación de proteasas dependientes de calcio, las cuales, como consecuencia de su larga estadía, provocan la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) que inducen una incapacidad de producción de ATP y por ende, una muerte celular por disfunción (Lemasters et al., 1998). Finalmente, la mitocondria también es la fuente principal de EROs, las cuales pueden desencadenar el mismo efecto por daños en el ADN o pérdida de la integridad de la membrana plasmática, con la consiguiente liberación de proteasas o flujo de calcio mitocondrial (Skulachev, 2006).

Es así como, habiendo abarcado a grandes rasgos los mecanismos de muerte celular, se puede estudiar cómo actualmente se ha empleado ese conocimiento para crear nuevas terapias contra el cáncer que induzcan una muerte celular programada, así como derivados de farmacóforos que han exhibido actividades biológicas y antitumorales por poseer en su estructura núcleos heterocíclicos de THQ/Isoxazolina y podrían resultar en un nuevo tratamiento contra neoplasias en la farmacología mitocondrial.

2.1.6 Farmacología mitocondrial: La mitocondria como blanco terapéutico. Existe un sinnúmero de estudios centrados en la investigación de la mitocondria como diana farmacológica, basándose en la capacidad reguladora que dicha organela presenta sobre los procesos de muerte celular, tales como la intervención para terapias contra el cáncer, la diabetes y problemas cardiovasculares (Armstrong, 2006; 2009). Actualmente, se dispone de un abanico amplio de fármacos que modulan la función mitocondrial, entre antivirales,

antitumorales, inmunosupresores y agonistas de canales de potasio (Zanamivir, adriblastina, ciclosporina, entre otros) (Smith, Hartley, Cochemé & Murphy, 2012). Sin embargo, la modulación farmacológica mitocondrial puede encaminarse hacia la inducción o bloqueo de los procesos apoptóticos, sin ignorar los posibles efectos secundarios que estos desencadenarían (Feinberg, 2016).

Por tanto, a continuación, se presenta en la *Figura 1*, tres estrategias básicas para ser implementadas en los fármacos que modulen la mitocondria como blanco terapéutico. La primera consiste en la síntesis de moléculas que se acumulen dentro de la mitocondria de manera selectiva. La segunda, en el empleo de moléculas que se unan a blanco específico dentro de dicha organela. Y finalmente, la tercera, en la modulación de los procesos fuera de la mitocondria que impacten positivamente en la función mitocondrial (Ortiz & Martínez, 2014).

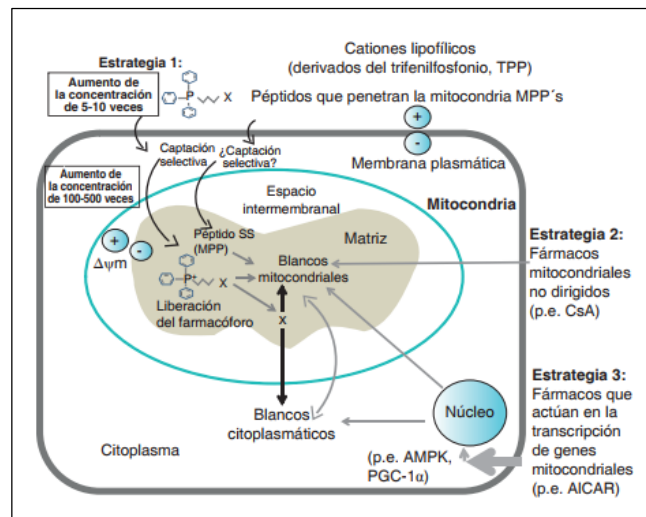


Figura 1. Intervención farmacológica en disfunción mitocondrial. Fuente: (M. Martínez, 2014)

La primera estrategia consiste en dirigir compuestos a la mitocondria por conjugación a un catión lipofílico (TPP), generando una captación selectiva del farmacóforo en la matriz mitocondrial. Secundariamente, se emplean compuestos no dirigidos hacia la mitocondria, sino hacia la unión a blancos específicos. Finalmente, compuestos capaces de actuar en la disfunción mitocondrial afectando procesos fuera de la mitocondria, tales como la modulación de las actividades de diversas cinasas o de factores de transcripción (M. Martínez, 2014).

Por ende, se dispone en el mercado cientos de fármacos con actividades pro-apoptóticas para lograr tratamientos más efectivos en terapias contra el cáncer, las cuales actualmente suelen ser proclives a crear resistencias y numerosos efectos adversos tras su consumo; a continuación, se describe el modo de acción de aquellas más comúnmente empleadas.

2.1.7 Terapias contra el cáncer. Actualmente, existen diversas terapias dirigidas contra el cáncer, fármacos o sustancias que bloquean el crecimiento y diseminación de células cancerígenas al interferir en blancos moleculares que participan en el crecimiento, avance y difusión del cáncer (Hu & Kavanagh, 2003). Sin embargo, en pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, las opciones estándares suelen ser la quimioterapia y radioterapia. Son múltiples las opciones para tratar la enfermedad, pero pocas las aceptadas por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, del inglés Food and Drug Administration) (Bauer & Temple, 2013).

Antes de relatar el mecanismo de acción de fármacos en particular, cabe resaltar el proceso del ciclo celular de células cancerosas y determinar a grandes rasgos, el modo de acción de nuevas terapias contra el cáncer. El crecimiento de cada célula se inicia en la fase G1, donde se producen las enzimas requeridas para la síntesis de ADN y ARN; mientras, se sintetiza ADN en la fase S. Posteriormente, la célula tumoral ingresa en un periodo premitótico o fase G2, en el que se sintetiza ARN y proteínas, seguido por la mitosis o fase M, donde se presenta la división física, que lleva a la formación de dos células hijas que entran de nuevo en la fase G1 (Sherr, 1996). Esta última fase está en equilibrio con el estado de reposo, G0. Las células en fase G0 son inactivas respecto a la síntesis de macromoléculas, siendo insensibles a muchos de los agentes quimioterapéuticos, en especial, a aquellos que afecten a la síntesis de macromoléculas (Mitchison & Carter, 1975).

Los diferentes fármacos antineoplásicos actúan sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. La respuesta obtenida se relaciona directamente con la capacidad proliferativa de la célula, que está determinada por el tiempo de duplicación del tumor. En general, a mayor proliferación se prevé una mayor respuesta al tratamiento citostático (Pettit, Hoard, Doubek, & Schmidt, 2002). El desarrollo del cáncer resulta en nuevas alteraciones genéticas, provocando una heterogeneidad celular y, por ende, propiedades bioquímicas, tiempo de duplicación y respuesta contra tratamientos antitumorales distintos, vinculados estrechamente con la aparición de resistencias (Liu, 2009).

Comúnmente, existen decenas de fármacos antineoplásicos; sin embargo, se deben administrar al menos dos fármacos que actúen sobre distintas dianas terapéuticas y sin

toxicidad cruzada, reduciendo su toxicidad, aumentando su eficacia y disminuyendo las posibilidades de nuevas resistencias (Pettit et al., 2002). A continuación, se describe el modo de acción de las terapias más comunes y algunos de los fármacos empleados actualmente como tratamiento contra el cáncer.

2.1.8 Ejemplos de terapias y fármacos empleados en la actualidad. Como estrategias para el tratamiento contra el cáncer existen decenas de opciones; sin embargo, se presentan a groso modo el mecanismo de acción de las terapias más comúnmente empleadas hoy en día, tales como la quimioterapia, la terapia dirigida, la radioterapia y la terapia génica. El objetivo de la quimioterapia consiste principalmente en la destrucción, detención o reducción de células malignas capaces de multiplicarse descontroladamente hasta hacer metástasis e invadir y afectar órganos colindantes. Esta terapia incluye distintos compuestos que inducen daños en el ADN de las células tumorales y posteriormente la muerte celular, tales como agentes alquilantes, inhibidores de mitosis o antimetabolitos (Kaufmann & Earnshaw, 2000). No obstante, la efectividad de dicha terapia está limitada por su toxicidad sistemática, falta de especificidad, rápido metabolismo farmacológico y nuevas resistencias (Zitvogel & Apetoh, 2008).

La terapia dirigida consiste en un tratamiento con el uso de fármacos y sustancias que bloquean el crecimiento y difusión del cáncer al actuar sobre proteínas específicas responsables del crecimiento y desarrollo celular (L. Ellis & Hicklin, 2008). Su modo de acción requiere de blancos farmacológicos claves en el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas, tal como la proteína receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico

humano (HER-2), la cual se expresa en altas concentraciones sobre la superficie de células cancerosas (L. Ellis & Hicklin, 2008). Algunas terapias dirigidas van contra esta proteína, es el caso del Trastuzumab (Herceptina), fármaco aprobado para tratar cáncer de seno y estómago (Bauer & Temple, 2013).

La radioterapia emplea radiaciones ionizantes que provocan alteraciones químicas en la materia viva mediante ruptura de enlaces covalentes y formación de radicales libres, afectando radicalmente el ADN celular. Una radiación ionizante interactúa con el ADN empleando un modo de acción directo donde la radiación es absorbida directamente por el ADN, o indirecto donde el agua absorbe la radiación y produce radicales libres (grupos OH) que reaccionan con el ADN, provocando lesiones similares sobre el mismo. Ambos hechos desencadenan pérdidas de bases nitrogenadas, ruptura de puentes de hidrógeno y rupturas simples o dobles de las cadenas de ADN (Hu & Kavanagh, 2003).

La terapia génica (TG) consiste en la introducción de nuevo material genético dentro de la célula para obtener un beneficio terapéutico. Por ende, en la TG como tratamiento contra el cáncer es factible introducir un 'gen suicida' de manera específica en células neoplásicas o infectadas con un patógeno peligroso, para que sólo estas células blancas sean destruidas, sin afectar o alterar las células sanas circundantes (Murphy & Smith, 2000).

Por último, los fármacos antineoplásicos son aquellos capaces de lesionar el ADN e interferir en la replicación celular; su modo de acción consiste en provocar un efecto citotóxico mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y demás moléculas nucleófilas presentes en la célula, en especial las bases nitrogenadas del ADN,

bloqueando así la replicación del ADN celular, la transcripción del ARN y, por ende, la mitosis y síntesis de proteínas (Pettit et al., 2002). Dentro de este grupo se encuentran los alquilantes clásicos (ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, melfalán, trofosfamida), nitrosoureas (carmustina, estramustina, fotemustina) y tetrazinas (dacarbacina, temozolomida) (Bauer & Temple, 2013). De hecho, la mayor fuente en la búsqueda de compuestos bioactivos naturales para drogas anticancerígenas consiste en la especie *Croton* (Suárez et al., 2006), la cual presenta propiedades farmacológicas importantes, tales como antiinflamatorias (Phan Minh & Jeong Hyung, 2003), antinociceptivas (Nardi, DalBó, & Pizzolatti, 2006) y antineoplásicas (A. Martínez, 2001).

Los extractos puros de *Croton caracasana*, tal como se observa en la *Figura 2*, presentan una significativa actividad antiinflamatoria y actividad citotóxica contra líneas cancerígenas humanas (Suárez, Chavez, Mateu, & Compagnone, 2009), específicamente cáncer de próstata (PC3) y de útero (HeLa), reportando una actividad citotóxica con IC₅₀ de 2,82 µg/mL y 8,76 µg/mL, respectivamente.

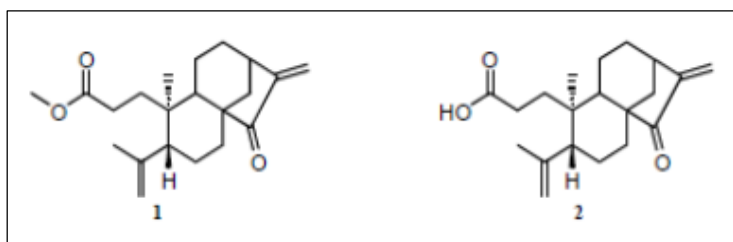


Figura 2. Estructura de 1) Caracaine, 2) Ácido caracaine. Fuente: (Kouznetsov, 2012)

Por ende, se dispone en el mercado cientos de fármacos con actividades pro-apoptóticas con el fin de matar la célula, y anti-apoptóticas con el fin de prevenir su muerte, los cuales se describen a continuación mediante su mecanismo de acción. (Szeto & Atkinson, 2014)

2.1.8.1 Fármacos pro-apoptóticos. Los mecanismos de acción de dichos fármacos son principalmente la manipulación de la concentración de calcio en el interior de las células, tal como la taspigargina, un inhibidor de la ATPasa- Ca^{2+} del retículo endoplasmático, la cual previene la acumulación de calcio en el retículo e induce apoptosis (Jarpe & Widmann, 1998). Así mismo, existen otros promotores apoptóticos como las especies reactivas de oxígeno (EROS), donde la producción excesiva de radicales libres puede ser inducida por un gran número de xenobióticos. Finalmente, la activación de los poros de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) o la modificación de la estabilidad de la membrana mitocondrial es el principal mecanismo de acción de cientos de fármacos con potencial anticancerígeno. (Tornero, Peña & Jordán, 2002).

2.1.8.2 Fármacos anti-apoptóticos. Con el objetivo de prevenir la muerte mitocondrial por el daño producido por las EROS, se administran fármacos anti-apoptóticos capaces de aumentar los valores de glutatión por medio del aumento de la coenzima A y su precursor, el ácido pantocénico (medicamento más comúnmente empleado), pues el glutatión es el principal antioxidante de las células, capaz de protegerla de las especies reactivas de oxígeno, tales como los radicales libres y los peróxidos. (Jarpe & Widmann, 1998). Sin embargo, existen también otros antioxidantes intracelulares como el ácido ascórbico, el alfatocoferol y el betacaroteno; así como antioxidantes naturales como el ubiquinol, la forma reducida de la coenzima Q, que además de la mitocondria, tiene como diana otras membranas celulares y permite retardar y reducir la sintomatología típica de enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (Simon, Haj-Yehia, Schaffer, 2000).

2.1.8.3 Fármacos antivirales. La mitocondria se ha planteado como una diana farmacológica potencial en la toxicidad inducida por análogos de nucleósidos empleados como fármacos antivirales. Es el caso de la zidovudina (AZT) para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pues es capaz de inducir la disfunción mitocondrial al inhibir la DNA polimerasa γ , lo cual conduce a una depleción progresiva del DNA mitocondrial, una alteración en la transcripción, y, en consecuencia, la pérdida de la función de fosforilación oxidativa (Rodríguez & Aguilar, 2013).

2.1.8.4 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tales como los salicilatos y el ibuprofeno, comúnmente prescritos, presentan efectos secundarios mediados por una disfunción mitocondrial e inhibición de ciclooxigenasas, pues dichos fármacos modifican la fosforilación oxidativa, inhibiendo la producción de ATP y alterando la permeabilidad de la membrana interna. Por tanto, su modulación en el metabolismo bioenergético mitocondrial y activación de los PPTM, son pieza clave en su implicación sobre el síndrome infantil de Reye (Bateman, 2007).

2.1.8.5 Fármacos inmunosupresores. La ciclosporina A es un fármaco inmunosupresor capaz de bloquear la transcripción de genes en células T activadas; además, es ampliamente empleado para evitar los rechazos en trasplantes de órganos. A nivel mitocondrial, la ciclosporina A bloquea la formación de los poros de permeabilidad transitoria mitocondrial, el cual corresponde a su mecanismo de acción en la protección de las células frente a una lesión isquémica (Lahoz & Gombau, 2015)

2.1.8.6 Anestésicos locales. Dichos fármacos son capaces de bloquear la conducción del impulso nervioso, causando una parálisis sensorial. Los anestésicos locales afectan principalmente el metabolismo energético mitocondrial debido al desacople de la fosforilación oxidativa, los más representativos en el sector médico son la lidocaína y la epinefrina. Además, estos fármacos producen una inhibición de la ATPasa mitocondrial y de los complejos enzimáticos que generan el gradiente electroquímico, por tanto, dicho mecanismo de acción es el responsable de los efectos tóxicos presentes durante la analgesia (Strichartz, 2013).

2.1.8.7 Fármacos de interacción con canales de potasio. Los agonistas de canales de potasio son fármacos que estimulan el flujo iónico a través de dichos canales, este grupo lo constituye la romacalima, el nocorandil y el diazóxido, esencialmente. Debido a sus propiedades antianginosas y antihipertensivas, se emplean como agentes cardioprotectores y reguladores de la hipertensión vascular y pulmonar (Lawson, 2013).

Así básicamente, la modulación de la función mitocondrial puede suponer un gran avance farmacológico, pues es preciso identificar cómo activar o inactivar la muerte celular programada, constituyéndose así, como una pieza clave para el tratamiento de diversas patologías que presentan a la mitocondria como diana farmacológica (Grattagliano, Oliveira & Portincasa, 2015).

No obstante, a pesar del sinnúmero de fármacos que actualmente existen en el mercado, científicos buscan sintetizar nuevas moléculas con alto potencial anticancerígeno, las cuales sean más específicas hacia células cancerígenas y no desencadenen efectos secundarios. Por ende, en este proyecto se profundiza especialmente en fármacos con núcleos de THQ/Isoxazolina que, según estudios preliminares, presentan efectos citotóxicos relevantes sobre células de melanoma murino.

2.1.8.8 Tetrahydroquinolina y su importancia biológica. Actualmente, en la industria médica, el enfoque está presente sobre la construcción de moléculas con mayor actividad biológica y que podrían convertirse en soluciones definitivas, más específicas y, por ende, con mayor efectividad para un espectro amplio de patologías por disfunción mitocondrial (Jacquemonde-Collet et al., 2002). Una de las familias de alcaloides más estudiada por sus interesantes propiedades farmacológicas es la de los compuestos quinolínicos, donde muchos de sus derivados pueden actuar como agentes analgésicos potentes, hipertensores, virucidas, entre otros (Kouznetsov, 2012). Es por ello que el desarrollo de nuevas rutas sintéticas que permitan construir este sistema es el principal objetivo de estudio en químicos orgánicos, para así finalmente realizar modificaciones estructurales que ayuden a mejorar los parámetros fisicoquímicos de dichos modelos.

El sistema de anillo de la tetrahydroquinolina (THQ) posee una geometría estructural muy común, se encuentra en numerosos productos naturales biológicamente activos, así como en agentes terapéuticos farmacológicamente relevantes. Debido a su importancia para el desarrollo de drogas con actividad biológica y potencial anticancerígeno, la química medicinal continúa investigando nuevos métodos de síntesis de derivados de

tetrahydroquinolina activos en un campo específico de la medicina (Jacquemon-Collet et al., 2002). Estos compuestos han sido testeados en distintas líneas de cáncer humano y células control, determinando su actividad citotóxica por medio del método del MTT (proceso para determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales), mostrando además una amplia acción en las distintas líneas y, por ende, siendo de vital importancia por su acción antitumoral (Kouznetsov, 2012).

Los derivados de las tetrahydroquinolinas son una importante clase de productos naturales y sintéticos. Diversos estudios han demostrado que poseen un amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas, entre ellas antimalárica (Jacquemon-Collet et al., 2002), antitumoral (Y.-L. Chen, Zhao, Lu, Tzeng, & Wang, 2006), antioxidante (Dorey, Lockhart, Lestage, & Casara, 2000) y antimicrobiana (Vangapandu, Jain, Jain, Kaur, & Pal Singh, 2004). Ejemplos específicos de estos potenciales agentes anticancerígenos se presentan en la *Figura 3*, tales como el 4-metoxi-3-hidroxifenil (isovalina) ó 3-metoxi-4-hidroxifenil (valina), unidades estructurales semejantes a la combrestatina A4, indanocina, eugenol y demás análogos que han sido reportados por tener altas propiedades anticancerígenas (Cesare, Tracey Piralí, Giovanni Sorba, & Francesca Pagliai, 2006).

Todos los modelos de estudio representan un alto enfoque en la comunidad científica; al menos en los últimos años, su estudio se centra como compuestos con elevada actividad antitumoral, donde el grupo de compuestos químicos derivados de las familias de las tetrahydroquinolina fueron sintetizados a partir de un compuesto fenilpropano, isoeugenol, el cual es una molécula natural extraída por lo general de plantas canela (A. Martínez, 2001).

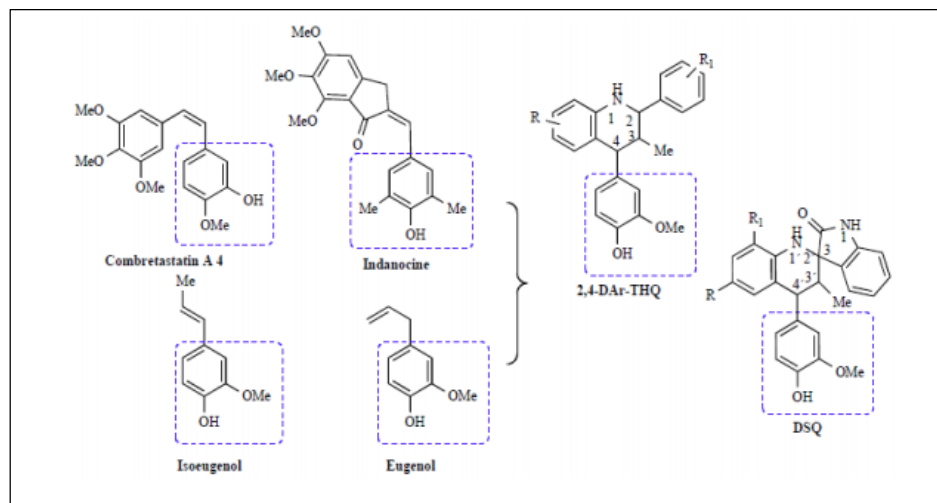


Figura 3. Diseño de potentes agentes anticancerígenos. Fuente: (Kouznetsov, 2012)

2.1.8.9 Isoxazolina y su importancia biológica. Las isoxazolininas son heterociclos de cinco miembros que presentan dentro de su estructura un átomo de oxígeno y nitrógeno, reconocidos por su relevancia farmacológica pues, así como las tetrahydroquinolinas, han demostrado ser farmacóforos con propiedades estéricas características para asegurar una mejor respuesta biológica frente a un blanco (Meléndez Gómez & Kouznetsov, 2005), dentro de las actividades que se le asocian se enuncia su actividad anti VIH y antitumorales frente a ciertas líneas celulares, tales como MCF 7, disminuyendo el número de células en fase S y aumentando las presentes en fase G0/G1 (Kaur, Kumar, Sharma, & Gupta, 2014).

Los derivados de las isoxazolininas más comúnmente estudiados debido a sus amplios espectros biológicos y sus actividades citotóxicas sobre líneas celulares de carcinoma mamario murino (4T1) son el indol-3-carboxaldehído, con una citotoxicidad a la concentración más alta (20 μ M) sobre la 4T1 y el 3-fenil-4,5-dihidro-5-ácido isoxazoleacético, indicado en la *Figura 4*, recientemente desarrollado como tratamiento

contra aquellas patologías generadas por inhibición de la TNF alpha, una proteína del grupo de las citocinas liberadas por las células del sistema inmunitario que interviene en la apoptosis (Kaur et al., 2014).

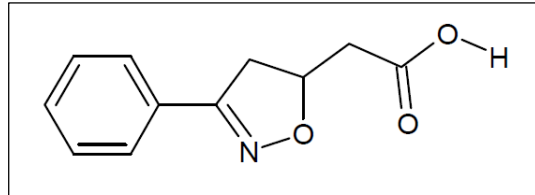


Figura 4. Estructura de un derivado de Isoxazolina, 3-fenil-4,5-dihidro-5-ácido isoxazoleacético

Fuente: (Sarveswari & Vijayakumar, 2016)

Es decir, actualmente existe un sin número de fármacos con actividad proapoptótica, capaces de desencadenar señales que modulen los parámetros propios de la función mitocondrial y, por ende, activen una respuesta de muerte programada. Sin embargo, en la industria farmacéutica también existen fármacos que actúan como inhibidores o agentes desacopladores capaces de impedir la síntesis de ATP a través del bloqueo de ciertos sitios sobre la cadena respiratoria mitocondrial, elemento clave para dar inicio a la muerte celular.

2.1.9 La cadena respiratoria aporta la energía capturada en el metabolismo. El ADP es una molécula capaz de capturar energía libre proveniente de procesos catabólicos en forma de fosfato de alta energía; el ATP resultante de dicha captura es empleado para impulsar los procesos energéticos requeridos por la célula. Diversos estudios de mitocondrias aisladas intactas y que funcionalmente respiran, indican que la oxidación de sustratos vía una deshidrogenasa unida al NAD^+ y la cadena respiratoria, forman 2.5 moles de ATP por medio mol de oxígeno consumido; es decir, un índice P:O=2.5. Mientras que, en la oxidación del sustrato vía una deshidrogenasa vinculada a una flavoproteína sólo se forman 1.5 moles de

ATP, siendo el índice P:O=1.5. Sin embargo, actualmente existen compuestos denominados agentes desacopladores, capaces de inhibir ciertos sitios de los complejos de la cadena respiratoria, principalmente I, III y IV, disminuyendo significativamente la producción de energía en forma de ATP, tal como se observa en la Figura 5.

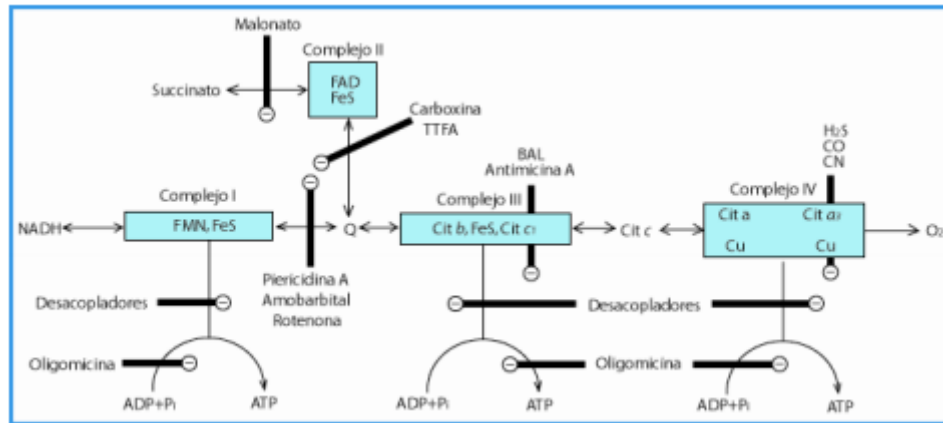


Figura 5. Sitios de inhibición en la cadena respiratoria mitocondrial. Fuente: (Gonzales, 2007)

2.1.9.1 Inhibición de la cadena respiratoria. Actualmente, el empleo de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial ha proporcionado información necesaria acerca del mecanismo de acción de ciertos venenos. Con propósitos descriptivos, los venenos se pueden clasificar en: 1) Inhibidores propios de la cadena respiratoria, 2) inhibidores de la fosforilación oxidativa y 3) desacopladores de la fosforilación oxidativa. (Xu, Pelicano, Zhou, & Carew, 2005)

Básicamente, los inhibidores que interrumpen la respiración por medio del bloqueo de la cadena respiratoria actúan en tres sitios. El primero evita la oxidación de sustratos directamente comunicados con la cadena respiratoria vía una deshidrogenasa unida al NAD,

impidiendo la transferencia de la FeS a la coenzima Q, tal como la rotenona. El segundo consiste en la inhibición sobre el sitio ubicado entre el citocromo b y el citocromo c, como es el caso de la antimicina A. Finalmente, el tercer sitio de inhibición puede detener por completo la respiración, y ocurre sobre la transferencia de equivalentes reducidos de la deshidrogenasa succínica a la coenzima Q. Por otro lado, la oligomicina impide por completo la fosforilación oxidativa y la fosforilación en mitocondrias intactas. Sin embargo, en presencia de dinitrofenol como desacoplador, se produce la oxidación sin fosforilación, indicando que este antibiótico no actúa de modo directo sobre la cadena respiratoria. (Botham & Mayes, 2005)

Asimismo, los desacopladores actúan como agentes protonofóricos, atravesando la membrana mitocondrial interna en forma protonada, y disipando así el gradiente electroquímico formado durante la respiración. Su adición supone el colapso del potencial de membrana, acelerando la cadena respiratoria hasta su máxima capacidad. Es decir, básicamente, los desacopladores colapsan el gradiente de protones al permitir el paso de H^+ hacia la matriz sin transitar por la ATP sintasa, desacoplando así el flujo de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, con la síntesis de ATP, tal como se ilustra en la Figura 6. Esta disminución en la eficiencia metabólica reduce la capacidad de síntesis de ATP. (Navarro, 2005)

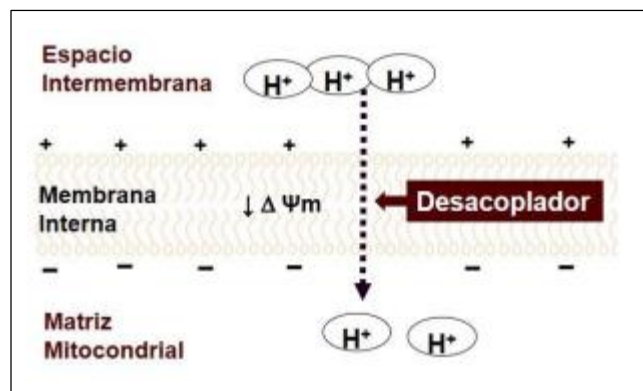


Figura 6. Acción de desacopladores en fosforilación oxidativa. Fuente: (Lemasters et al., 1998)

Es así como ante una disminución en la fuerza protomotriz no asociada con la síntesis de ATP, la actividad de la cadena respiratoria se incrementa para compensar dicha pérdida de gradiente. En consecuencia, el acoplamiento respiración/fosforilación oxidativa no resulta ser 100% eficaz y una parte se dedica exclusivamente a mantener dicho potencial de membrana. (Lu et al., 2015)

Más detalladamente, el desacoplamiento puede ser causado por dos fenómenos: Proton leak o slip. El proton leak es ocasionado como consecuencia de la difusión de protones a través de la membrana mitocondrial interna de manera no asociada a la producción de ATP. Mientras, el slip se debe a la variación de la estequiometría de reacción en los complejos de la cadena respiratoria, generando la fuga de un número de protones por electrón, inferior al esperado, hacia el espacio intermembrana. Ambos procesos disminuyen la fuerza protonmotriz y, por ende, la eficiencia de la fosforilación oxidativa. (Botham & Mayes, 2005)

No obstante, el aumento del flujo de electrones a través de la cadena de transporte estimulado por desacoplamiento, evita la generación de radicales libres asociada con bajo flujo y alto potencial de membrana mitocondrial; es decir, el desacoplamiento es un mecanismo útil para controlar el estrés oxidativo. Mientras que, los inhibidores incrementan la generación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres. (Lu et al., 2015)

Finalmente, mientras que un inhibidor debe interactuar directamente con un componente específico de la fosforilación oxidativa, los agentes desacopladores son compuestos lipofílicos que cíclicamente trasladan protones a través de la membrana interna mitocondrial, sin interactuar con proteínas integrales de membrana. Es por ello que, la actividad de desacoplamiento no está sujeta a limitaciones de estructura tridimensional específica (con una combinación única apropiada), sino que depende de las propiedades fisicoquímicas y características ácidas que favorezcan la difusión transmembrana. Es así como existe un amplio espectro de variabilidad y flexibilidad para el diseño de fármacos con mayor potencial desacoplador con respecto al limitado potencial inhibidor. (Petrescu & Tarba, 1997)

En resumen, considerar la mitocondria como blanco terapéutico y diana farmacológica para combatir el cáncer, le abre las puertas a todos aquellos compuestos mito-activos y en particular, a agentes desacopladores de origen natural para su escrutineo científico como moduladores del metabolismo energético. Por ende, se pretende a continuación, ahondar en el procedimiento empleado para analizar el efecto de estos compuestos sobre el metabolismo bioenergético.

2.2 Metodología

Previa a la descripción detallada de la metodología que fue empleada durante el desarrollo del presente proyecto, se debe hacer énfasis en que los híbridos de Tetrahydroquinolina/Isoxazolina empleados como fármacos con potencial anticancerígeno y con posible diana mitocondrial, fueron sintetizados y caracterizados por el Grupo de Investigación de Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) de la Universidad

Industrial de Santander. Además, los animales necesarios para realizar ensayos sobre la bioenergética mitocondrial correspondieron a ratas Wistar suministradas y manipuladas por el bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, bajo la ley 84 de 1989 (Cap. IV, Art. 23-26) y la resolución 8430 de 1993 (Título IV, artículos 83-93) que regulan la investigación con animales en Colombia. El cálculo considerado para indicar el número de ratas empleadas proviene de realizar tres réplicas para cada una de las concentraciones de los cuatro compuestos evaluados; es decir, tres ensayos independientes realizados por triplicado para cada concentración, cabe considerar que cada rata Wistar, cepa más comúnmente empleada en la mayoría de los reportes sobre aislamientos de mitocondrias de hígado, fue empleada para evaluar una réplica de un solo compuesto.

Finalmente, cabe resaltar que en el presente proyecto fueron empleados cuatro híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina y cada híbrido fue evaluado a cuatro concentraciones distintas (1, 5, 12.5 y 25 μM).

2.2.1 Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata. Las mitocondrias fueron aisladas del hígado de rata Wistar macho (aproximadamente 160 g de peso, en ayuno por doce horas) de acuerdo con el protocolo descrito por Voss y colaboradores (Voss, Cowles, & Bacila, 1963). Para esto, la rata se sacrificó por decapitación y se retiró inmediatamente el hígado que fue inmerso en medio de aislamiento (D-Manitol 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y BSA 0,1% p/v, pH 7,4) a 4°C. El tejido se lavó con medio de aislamiento frío (para eliminar el exceso de sangre), se cortó y homogeneizó en un homogeneizador *van Potter Elvehjem*. La suspensión obtenida se centrifugó a 600xg y 4°C durante cinco minutos con el fin de separar células intactas, membranas y núcleos. El sedimento se descartó y el sobrenadante se

centrifugó a 7000xg y 4°C por diez minutos. El nuevo *pellet* correspondiente a las mitocondrias intactas se resuspendió en medio de aislamiento frío y se centrifugó a 6000xg y 4°C durante diez minutos.

A continuación, las mitocondrias se resuspendieron en medio de aislamiento sin BSA y se lavaron por centrifugación a 7000xg y 4°C durante diez minutos. Finalmente, las mitocondrias aisladas se conservaron a 4°C en medio de aislamiento sin BSA y su concentración proteica se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) para realizar los ensayos de consumo de oxígeno posteriores.

2.2.2 Evaluación de la actividad de los compuestos híbridos de THQ/Isoxazolina sobre la función bioenergética mitocondrial

2.2.2.1 Determinación del consumo de oxígeno. La determinación del consumo de oxígeno (nmol O₂/min.mg de proteína) se realizó polarográficamente mediante un oxígrafo Hansatech con un electrodo tipo Clark acoplado a un equipo de registro usando el software Oxygraph plus.

Las mitocondrias íntegras aisladas de hígado de rata (1 mg/mL) se dispusieron en el oxígrafo en un medio de incubación compuesto por: manitol 125 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES 10 mM y KCl 65 mM, pH 7,4, a 28°C con agitación constante. Este sistema se suplementó con glutamato de sodio 5 mM, KH₂PO₄ (Pi) 1,6 mM y ADP 0,6 mM para medir el consumo de oxígeno vía complejo I de la cadena respiratoria. Por otra parte, las mitocondrias (1 mg/mL) se suplementaron con rotenona 1 μM (inhibidor del complejo I),

succinato de sodio 3 mM, KH_2PO_4 (Pi) 1,6 mM y ADP 0,6 mM para medir la respiración vía complejo II (Voss et al., 1963)

Por su parte, los compuestos de tetrahydroquinolina-isoxazolina (en concentraciones de 1, 5, 12.5 y 25 μM) se incubaron con las mitocondrias durante dos minutos, antes de inducir la respiración mitocondrial por adición de los sustratos del complejo I o el complejo II.

2.2.3 Actividad enzimática mitocondrial. Las mitocondrias aisladas se utilizaron como fuente de enzimas tras ser lisadas por ciclos de congelamiento y descongelamiento a $-195,8^\circ\text{C}$ (3 ciclos). Las proteínas extraídas se cuantificaron por el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

La actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria se determinó por métodos espectrofotométricos usando el equipo *Multiskan Go-Thermo* y el software *SkaniIt RE4.1*, y por métodos polarográficos empleando el oxígrafo *Hansatech* y el software *Oxygraph plus* según correspondiera con la enzima estudiada. Los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazolina a la menor concentración en la cual se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para las anteriores actividades, fueron incubados con la proteína mitocondrial durante dos minutos antes de inducir la reacción para cada una de las enzimas evaluadas.

2.2.3.1 NADH oxidasa. La actividad de la enzima NADH oxidasa se evaluó de acuerdo con el método de Singer (Singer, 1974) en un sistema de reacción compuesto por solución tampón fosfato 80 mM pH 7,4, EDTA 50 μ M, 1 mg de proteína mitocondrial y NADH 0.17 mM con agitación constante a 28°C. La reacción se inició por la adición de NADH, cuya velocidad de oxidación se tradujo en la velocidad de consumo de oxígeno medido polarográficamente.

2.2.3.2 NADH deshidrogenasa. Para determinar la actividad de la enzima NADH deshidrogenasa se usó el método espectrofotométrico propuesto por Singer (Singer, 1974) empleando un sistema de reacción compuesto por solución tampón fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, rotenona 1 μ M, KCN 1 mM y NADH 0,15 mM incubado a 28°C durante diez minutos. A continuación, se agregó ferricianuro de potasio 0,6 mM para dar inicio a la reacción.

La oxidación de NADH por la NADH deshidrogenasa se monitoreó a 420 nm por la reducción del ferricianuro de potasio que actuó como receptor artificial de electrones en presencia de rotenona. La concentración del ferricianuro de potasio reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar 1,04 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 420 nm (Arif et al., 2012) aplicando la Ley de Beer.

2.2.3.3 NADH citocromo c reductasa. La actividad de la enzima NADH citocromo c reductasa se evaluó mediante el protocolo descrito por Somlo, registrando la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm (Somlo, 1965). Para ello se utilizó un sistema de reacción

compuesto por: Solución tampón fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, KCN 1 mM y NADH 50 μ M incubado a 28°C durante diez minutos. La reacción se inició por la adición de citocromo c (oxidado) 40 μ M. La concentración del citocromo c reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar redox (ϵ_{redox}) 19,8 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm aplicando la Ley de Beer.

2.2.3.4 Succinato oxidasa. La actividad de la enzima succinato oxidasa se evaluó de acuerdo con el método de Singer (Singer, 1974) en un sistema de reacción compuesto por solución tampón fosfato 80 mM pH 7,4, EDTA 50 μ M, 0,5 mg de proteína mitocondrial y succinato de sodio 10 mM con agitación constante a 28°C. La reacción se inició por la adición del succinato de sodio cuya velocidad de oxidación se tradujo en la velocidad de consumo de oxígeno medido polarográficamente.

2.2.3.5 Succinato deshidrogenasa. La enzima succinato deshidrogenasa se estudió de acuerdo con el método espectrofotométrico descrito por Singer (Singer, 1974), usando un sistema de reacción compuesto por PBS 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, rotenona 1 μ M, KCN 1 mM y succinato de sodio 20 mM que se incubó por diez minutos a 28°C. A continuación, se agregaron los receptores artificiales de electrones fenazina metosulfato (PMS) 1 mM y 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) 60 μ M para dar inicio a la reacción. La velocidad de reducción del DCPIP se monitoreó a 600 nm como evidencia de la actividad de la succinato deshidrogenasa. La concentración del DCPIP reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar 21,0 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 600 nm aplicando la Ley de Beer.

2.2.3.6 Succinato citocromo c reductasa. La actividad de la enzima succinato citocromo c reductasa se evaluó mediante el protocolo descrito por Somlo, registrando la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm tras bloquear la cadena respiratoria con KCN y rotenona (Somlo, 1965). Para ello se utilizó un sistema de reacción compuesto por: Solución tampón fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, rotenona 1 μM , KCN 1 mM y succinato de sodio 5 mM incubado a 28°C durante diez minutos.

La reacción se inició por la adición de citocromo c 40 μM . La concentración del citocromo c reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar (ϵ redox) 19,8 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm (Appleby & Morton, 1959) aplicando la Ley de Beer.

2.2.3.7 Citocromo c oxidasa. La actividad de la enzima citocromo c oxidasa se determinó según el método propuesto por Mason y colaboradores, acompañando la velocidad de oxidación del citocromo c a 550 nm en un sistema de reacción compuesto por: Solución tampón fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM y 0,1 mg de proteína mitocondrial incubado a 28°C durante diez minutos.

La reacción se inició al agregar citocromo c reducido 30 μM (Mason, Poyton, Wharton, & Schatz, 1973). La concentración del citocromo c oxidado se determinó mediante su coeficiente de extinción molar (ϵ redox) 19,8 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Appleby & Morton, 1959) aplicando la Ley de Beer.

2.2.3.8 ATPasa en mitocondrias fragmentadas. La actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas se determinó mediante la cuantificación del fosfato resultante de la hidrólisis del ATP de acuerdo con el método de Pullman y colaboradores (Pullman, Penesky, Datta, & Racker, 1960). El sistema de reacción compuesto por: solución tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgSO₄ 3 mM, 1 mg de proteína mitocondrial, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 mM y 10 unidades (U) de piruvato quinasa (1 U de piruvato quinasa convierte 1 μmol de PEP a piruvato por minuto), se incubó a 28°C durante diez minutos. La reacción se inició por la adición de ATP 4 mM y se interrumpió diez minutos después de agregar ácido tricloroacético (TCA) al 5% (v/v).

A continuación, el sistema de reacción se centrifugó a 10000xg por un minuto y se tomó el sobrenadante para cuantificar el fosfato liberado en el medio. La concentración de fosfato en las muestras se determinó colorimétricamente por la formación de un complejo de fosfomolibdato reducido con ácido ascórbico, que produjo una coloración azul cuya absorbancia se midió a 820 nm (P. Chen, Toribara, & Warner, 1971). Para esto, se realizó previamente una curva de calibración con patrones conocidos de KH₂PO₄ en un rango de concentraciones de 1,0-300 μM.

2.2.3.9 ATPasa en mitocondrias íntegras. La actividad de la ATPasa en mitocondrias íntegras fue determinada cuantificando el fosfato inorgánico resultante de la hidrólisis de ATP, según el método descrito por Pullman et al (Pullman et al., 1960). Sistema de reacción: Tampón Tris-HCl 50 mmolL⁻¹ (pH 7.4), MgSO₄ 3mmolL⁻¹, fosfoenolpiruvato (PEP) 2.5 μmolL⁻¹ y proteína mitocondrial 1mg, estos ensayos se realizaron a la par con una muestra

que contenía FCCP (1 μ g/mL), el cual ya es conocida su actividad desacopladora, para conocer si los compuestos tenían un efecto desacoplador mayor o menor que éste.

Después de la adición del medio de reacción y de la piruvato quinasa, la reacción fue incubada por 10 minutos a 28°C, pasado este tiempo se inició la reacción con la adición de ATP 4mmolL⁻¹ e interrumpida pasados 10 minutos por la adición de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. El material fue centrifugado a 10.000g durante 1 minuto. El fosfato inorgánico fue cuantificado del sobrenadante siguiendo el método de Summer (1944) (li & Illinois, 1940).

2.2.3.10 Análisis estadístico. Los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron representados por la media \pm desviación estándar (DE). Los datos fueron analizados estadísticamente usando el software GraphPad Prism mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey para la comparación de los promedios. Los resultados con un valor $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos respecto al control.

2.3 Resultados y Discusión

A continuación, se describen los resultados obtenidos al evaluar los distintos compuestos de híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina a 1, 5, 12.5 y 25 μ M sobre el metabolismo energético mitocondrial. Todos los resultados fueron expresados como porcentaje con relación al control.

El efecto de los distintos sustituyentes de híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina se evaluaron en mitocondrias íntegras bajo los siguientes parámetros de la respiración mitocondrial: Consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3), velocidad del consumo de oxígeno después del agotamiento del ADP (estado 4), relación ADP/O y coeficiente de control respiratorio (CCR). Cada uno de estos parámetros fueron evaluados con dos sustratos independientes, glutamato 5,0 mM y succinato 3 mM, ambos sustratos son adecuados para la medición del consumo de oxígeno vía complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial, respectivamente.

2.3.1 Efecto del compuesto A1 sobre los parámetros de la respiración mitocondrial.

El primer compuesto evaluado consiste en un híbrido molecular de THQ/isoxazolina; es decir, contiene un núcleo de tetrahydroquinolina, compuesto heteroaromático que contiene un nitrógeno de forma quimio- y estereoselectiva obtenido de la reacción de Povarov a partir de la reacción de una aldimina (anilina y aldehídos aromáticos) con alquenos ricos en electrones en presencia de un ácido de Lewis; y un núcleo de isoxazolina, proveniente de la cicloadición entre un óxido de nitrilo y un alqueno. Además, posee un hidrógeno como sustituyente en el sexto carbono del anillo tetrahydroquinolínico.

Cabe aclarar que este compuesto fue denominado como A1 para facilitar la redacción durante su análisis. A continuación se presenta en la *Figura 7*, la estructura química del compuesto.

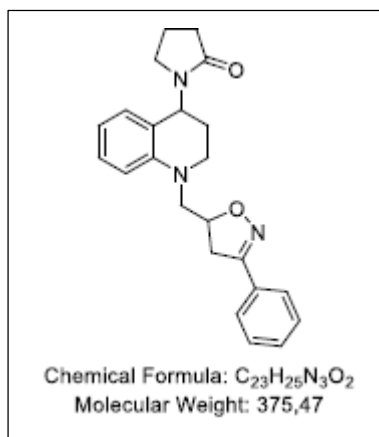


Figura 7. Híbrido molecular de THQ/Isoxazolina con un hidrógeno como sustituyente.

En la *Figura 9 (A)* se observa el consumo de oxígeno con glutamato en mitocondrias íntegras del compuesto A1 para el estado 3 en presencia de ADP. Los resultados revelan que a medida que se adiciona el fármaco a mayores concentraciones, se genera una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno, siendo estadísticamente significativo a partir de la concentración de 1 μM , con un porcentaje respecto al control desde 62 a 47%. Asimismo, en la *Figura 9 (B)* se observan los resultados para el consumo de oxígeno una vez consumido el ADP (estado 4), donde se produce una mínima disminución dosis dependiente y estadísticamente significativa a partir de la concentración más pequeña con un porcentaje respecto al control desde 59 a 77%.

En las *Figuras 10 (A)* y *10 (B)*, se presentan las mediciones de consumo de oxígeno empleando succinato como sustrato oxidable, en donde se observa un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno dosis dependiente sólo a partir de la concentración 12.5 μM en presencia de ADP y a 1 μM en su ausencia, con porcentajes desde 100 a 120% y desde 130 a 143%, respectivamente.

De la misma manera, en la literatura existen compuestos que exhiben una actividad similar frente a la velocidad de consumo de oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial empleando glutamato y succinato como sustratos oxidables, tal como la salinomicina, la cual según estudios preliminares, reporta una inhibición de la respiración proporcional al aumento

en potencial redox inducido por el sustrato, donde en un medio con bajo K^+ , la salinomicina inhibe parcialmente el consumo de oxígeno en ausencia de ADP (estado 4) y significativamente sobre el estado 3; sin embargo, vía complejo II empleando succinato, su actividad es contraria, aumentando la velocidad de consumo respecto al control en presencia de ADP; lo cual resulta ser un efecto directo de inhibición sobre la actividad enzimática de una enzima involucrada en el complejo I (Mitani, Yamanishi, Miyazaki, & Otake, 1976)

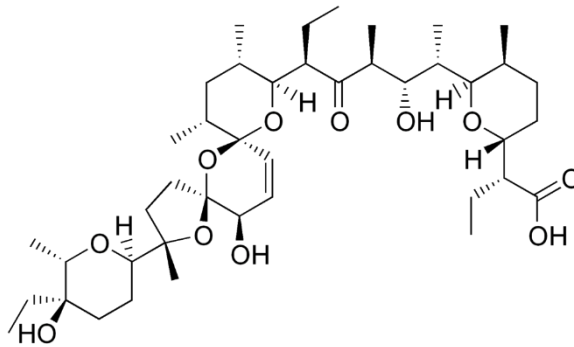


Figura 8. Estructura molecular de la salinomicina

Según un estudio del Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT) se demostró que la salinomicina es un políeter monovalente, tal como se observa en la *Figura 8*, capaz de matar células madre de cáncer de mama en ratones (Naujokat & Steinhart, 2012); su mecanismo de acción radica en la formación de complejos con Na^+ , K^+ y Ca^+ , los cuales son transportados al interior de la célula, afectando la capa intra y extracelular. Estos iones son capaces de alterar el equilibrio hidroelectrónico celular, consumiendo las reservas energéticas de la célula y desorganizando la estructura intracelular (Huczynski, 2012). Así, básicamente el complejo de la salinomicina-cación permea la membrana para los iones de sodio y potasio, inhibiendo las funciones mitocondriales, entre ellas, las oxidaciones del sustrato y la hidrólisis del ATP. En consecuencia, la salinomicina podría inducir la apoptosis de las células cancerosas humanas, eliminando eficazmente células troncales del cáncer (CSCs), también denominadas

células iniciadoras y/o propagadoras de tumores, e inducir la regresión clínica parcial de los cánceres fuertemente pretratados y resistentes a la terapia (Huczyński, 2012).

Finalmente, en las Figuras 9 (C) y 10 (C), se presentan los resultados de la síntesis de ATP con relación al consumo de oxígeno en el estado 3, los cuales indican la eficiencia de la fosforilación oxidativa respecto a la respiración, no únicamente dependiente del grado de acoplamiento, sino de la disponibilidad de sustratos y la naturaleza de estos. Así, se observa un decaimiento ocasionado por el consumo de oxígeno en presencia de ADP, con una relación próxima a 3.2 con glutamato y 1.9 con succinato. Hecho similar ocurre con la melatonina, hormona que según estudios preliminares, incrementa la relación ADP/O de manera dosis dependiente de 1nM a 1mM (López et al., 2009). Sin embargo, en la literatura, el succinato genera FADH₂, quien dona sus electrones al complejo II y los cede al complejo III directamente, perdiendo la contribución del complejo I al gradiente de protones y obteniendo una relación ADP/O cercana a 1.5 (Navarro, 2005).

En la *Figura 9 (D)* y *10(D)* el coeficiente de control respiratorio (CCR) decae a medida que aumenta la concentración del fármaco, siendo mayor la caída en presencia de succinato (~32%) que con glutamato (~12%); es decir, el grado de dependencia de la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP está siendo reducida (Navarro, 2005).

Así, la adición del compuesto A1 sugiere una inhibición a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial, específicamente sobre el complejo I, pues se presenta un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 4 y por ende disminución en el CCR empleando sólo glutamato como sustrato oxidable, y una posible actividad desacoplante

observada por el aumento de la velocidad en estado 4 en presencia de succinato, con respecto al control.

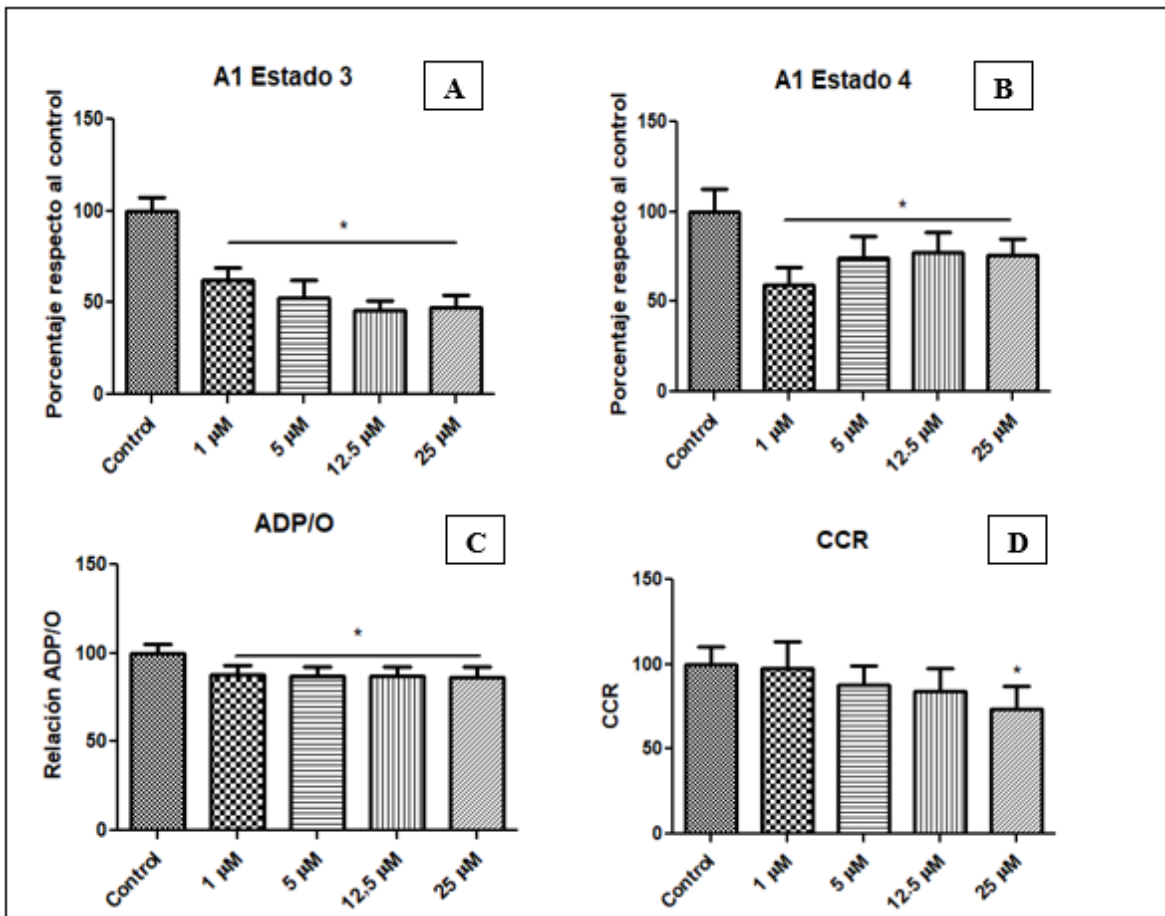


Figura 9. Consumo de oxígeno vía complejo I empleando glutamato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 81.8 ± 5.7 nmoles O/s mg proteína, 17.1 ± 13.5 nmoles O/s mg proteína, 3.2 ± 0.2 y 3.3 ± 0.3 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

* $p < 0.05$

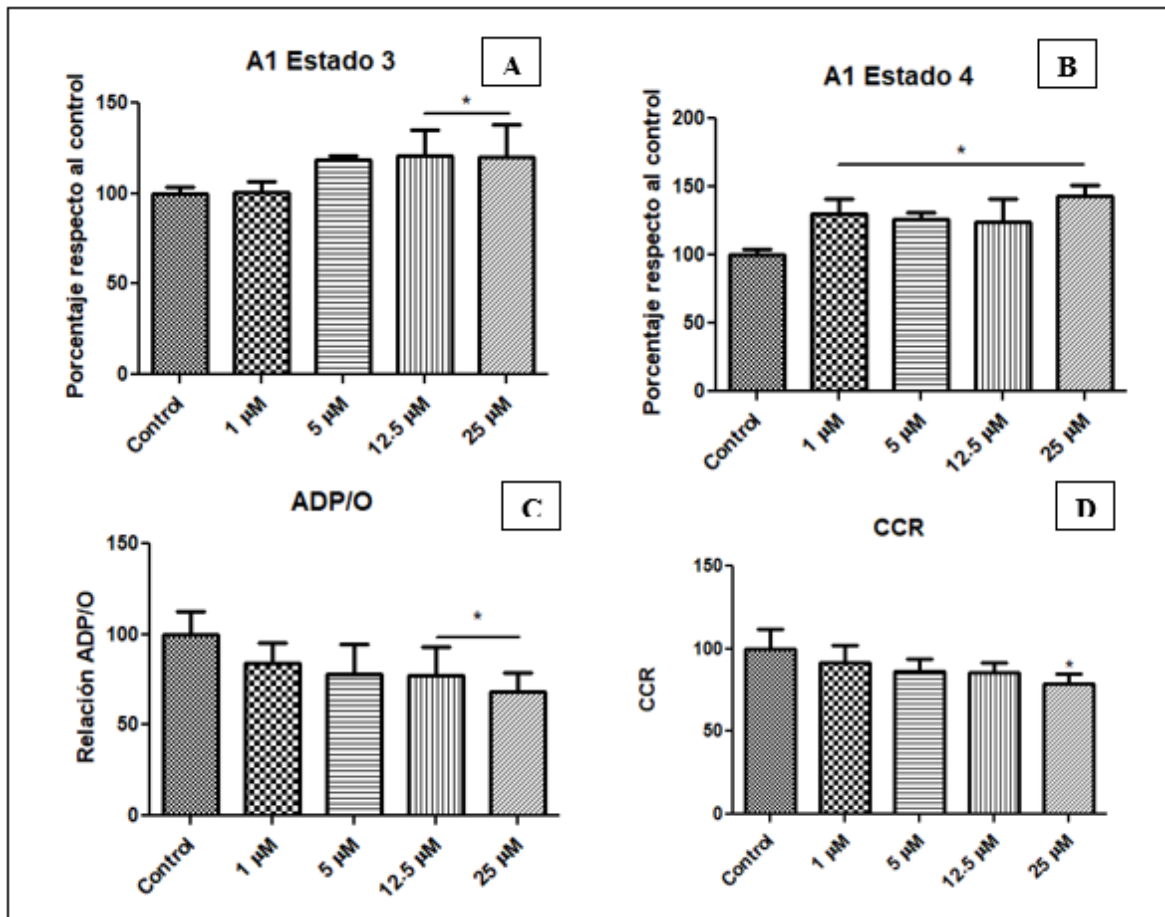


Figura 10. Consumo de oxígeno vía complejo II empleando succinato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 168.7 ± 5.5 nmoles O/s mg proteína, 42.7 ± 2.6 nmoles O/s mg proteína, 1.9 ± 0.2 y 3.9 ± 0.4 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$

2.3.2 Efecto del compuesto A2 sobre los parámetros de la respiración mitocondrial.

El segundo compuesto evaluado consiste igualmente en un híbrido molecular de THQ/isoxazolina. Básicamente, la única diferencia estructural con respecto al anterior compuesto consiste en un anillo heteroaromático que posee un sustituyente en el sexto carbono, representado por un metil. Este compuesto fue denominado como A2 para facilitar la redacción durante su análisis. A continuación se presenta en la *Figura 11*, la estructura química del compuesto.

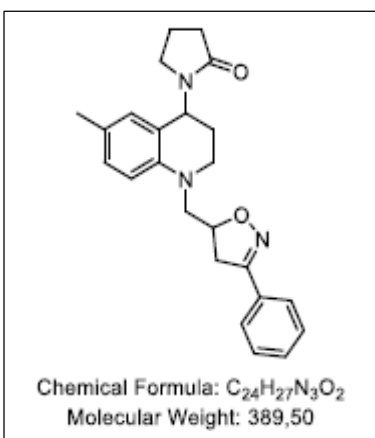


Figura 11. Híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina con un metil como sustituyente.

En la *Figura 13(A)* se observa el consumo de oxígeno con glutamato en mitocondrias íntegras del compuesto A2 en presencia de ADP. Los resultados revelan que a medida que se adiciona el fármaco a mayor concentración, se genera una disminución en la tasa de consumo de oxígeno con respecto al control (~62%) a partir de la menor concentración, generada por una inhibición del complejo I. Mientras que una vez agotado el ADP (*Figura 13(B)*), se observa un incremento dosis dependiente y estadísticamente significativo desde la concentración 5 μ M, con un porcentaje de 144 a 154%, respecto el control.

En las *Figuras 14(A)* y *14(B)*, se presentan las mediciones de consumo de oxígeno empleando succinato como sustrato oxidable; evidenciando una actividad significativamente similar dada por una disminución y un incremento dosis dependiente en presencia y ausencia de ADP, respectivamente, siendo estadísticamente significativo a partir de 12.5 μM con un porcentaje de 152 a 184% para el estado 4.

En la literatura se reportan más compuestos que exhiben una actividad similar, inhibiendo el consumo de oxígeno en el estado 3 con glutamato, tal como el efecto del linalool a 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre la función mitocondrial empleando mitocondrias aisladas de hígado de rata, donde el estado 3 de la cadena respiratoria fue inhibida en aproximadamente 67, 74, 63 y 89% respecto al control (Bueno & Méndez, 2015).

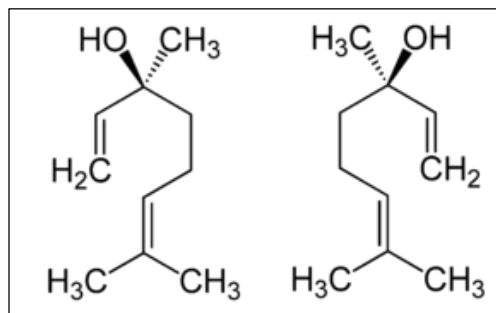


Figura 12. Estructura molecular del linalool.

Así, según un estudio por la Universidad Industrial de Santander, se demostró que el linalool, estructura molecular indicada en la *Figura 12*, inhibe el complejo I, complejo III y la ATPasa, aumentando la generación de especies reactivas de oxígeno (Bueno & Méndez, 2015). Su mecanismo de acción indicó que en las células tumorales la presencia de especies ERO es vital para la generación de mutaciones requeridas para mantener el metabolismo aberrante (Jana et al., 2014); sin embargo, altas concentraciones de ERO generan daño de macromoléculas, permeación de la mitocondria, liberación de citocromo c e inducción de

apoptosis (Montero & Jassem, 2011). Por ende, el conocimiento de los complejos enzimáticos inhibidos y el aumento de las especies reactivas de oxígeno, podrían representar un posible tratamiento para células tumorales (Cairns, Harris, & Mak, 2011).

Este aumento del consumo de oxígeno en ausencia de ADP, genera que el coeficiente de control respiratorio disminuya considerablemente, pues supone el colapso del potencial de membrana y por ende, el descenso en la fuerza protomotriz, acompañado de un aumento en la tasa de respiración para compensar dicha disminución (Lemasters et al., 1998), tal como se observa en la *Figura 13(D)* y *14(D)*, donde el valor de CCR decae en una relación dosis dependiente, siendo más significativa para succinato (~18%) que para glutamato (~3%).

Esta reducción implica una disminución en el acople de la cadena respiratoria y la producción de ATP en la mitocondria, hecho observado en la *Figura 13(C)* y *14(C)*, con una relación del número de moléculas de ATP sintetizadas próxima a 3.1 con glutamato y 1.0 con succinato; es decir, la cantidad de ATP producido por el movimiento de electrones a través de la cadena, el cual depende de la cantidad de átomos de hidrógeno transportados a través de un gradiente electroquímico y del número de protones que regresan hacia el interior a través de la membrana, teóricamente próximo a 3.0 y 1.5 para glutamato y succinato, respectivamente.

Así, la adición del compuesto A2 sugiere tener una mayor posible actividad desacoplante sobre la cadena respiratoria mitocondrial respecto al compuesto A1 debido al mayor grado de desacople o disminución del CCR con respecto al control, presentando un incremento en la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP empleando ambos sustratos oxidables.

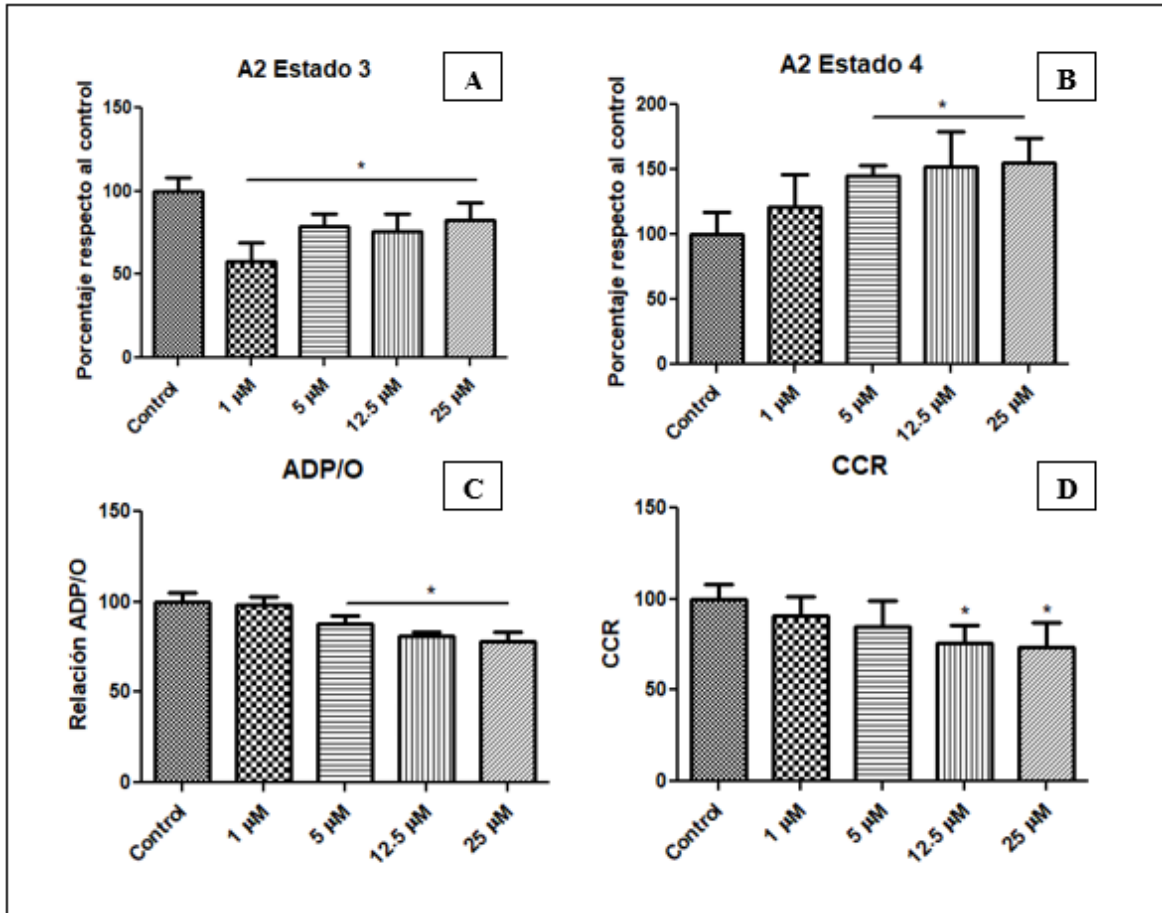


Figura 13. Consumo de oxígeno vía complejo I empleando glutamato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 48.7 ± 6.6 nmoles O/s mg proteína, 11.9 ± 5.7 nmoles O/s mg proteína, 3.1 ± 0.1 y 3.2 ± 1.9 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

* $p < 0,05$

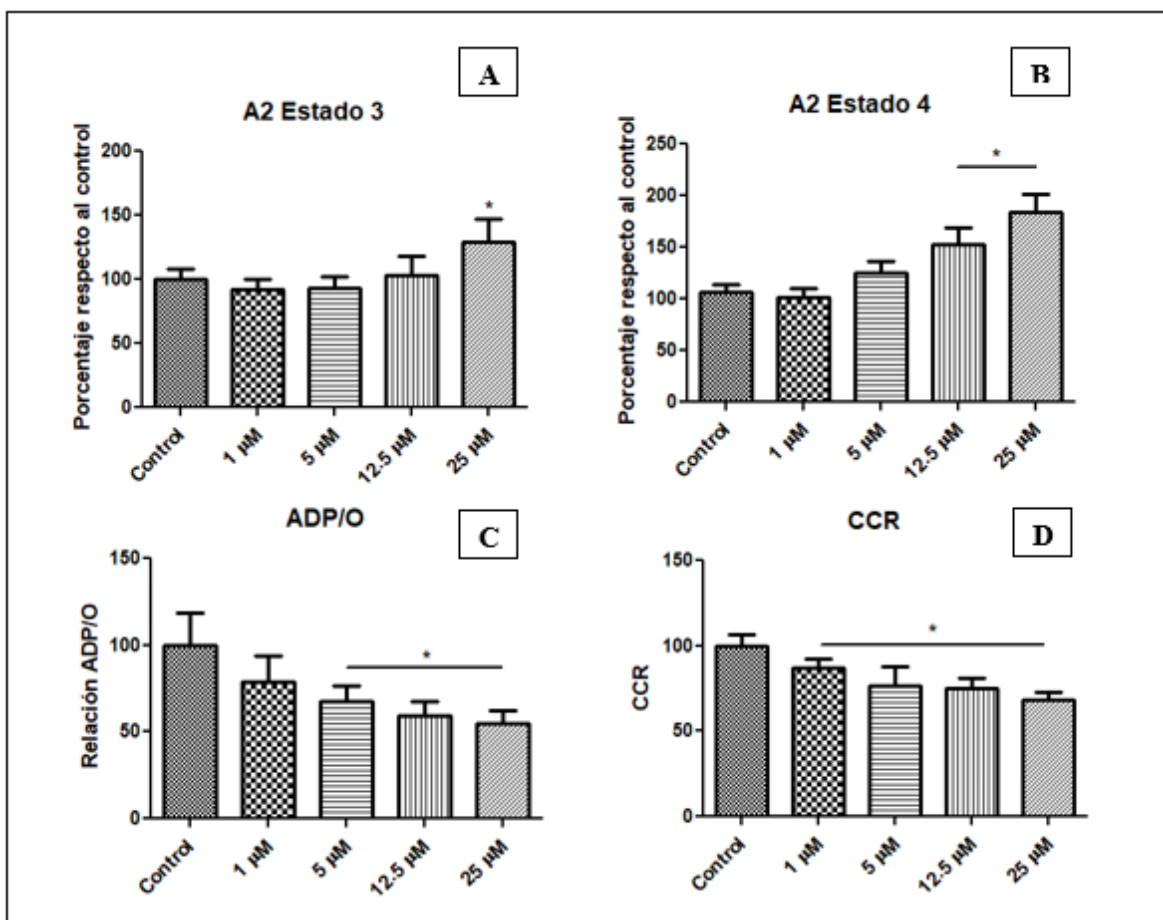


Figura 14. Consumo de oxígeno vía complejo II empleando succinato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 59.6 ± 6.5 nmoles O/s mg proteína, 16.7 ± 2.6 nmoles O/s mg proteína, 1.0 ± 0.2 y 3.5 ± 0.2 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$

2.3.3 Efecto del compuesto A3 sobre los parámetros de la respiración mitocondrial. El tercer compuesto evaluado corresponde a un híbrido molecular de THQ/isoxazolina. Con una esencial diferencia en el sexto carbono del anillo heteroaromático, donde el sustituyente resulta ser más electronegativo con respecto a los anteriores compuestos. Cabe resaltar que

este compuesto fue denominado como A3 para facilitar la redacción durante su análisis. A continuación se presenta en la *Figura 15*, la estructura química del compuesto.

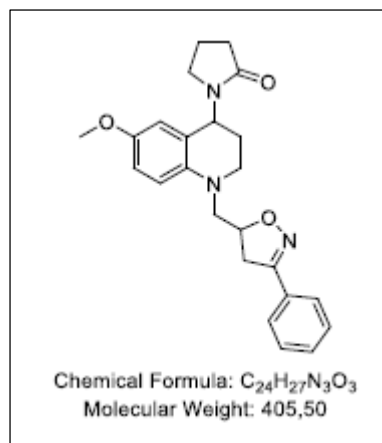


Figura 15. Híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina con un metoxi como sustituyente.

Para el caso del compuesto con un sustituyente de metoxi en el carbono sexto del núcleo de la THQ, los valores de consumo de oxígeno en presencia de ADP con respecto al control, reportados en la *Figura 16(A)* y *17(A)*, son casi similares, donde sólo se observa una inhibición estadísticamente significativa (82% con respecto al control), para la más alta concentración del fármaco (25 μM), empleando succinato como sustrato oxidable.

Mientras que, en la *Figura 16(B)* y *17(B)*, se observa un aumento dosis dependiente del consumo de oxígeno en estado 4, desde la concentración más pequeña (1 μM) para ambos sustratos, con mayor incremento para el glutamato que para el succinato, de 132 a 215% y de 135 a 153%, respectivamente.

Asimismo, estudios preliminares han comprobado la existencia de compuestos empleados en tratamientos antipiréticos y antiinflamatorios que exhiben una actividad similar, donde

mediciones de las tasas de respiración y el potencial de membrana en las mitocondrias hepáticas aisladas sometidas a diversas concentraciones de diclofenaco y aspirina confirman que la adición del diclofenaco de 0,01 a 0,2 mM estimula la respiración del estado 4 e inhibe levemente el estado 3, disminuyendo la relación de control respiratorio, mientras el potencial de membrana disminuye o se colapsa según la concentración de fármaco (Petrescu & Tarba, 1997).

Además, la proporción de ATP sintetizado por átomo de oxígeno reducido a H₂O para glutamato oscila en la literatura alrededor de 2.5 moléculas de ATP sintetizadas; sin embargo, el obtenido experimentalmente corresponde a 3.3 moléculas y decae a medida que aumenta la concentración del fármaco (Figura 16C y 17C), hecho que corrobora el aumento de consumo de oxígeno en el estado 4.

Finalmente, en la *Figura 16(D)* y *17(D)*, se observa que el valor de CCR decae a medida que aumenta la concentración del compuesto, siendo mayor la caída en presencia de succinato (~13%) que con glutamato (~8%), para ambos sustratos a partir de la concentración de 1 μ M por mg de proteína mitocondrial, por lo cual es posible inferir que el compuesto A3 modula los parámetros propios de la respiración mitocondrial, generando un desacople entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP.

Así, se observa que el efecto del compuesto A3 sobre la bioenergética mitocondrial implica una disminución en el acople de la cadena respiratoria y la producción de ATP, presentando una caída dosis dependiente para las mediciones del CCR y la relación ADP/O y un incremento estadísticamente significativo en la velocidad de consumo de oxígeno una vez consumido el ADP.

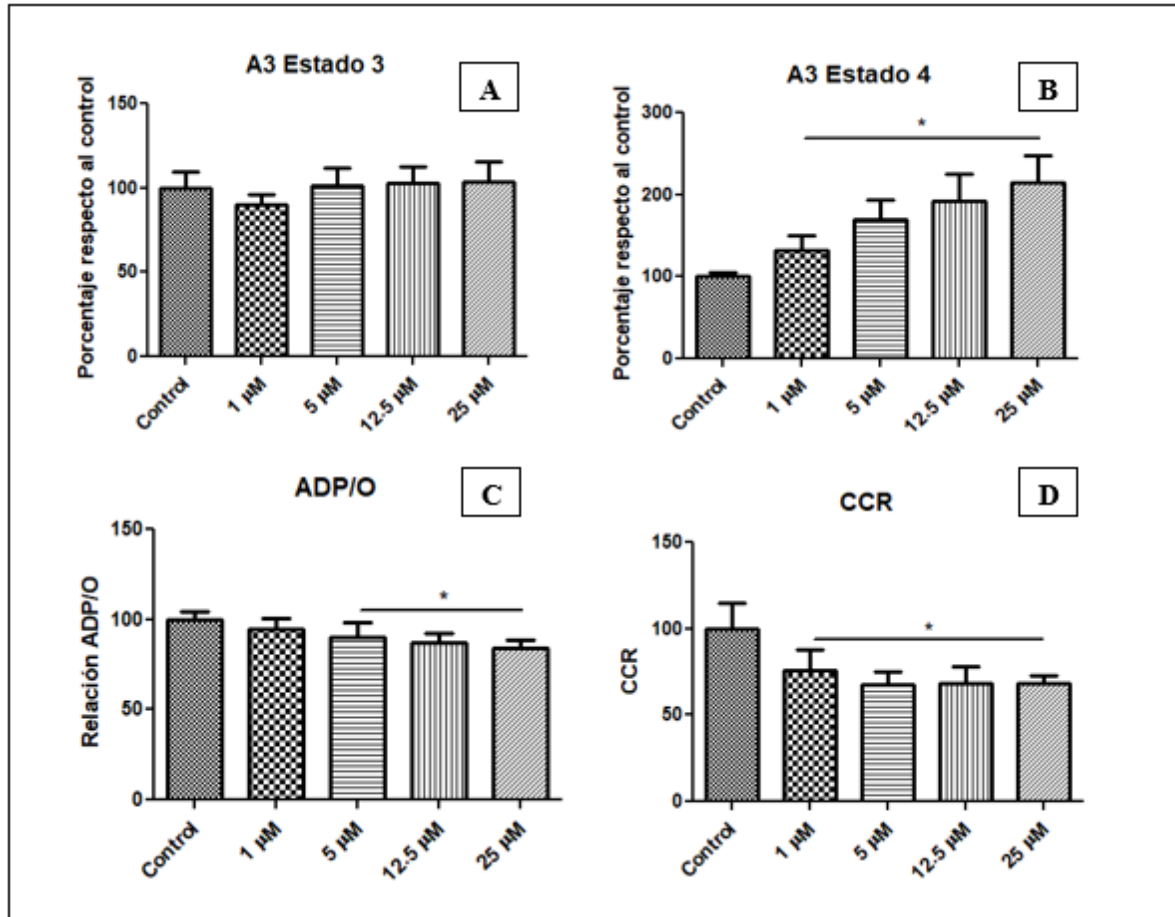


Figura 16. Consumo de oxígeno vía complejo I empleando glutamato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 65.0 ± 6.2 nmoles O/s mg proteína, 15.9 ± 5.5 nmoles O/s mg proteína, 3.3 ± 0.2 y 3.5 ± 0.5 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

* $p < 0,05$

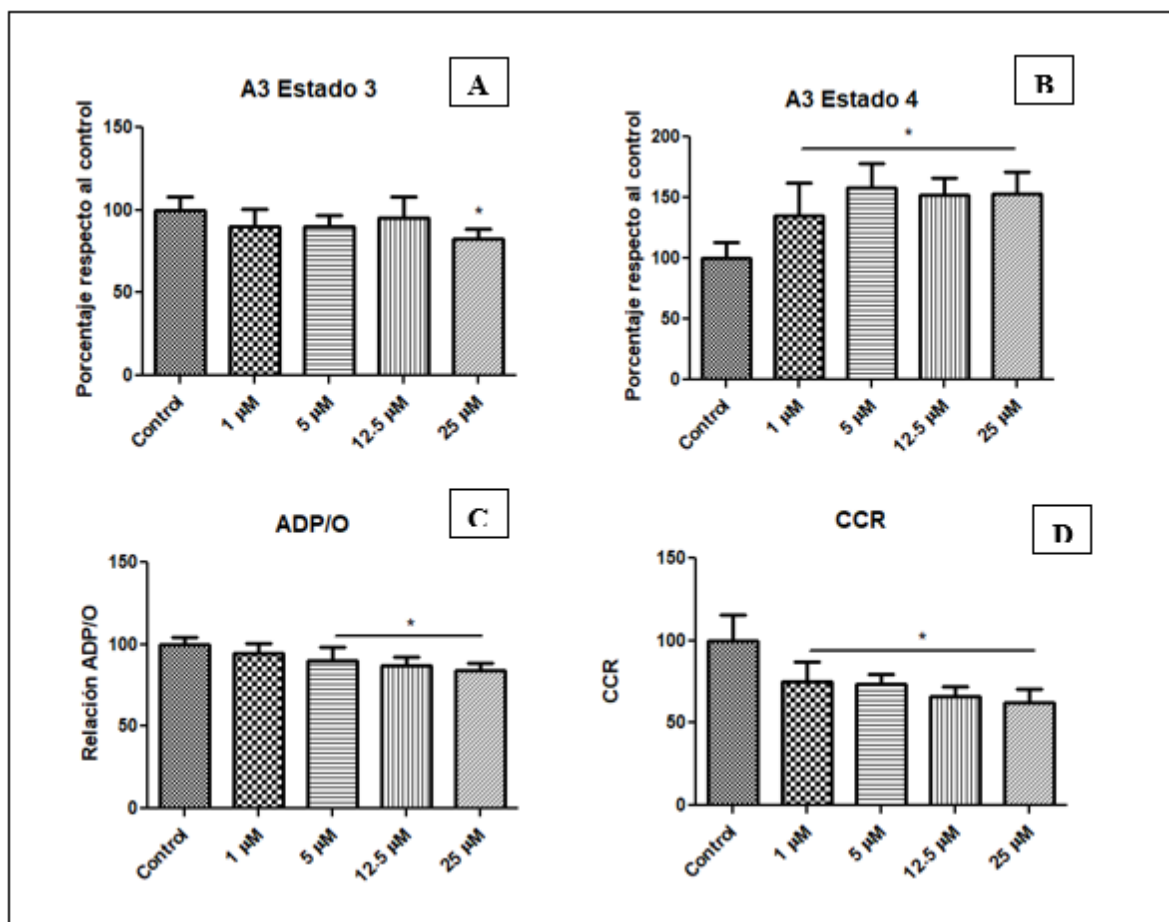


Figura 17. Consumo de oxígeno vía complejo II empleando succinato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 441.48 ± 78.63 nmoles O/s mg proteína, 78.58 ± 15.61 nmoles O/s mg proteína, 1.1 ± 0.4 y 6.1 ± 0.9 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$

2.3.4 Efecto del compuesto A4 sobre los parámetros de la respiración mitocondrial.

El cuarto compuesto evaluado consiste en un híbrido molecular de THQ/isoxazolina con un sustituyente altamente electronegativo en el sexto carbono del anillo heteroaromático. Cabe resaltar que este compuesto fue denominado como A4 para facilitar la redacción durante su análisis. A continuación se presenta en la *Figura 18*, la estructura química del compuesto.

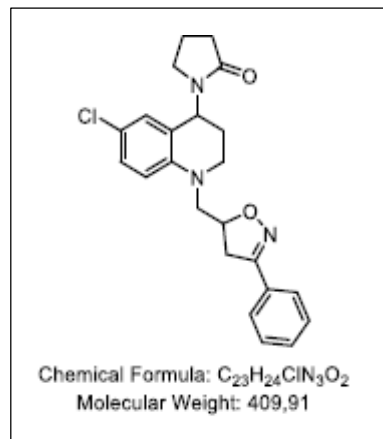


Figura 18. Híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina con un cloro como sustituyente.

En la *Figura 19(A)* se presenta el consumo de oxígeno con glutamato en mitocondrias íntegras del compuesto A4 en presencia de ADP. Los resultados revelan que a medida que se adiciona el fármaco a mayores concentraciones, se produce una caída en la velocidad de consumo de oxígeno relativamente mínima. Sin embargo, en la *Figura 19(B)* se registran las mismas mediciones una vez agotado el ADP (estado 4), la cual indica un incremento dosis dependiente abrupto y estadísticamente significativo a partir de la concentración 5 μM con un porcentaje respecto al control de 106% a 208%.

Mientras, en las *Figuras 20(A)* y *20(B)*, se presentan las mediciones previas empleando succinato como sustrato oxidable; asimismo, el resultado implica un incremento en la velocidad de consumo de oxígeno dosis dependiente a partir de la concentración 5 μM una vez agotado el ADP, con porcentajes desde 127% a 171%.

Finalmente, en las *Figuras 19(C)* y *20(C)*, se presentan los resultados de la síntesis de ATP con relación al consumo de oxígeno en el estado 3, indicando la eficiencia de la fosforilación oxidativa respecto a la respiración. Así, se observa un decaimiento ocasionado por el

consumo de oxígeno, con una relación ADP/O próxima a 3.0 con glutamato y 1.2 con succinato. En la literatura, el succinato genera FADH₂ quien dona sus electrones al complejo II y los cede al complejo III directamente, perdiendo la contribución del complejo I y obteniendo una relación ADP/O de 1.5 (Navarro, 2005); esta diferencia con nuestros resultados, quizás es a causa del potencial desacoplador del compuesto, permeabilizando en mayor medida la membrana mitocondrial y, por ende, aumentando la velocidad de consumo de oxígeno para reestablecer el potencial de membrana.

Mientras, en la Figura 19(D) y 20(D) el coeficiente de control respiratorio (CCR) decae a medida que incrementa la concentración del fármaco, siendo mayor el decaimiento en presencia de succinato (~72%) que con glutamato (~65%); es decir, el grado de acoplamiento está siendo reducido (Navarro, 2005).

Así, la adición del compuesto A4 sugiere una inhibición poco significativa en presencia de ADP para ambos sustratos y posible actividad desacoplante a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial, pues se presenta una decaída estadísticamente marcada a partir de la concentración 12.5 μ M empleando succinato como sustrato oxidable.

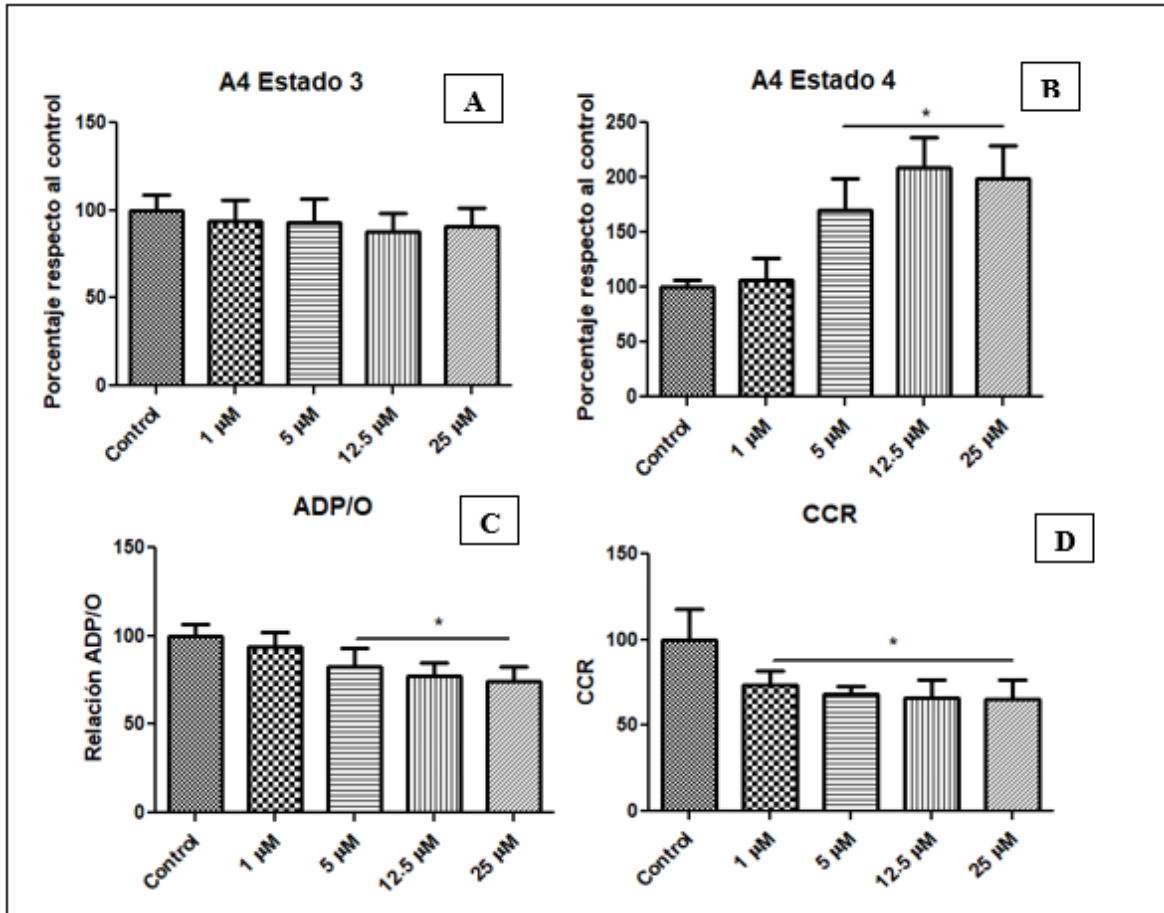


Figura 19. Consumo de oxígeno vía complejo I empleando glutamato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 71.6 ± 20.9 nmoles O/min mg proteína, 20.8 ± 3.2 nmoles O/min mg proteína O/min mg proteína, 3.0 ± 0.3 y 3.4 ± 0.6 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$

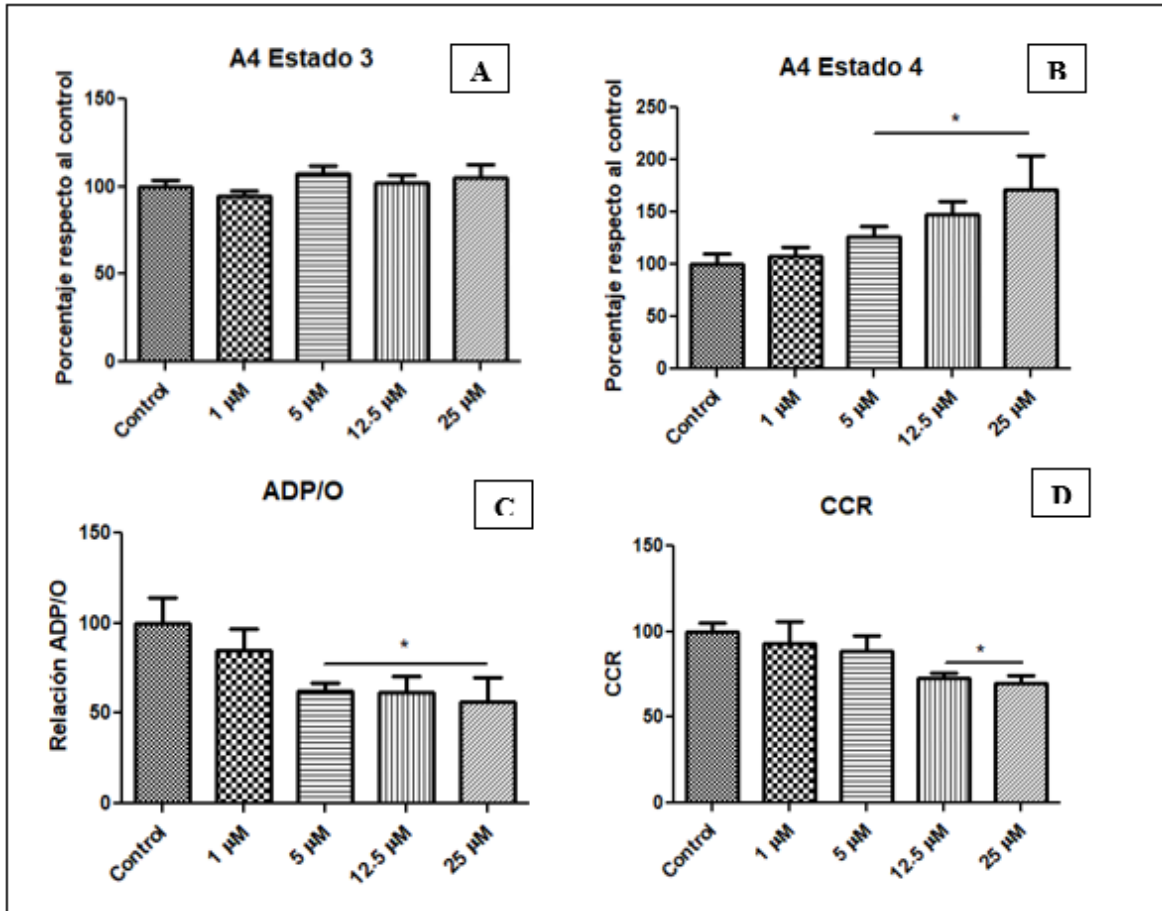


Figura 20. Consumo de oxígeno vía complejo II empleando succinato como sustrato oxidable en: a) presencia de ADP (Estado 3) b) una vez agotado el ADP (Estado 4) c) relación ADP/O d) coeficiente de control respiratorio. El valor del 100% corresponde a: 56.7 ± 2.9 nmoles O/min mg proteína, 16.4 ± 1.8 nmoles O/min mg proteína O/min mg proteína, 1.2 ± 0.2 y 3.3 ± 0.2 , respectivamente. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$

El análisis general de los resultados obtenidos para mitocondria íntegra, sugiere que los compuestos híbridos de THQ/Isoxazolina empleados, provocan un desacople de la fosforilación oxidativa dosis dependiente de la concentración suministrada, esto debido al incremento en la velocidad de consumo de oxígeno evidenciado en el estado 4, generando una disminución considerable en el coeficiente de control respiratorio a partir de la menor concentración para cada uno de los sustratos oxidables empleados vía complejo I y II.

Así, los compuestos A1 y A2 evidenciaron una inhibición dosis dependiente del estado 3, a partir de la menor concentración, vía complejo I; mientras que, los compuestos A3 y A4 no evidenciaron una diferencia estadísticamente significativa respecto al control. Es decir, los compuestos más electronegativos no presentaron una inhibición sobre el complejo I.

Además, hubo un incremento en la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 4 a partir de la concentración 5 μM para todos los compuesto, a excepción del compuesto A1, el cual disminuyó a medida que se aumentaba la concentración del fármaco.

Sin embargo, empleando succinato como sustrato oxidable, los compuestos A1 y A2 exhibieron un incremento en la velocidad de consumo de oxígeno sobre el estado 3 con respecto al control vía complejo II, a partir de la concentración 12.5 μM y 25 μM , respectivamente; mientras que, el compuesto A3, presentó una inhibición en presencia de ADP a partir de la mayor concentración del fármaco, y en el compuesto A4 no se observó una diferencia estadísticamente significativa.

Finalmente, es posible inferir que a medida que se incrementa la electronegatividad del átomo en el sexto carbono del anillo tetrahidroquinolínico, aumenta el desacople, pero disminuye la inhibición en el transporte de electrones vía complejo 1. Es así como, la actividad desacoplante se observa en mayor medida sobre el compuesto A4, sugiriendo que a medida que aumenta la electronegatividad del sustituyente del sexto carbono del núcleo de la THQ, mayor es su actividad de desacople.

2.3.5 Efecto de los distintos híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. Una vez se evidenció que sí existen alteraciones de los parámetros propios de la respiración mitocondrial debido a la acción de los distintos híbridos moleculares con posible actividad desacoplante, se procedió a evaluar su efecto sobre las enzimas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Para esto se empleó la menor concentración de los compuestos con la cual se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en el CCR (1 μ M).

Así, fue posible evaluar el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria de manera independiente del proceso de fosforilación y la formación del potencial de membrana, facilitando la identificación de los sitios donde existe una inhibición de la cadena respiratoria.

Los resultados obtenidos debido a la adición de los compuestos híbridos de THQ/Isoxazolina a la mitocondria fragmentada indican que no existe ningún efecto inhibitorio, ni estimulantes para las enzimas mitocondriales: NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromo c reductasa. Para la NADH oxidasa y NADH citocromo c

reductasa se observan inhibiciones por parte del compuesto A1 (66% y 80%) y A2 (77% y 84%) a 1 μ M respecto al control. Mientras que, para los compuestos A3 y A4 reflejan una inhibición sobre la actividad de la enzima succinato oxidasa bajo la misma concentración.

Los resultados obtenidos del efecto sobre los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial indican que la disminución en las velocidades de consumo de oxígeno en el estado 3 (a partir de su menor concentración) de los compuestos con un hidrógeno y un metil como sustituyentes, podrían estar relacionados con la inhibición de la actividad de la enzima NADH oxidasa, la cual cataliza la transferencia de electrones desde el NADH al oxígeno (Pullman et al., 1960).

Asimismo, la inhibición se observa más específicamente en la actividad de la enzima NADH citocromo c reductasa, la cual oxida la forma reducida de la coenzima Q; por ende, una inhibición de esta enzima, bloquearía el transporte de electrones a través de la cadena, disminuyendo la producción de ATP en la mitocondria.

Mientras, los resultados obtenidos del efecto sobre los complejos de la cadena respiratoria sugieren que la caída dosis dependiente del consumo de oxígeno en presencia de ADP de los compuestos con un metoxi y un cloro como sustituyentes, podrían estar correlacionados con la inhibición de la enzima succinato oxidasa.

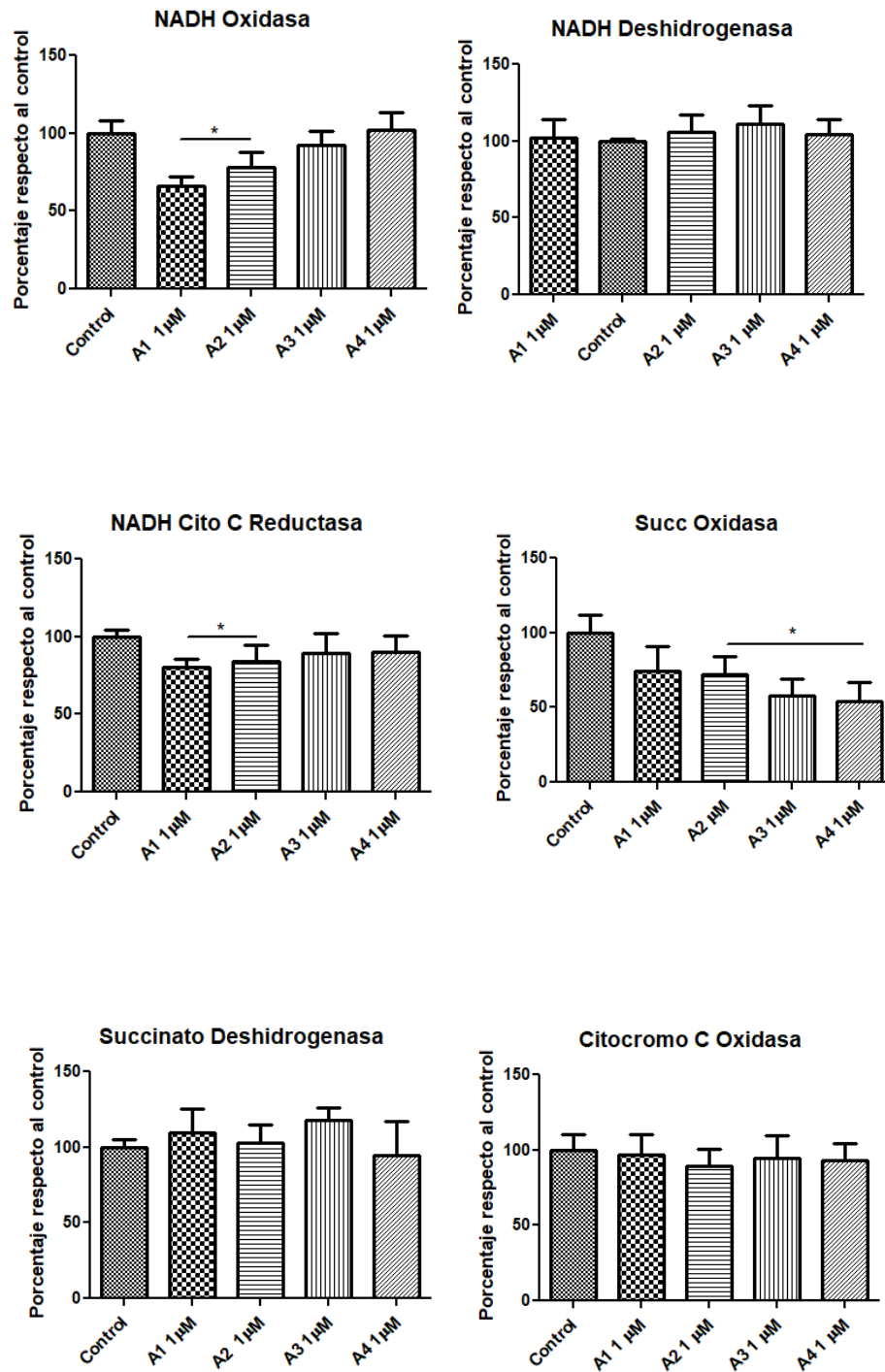


Figura 21. Efecto de los distintos híbridos moleculares de THQ/Isozaxolina sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondria. Los valores del 100% corresponden a: NADH oxidasa: 72.91 ± 14.7 nmol O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial; NADH deshidrogenasa: 1.72 ± 0.62 μmol de ferricianuro reducido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial; NADH citocromo c reductasa: 0.17 ± 0.01 μmol de citocromo

c reducido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial; Succinato oxidasa: 10.46 ± 5.61 nmol O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial; Succinato deshidrogenasa: 0.013 ± 0.002 pmol of DCPIP reducido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial; Citocromo c oxidasa: 7.38 ± 1.28 nmol de citocromo c oxidado por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial

2.3.5.1 Efecto del compuesto A1 sobre la enzima succinato citocromo c reductasa. Una vez evaluados los distintos híbridos moleculares de THQ/Isozaxolina sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, se observó que el compuesto A1 exhibe una inhibición sobre la NADH oxidasa y la NADH citocromo c reductasa. Es por ello que fue necesario evaluar la citocromo c reductasa usando como sustrato, el succinato. El resultado obtenido, tal como se observa en la Figura 16, indica que sí existe una inhibición del 76% respecto al control, del compuesto A1 $1 \mu\text{M}$ sobre dicha enzima; por ende, se estima que el mecanismo de acción de este fármaco ocurre en la entrega de electrones al citocromo c en el complejo III.

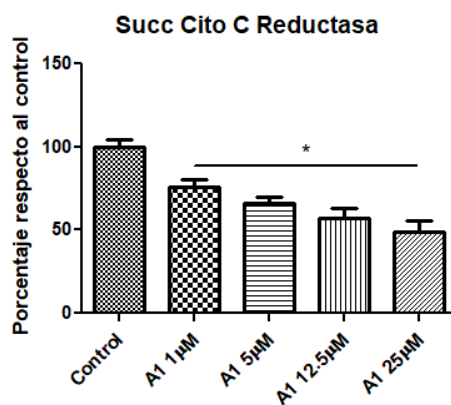


Figura 22. Efecto del compuesto A1 sobre la succinato citocromo c reductasa: El valor del 100% corresponde a: 20.42 ± 0.22 nmol of citocromo c reductasa por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial.

2.3.5.2 Efecto de los híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina sobre la ATPasa. Para el ensayo de la actividad enzimática de la ATPasa se realizaron dos estudios por separado. En el primero se emplearon mitocondrias fragmentadas; mientras, en el segundo, mitocondrias íntegras; los resultados obtenidos se evaluaron a partir de la cuantificación del fosfato liberado por la hidrólisis del ATP. En el ensayo de la ATPasa en mitocondrias fragmentadas no se observó un efecto estadísticamente significativo respecto al control es decir, no existe una inhibición de los tratamientos sobre la ATPasa, tal como se ilustra en la Figura 17 (a).

No obstante, en el ensayo de la ATPasa en mitocondrias íntegras, donde se evalúa el efecto sobre el potencial de membrana, se produjo un aumento desde 154% hasta 184% en la actividad ATPasa respecto al control, empleando la menor concentración de cada compuesto (Figura (b)), lo cual indica que existe un incremento en la cantidad de fosfato hidrolizado y un daño en el potencial de membrana de la mitocondria; por ende, todos los compuestos evaluados evidencian una actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa.

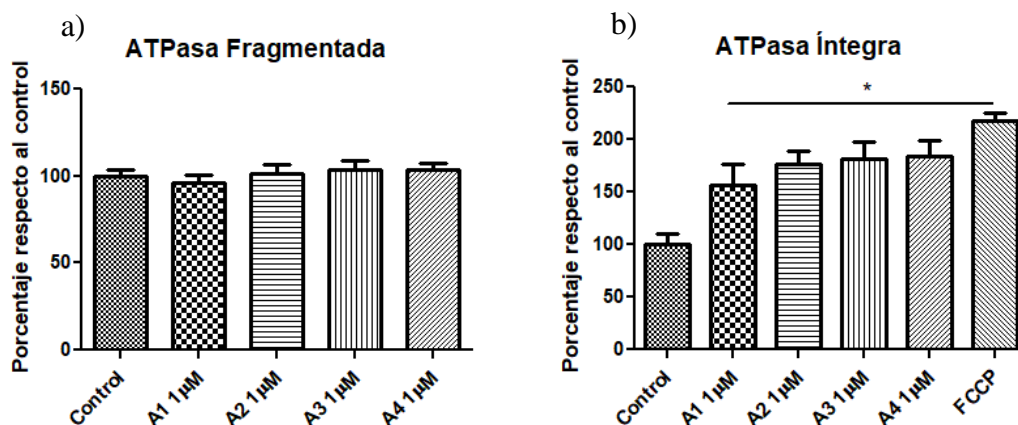


Figura 23. Efecto de los distintos híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina sobre la actividad ATPasa en: a) mitocondrias fragmentadas b) mitocondrias íntegras. Cada valor representa el promedio \pm desviación

estándar de tres experimentos independientes. *significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$). La actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas e íntegras 100% de actividad corresponde a 7.29 ± 0.24 y 41.43 ± 5.49 μmol de Pi hidrolizado, respectivamente.

Además, en este último ensayo se empleó el ionóforo FCCP (carbonyl cyanide p(trifluoromethoxy) phenylhydrazone) para confirmar el incremento de la actividad ATPasa en presencia de un desacoplante. Este sugiere que los tratamientos también inducen el transporte de protones hacia la matriz mitocondrial, afectando el potencial de membrana necesario para el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.

Actualmente, existen diversos estudios que comprueban que los agentes desacoplantes poseen un potencial anticancerígeno; en el caso del FCCP, éste induce apoptosis en células Calu-6 por activación de las caspasas 3, 6 y 9 (Han, Kim, & Park, 2009) e induce efectos citotóxicos sobre células PC12 (Dispersyn & Nuydens, 1999). Además, este desacoplamiento mitocondrial puede permeabilizar la membrana interna, lo cual podría permitir la liberación del citocromo c y posterior activación de caspasas (Buja & Eigenbrodt, 1993). Asimismo, los resultados obtenidos infieren que los distintos híbridos moleculares de THQ/Isoxazolina evaluados producen un aumento en la actividad de este complejo respiratorio, lo cual implica un incremento en el flujo de electrones a través de la cadena, provocando un desacoplamiento intrínseco o extrínseco de la fosforilación oxidativa.

No obstante, cabe resaltar que, para tener un conocimiento más amplio del efecto de dichos compuestos sobre la mitocondria, se requieren más ensayos encaminados a evaluar el

potencial de membrana y la posible formación de un poro transitorio de permeabilidad mitocondrial para complementar dicho estudio.

Finalmente, con este proyecto se buscó encontrar diferencias significativas en la acción de cuatro compuestos híbridos de THQ/Isoxazolina a distintas concentraciones, sobre la cadena respiratoria mitocondrial y las enzimas involucradas; por lo cual, esta investigación podría abrir campo a estudios más profundos acerca de tratamientos contra enfermedades que dispongan a la mitocondria como posible diana farmacológica.

3. Conclusiones

- ✓ Los híbridos de THQ/Isoxazolina A1 y A2 evidenciaron una inhibición dosis dependiente, a partir de la menor concentración, en presencia de ADP con respecto al control vía complejo I.
- ✓ A medida que se incrementa la electronegatividad del átomo en el sexto carbono del anillo tetrahydroquinolínico, aumenta el desacople, pero disminuye la inhibición en el transporte de electrones vía complejo 1.
- ✓ Los compuestos A1 y A2 generaron una disminución en la actividad enzimática de la NADH oxidasa y la NADH citocromo c reductasa; además, se evidenció que el compuesto A1 inhibe la succinato citocromo c reductasa y el compuesto 2 inhibe la succinato oxidasa; es decir, ambos compuestos inhiben el complejo III de la cadena respiratoria. Mientras que los compuestos A3 y A4 provocaron una inhibición en la actividad de la enzima succinato oxidasa (el paso de electrones desde el complejo II hasta el complejo IV) de forma no relacionada directamente con los complejos de la cadena respiratoria. Además, ningún compuesto inhibe la ATPasa.
- ✓ Los híbridos THQ/ Isoxazolina presentan actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa.

Referencias Bibliográficas

- Appleby, C. ., & Morton, R. . (1959). Lactic dehydrogenase and cytochrome b2 of baker's yeast; purification and crystallization. *The Biochemical Journal*, 71(3), 492–499.
- Arif, M. I., Samin, G., van Leeuwen, J. G. E., Oppentocht, J., Janssen, D. B., & Benaim, G. (2012). Novel dehalogenase mechanism for 2,3-dichloro-1-propanol utilization in *Pseudomonas putida* strain MC4. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6128–6136.
- Bauer, D. E., & Temple, E. (2013). FDA Requirements for Approval of New Drugs. *Cancer Treatment Reports*, 69(10), 1155–1159.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N. C., Nakano, K., Bartrons, R., ... Vousden, K. H. (2006). TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell*, 126(1), 107–120.
- Berkers, C. R., Maddocks, O. D. K., Cheung, E. C., Mor, I., & Vousden, K. H. (2013). Metabolic Regulation by p53 Family Members. *Cell Metabolism*, 18(5), 617–633.
- Botham, K. M., & Mayes, P. A. (2005). *Cadena Respiratoria y Fosforilación Oxidativa* (Biochem Biophys). Madrid: Science. Retrieved from [http://preparaduriabioqii.weebly.com/uploads/4/9/0/4/49049923/capítulo_13_\[harper\]_-_cadena_respiratoria_y_fosforilación_oxidativa.pdf](http://preparaduriabioqii.weebly.com/uploads/4/9/0/4/49049923/capítulo_13_[harper]_-_cadena_respiratoria_y_fosforilación_oxidativa.pdf)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bueno, Y., & Méndez, S. (2015). Efecto del Linalool sobre la Bioenergética de Mitocondrias de Hígado de Rata. *Vitae*, 22(1), 33–41. Retrieved from

<http://www.redalyc.org/html/1698/169840731004/>

- Buja, L., & Eigenbrodt, M. (1993). Apoptosis and Necrosis. Basic Types and Mechanisms of Cell Death. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 117(12), 1208–1214.
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>
- Cesare, T., Tracey Pirali, Giovanni Sorba, & Francesca Pagliai. (2006). Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11), 3033–3044.
- Chen, P., Toribara, T., & Warner, H. (1971). Microdetermination of phosphorus in proteins. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 288–291.
- Chen, Y.-L., Zhao, Y.-L., Lu, C.-M., Tzeng, C.-C., & Wang, J.-P. (2006). Synthesis, Cytotoxicity, and Anti-Inflammatory Evaluation of 2-(furan-2-yl)-4-(phenoxy)quinoline Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(13), 4373–4378.
- Contractor, T., & Harris, C. R. (2012). p53 Negatively Regulates Transcription of the Pyruvate Dehydrogenase Kinase Pdk2. *Cancer Research*, 72(2), 560–567.
- Cuezva, J., & Krajewska, M. (2002). The Bioenergetic Signature of Cancer: A Marker of Tumor Progression. *American Association for Cancer Research*, 62(22), 6674–6681.
- de Moura, M. B., dos Santos, L. S., & Van Houten, B. (2010). Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(5), NA-NA.
- Dispersyn, G., & Nuydens, R. (1999). Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1428(2–3), 357–371.

[https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00073-2)

- Dorey, G., Lockhart, B., Lestage, P., & Casara, P. (2000). New Quinolinic Derivatives as Centrally Active Antioxidants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *10*(9), 935–939.
- Ellis, L., & Hicklin, D. (2008). Targeted Therapy: Mechanisms of Anti-tumour Activity. *Nature Reviews*, *8*(8), 579.
- Ellis, R., Yuan, J., & Horvitz, R. (2000). Mechanisms and Functions of Cell Death. *Annual Review of Cell Biology*, *7*(1), 663–698.
- ESE, I. N. de C. (2012). *Plan Decenal para el Control del Cáncer en Colombia, 2012-2021*. Ministerio de Salud. Bogotá, D.C.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015, March 1). Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359–E386.
- Ferreira, L. M. R. (2010). Cancer Metabolism: The Warburg Effect Today. *Experimental and Molecular Pathology*, *89*(3), 372–380.
- Florea, A.-M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, *3*(4), 1351–1371.
- Frew, T. (2001, June). 21st-Century Disease. (Board, Ed.), *Practice Nursing*, *12*(6), 213–213.
- Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic Versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy. *Oncogene*, *25*(34), 4798–4811.
- Gibbs, J. B. (2000, March 17). Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery

- in Cancer Research. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5460), 1969–1973.
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell Death by Necrosis: Towards a Molecular Definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43.
- Gonzales, C. (2007). *Sobre Expresión de Genes de las Enzimas de la Vía Glicolítica en Células Cancerígenas. Acta Médica Peruana* (Vol. 24). Colegio Médico del Perú.
- Green, D., & Science, J. R. (1998). Mitochondria and Apoptosis. *American Association for the Advancement of Science*, 281(5381), 1309–1312.
- Han, Y. H., Kim, S. H., & Park, W. H. (2009). Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) as an O₂⁻ generator induces apoptosis via the depletion of intracellular GSH contents in Calu-6 cells. *Lung Cancer*, 63(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2008.05.005>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Heiden, M. Vander, & Cantley, L. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
- Ho, V., & Leung, K. (2011). A Low Carbohydrate, High Protein Diet Slows Tumor Growth and Prevents Cancer Initiation. *AACR*, 71(13), 4484–4493.
- Hu, W., & Kavanagh, J. J. (2003). Anticancer Therapy Targeting The Apoptotic Pathway. *The Lancet Oncology*, 4(12), 721–729.
- Huczynski, A. (2012). Salinomycin - A New Cancer Drug Candidate. *Chemical Biology & Drug Design*, 79(3), 235–238. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01287.x>
- Huczynski, A. (2012). Polyether ionophores—promising bioactive molecules for cancer therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(23), 7002–7010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.046>

- Jacquemond-Collet, I., Benoit-Vical, F., Valentin, A., Stanislas, E., Mallié, M., Fourasté, I., & Isabelle, N. (2002). Antiplasmodial and Cytotoxic Activity of Galipinine and other Tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. *Planta Medica*, *68*(1), 68–69.
- Jana, S., Patra, K., Sarkar, S., Jana, J., Mukherjee, G., Bhattacharjee, S., & Mandal, D. P. (2014). Antitumorigenic Potential of Linalool Is Accompanied by Modulation of Oxidative Stress: An In Vivo Study in Sarcoma-180 Solid Tumor Model. *Nutrition and Cancer*, *66*(5), 835–848. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.904906>
- Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (2000). Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Experimental Cell Research*, *256*(1), 42–49.
- Kaur, K., Kumar, V., Sharma, A. K., & Gupta, G. K. (2014). Isoxazoline containing natural products as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *77*, 121–133.
- Kim, J., & Tchernyshyov, I. (2006). HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: A Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia. *Cell Metabolism*, *3*(3), 177–185.
- Kouznetsov, V. (2012). Tetrahydroquinolinas: Compuestos de Origen Sintéticos con Propiedades Antitumorales Sobre Líneas de Cáncer Humano. *Memorias Del Instituto de Biología Experimental*, *6*, 77–80.
- Kroemer, G., & Reed, J. C. (2000). Mitochondrial Control of Cell Death. *Nature Medicine*, *6*(5), 513–519.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A.-L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., ... Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1366*(1–2), 177–196.

- Liu, F. (2009). Mechanisms of Chemotherapeutic Drug Resistance in Cancer Therapy. *Taiwanese Journal of Obstetrics*, 23(2), 881–889.
- Lobo, N. A., & Shimono, Y. (2007). The Biology of Cancer Stem Cells. *Annual Reviews*, 23(1), 675–699.
- López, A., García, J. A., Escames, G., Venegas, C., Ortiz, F., López, L. C., & Acuña-Castroviejo, D. (2009). Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *Journal of Pineal Research*, 46(2), 188–198. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00647.x>
- Lu, J., Tan, M., & Cai, Q. (2015). The Warburg Effect in Tumor Progression: Mitochondrial Oxidative Metabolism as an Anti-Metastasis Mechanism. *Cancer Letters*, 356(2 Pt A), 156–164.
- Machado, J. P., & Eliécer, A. (2011). *Apoptosis, Mecanismo de Acción*. Universidad de Ciencias Médicas de Mayabeque, Cuba.
- Martínez, A. (2001). *Aceites Esenciales*. Universidad de Antioquia.
- Martínez, M. (2014). Las Mitocondrias como Blanco Terapéutico. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37(4), 283–296.
- Mason, T. L., Poyton, R. O., Wharton, D. C., & Schatz, G. (1973). Cytochrome c oxidase from bakers' yeast. I. Isolation and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(4), 1346–1354.
- Matoba, S., Wragg, A., & Boehm, M. (2002). p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science*, 312(34), 249–1617.
- Meléndez Gómez, C., & Kouznetsov, V. (2005). Alcaloides Quinolínicos: Importancia Biológica y Esfuerzos Sintéticos. *Universitas Scientiarum*, 10(2), 5–18.

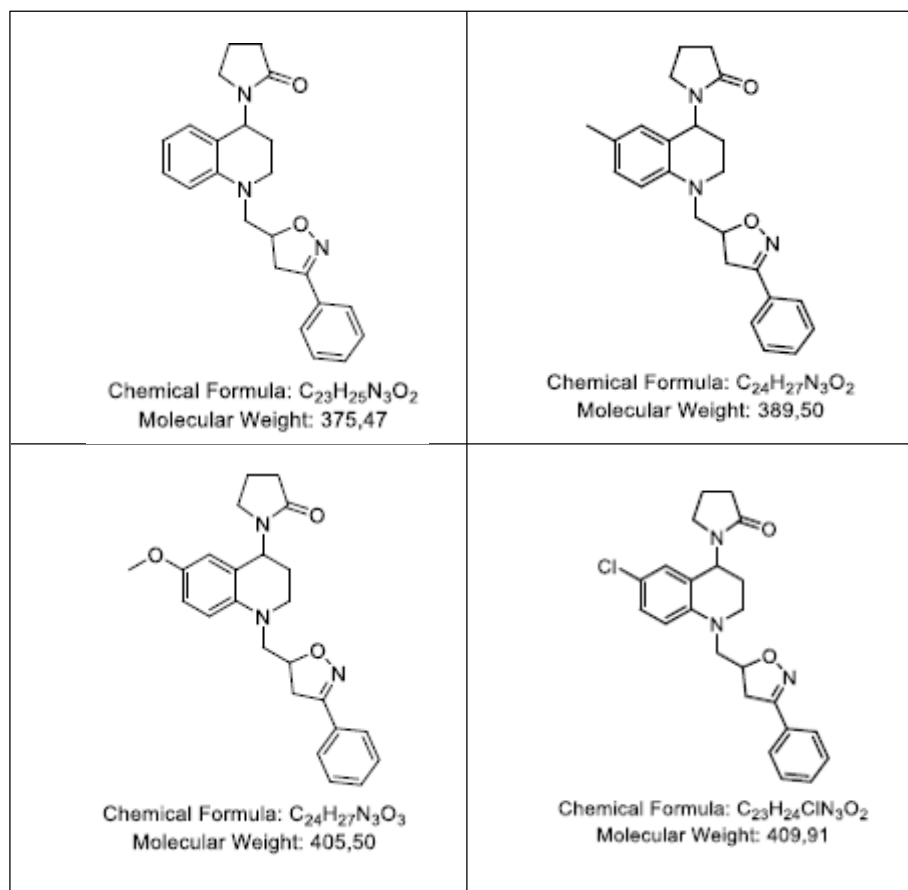
- Mendiola, A., & Soto, I. (2014). Metabolismo Energético y Cáncer. *Revista Especializada En Ciencias de La Salud*, *17*(2), 108–113.
- Mitani, M., Yamanishi, T., Miyazaki, Y., & Otake, N. (1976). Salinomycin Effects on Mitochondrial Ion Translocation and Respiration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *9*(4), 655–660. <https://doi.org/10.1128/AAC.9.4.655>
- Mitchison, J. M., & Carter, B. L. A. (1975). Cell Cycle Analysis. *Methods in Cell Biology*, *11*, 201–219.
- Modica, N., & Singh, J. (2004). Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Elsevier*, 98.
- Montero, A. J., & Jassem, J. (2011). Cellular Redox Pathways as a Therapeutic Target in the Treatment of Cancer. *Drugs*, *71*(11), 1385–1396. <https://doi.org/10.2165/11592590-000000000-00000>
- Murphy, M. P., & Smith, R. A. . (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *41*(2), 235–250.
- Nardi, G. M., DalBó, S., & Pizzolatti, M. G. (2006). Antinociceptive Effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *107*(1), 73–78.
- Naujokat, C., & Steinhart, R. (2012). Salinomycin as a Drug for Targeting Human Cancer Stem Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2012/950658>
- Navarro, Y. C. (2005). *Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno*. Universidad de Barcelona. Retrieved from https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/995/01.YCN_INTRODUCCION.pdf?sequence=2
- Petrescu, I., & Tarba, C. (1997). Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused

- liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1318(3), 385–394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(96\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00109-0)
- Pettit, G., Hoard, M., Doubek, D., & Schmidt, M. (2002). Antineoplastic Agents. The Cancer Cell Growth Inhibitory. *Elsevier*, 44(3), 445–456.
- Phan Minh, G., & Jeong Hyung, L. (2003). ent-Kaurane Diterpenoids from *Croton tonkinensis* Inhibit LPS-Induced NF- κ B Activation and NO Production. *Journal of Natural Products*, 66(9), 1217–1220.
- Pullman, M. E., Penesky, H. S., Datta, A., & Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 3322–3329.
- Sabroso, C., & Suárez, D. (2013). Nuevas Estrategias en Terapia Antitumoral Basadas en la Inducción de la Apoptosis. *Anales de La Real Academia Nacional*, 79(2), 20.
- Sarveswari, S., & Vijayakumar, V. (2016, September 1). Synthesis and characterization of new 3-(4,5-dihydro-5-aryl)isoxazol-3-yl)-4-hydroxyquinolin-2(1H)-ones and 3-(4-styryl)isoxazolo[4,5-c]quinolin-4(5H)-one derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S835–S839.
- Semenza, G. (2010). Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics. *Oncogene*, 29(5), 625–634.
- SEOM, S. E. de O. M. (2015). *El Cáncer a Nivel Mundial*. SEOM. Madrid, España.
- Sherr, C. (1996). Cancer Cell Cycles. *Science.ScienceMag.Org*, 27(4), 1672–1677.
- Silverberg, E., & Lubera, J. A. (1983, January 1). A Review of American Cancer Society Estimates of Cancer Cases and Deaths. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 33(1), 2–8.

- Singer, T. P. (1974). Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and α -Glycerophosphate Dehydrogenases. In David Glick (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis* (pp. 123–175). Wiley-Blackwell.
- Skulachev, V. P. (2006). Bioenergetic Aspects of Apoptosis, Necrosis and Mitoptosis. *Apoptosis*, 11(4), 473–485.
- Somlo, M. (1965). Induction des lactico-cytochrome c reductases (d-et l-) de la levure aerobie par les lactates (d- et l-). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 97(2), 183–201.
- Suárez, A. I., Blanco, Z., Compagnone, R. S., Salazar-Bookaman, M. M., Zapata, V., & Alvarado, C. (2006). Anti-Inflammatory Activity of Croton Cuneatus Aqueous Extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1–2), 99–101.
- Suárez, A. I., Chavez, K., Mateu, E., & Compagnone, R. (2009). Cytotoxic Activity of secoentkaurenes from Croton caracasana on Human Cancer Cell Lines. *Natural Product Communications*, 4(11), 1547–1550.
- Tello, D., Balsa, E., Acosta-Iborra, B., Fuertes-Yebra, E., Elorza, A., Ordóñez, Á., ... Landázuri, M. O. (2011). Induction of the Mitochondrial NDUFA4L2 Protein by HIF-1 α Decreases Oxygen Consumption by Inhibiting Complex I Activity. *Cell Metabolism*, 14(6), 768–779.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015, March 1). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108.
- Tracey, E. H., & Vij, A. (2015). Updates in Melanoma. *Dermatologic Clinics*, 37(1), 73–82.
<https://doi.org/10.1016/J.DET.2018.08.003>
- UNAB. (2012). Incidencia de Cáncer en el Área Metropolitana de Bucaramanga, 2000-2004. *Cancer Research*, 147–172.

- Vangapandu, S., Jain, M., Jain, R., Kaur, S., & Pal Singh, P. (2004). Ring-Substituted Quinolines as Potential Anti-Tuberculosis Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *12*(10), 2501–2508.
- Voss, D. O., Cowles, J. C., & Bacila, M. (1963). A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. *Analytical Biochemistry*, *6*(3), 211–222.
- Wallace, D. C. (2005, December 14). A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annual Review of Genetics*, *39*(1), 359–407.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science, New Series*, *123*(3191), 309–314.
- Xu, R., Pelicano, H., Zhou, Y., & Carew, J. (2005). Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *AACR*, *65*(2).
- Zitvogel, L., & Apetoh, L. (2008). Immunological Aspects of Cancer Chemotherapy. *Nature Medicine*, *24*(3), 881.

Apéndice



Apéndice a. Estructura molecular de compuestos híbridos de Tetrahydroquinolinas/Isoxazolina evaluados.