



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grao

**Análisis biológico de sondas mitocondriales de especies
oxigenadas reactivas basadas en viológenos**

**Análise biolóxica de sondas mitocondriáis de especies
osixenadas reactivas baseadas en violóxenos**

**Biological analysis of viologen-based mitochondrial probes for
reactive oxygenated species**

Alejandro Vila García

Curso: 2020 - 2021.

Convocatoria: Septiembre

Director 1: Ana Rey Rico

Director 2: Andrés Martínez Lage

TRABAJO DE FIN DE GRADO

D.^a Ana Rey Rico y D. Andrés Martínez Lage autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Análisis biológico de sondas mitocondriales de especies oxigenadas reactivas basadas en viológenos” presentado por Alejandro Vila García para su defensa ante el tribunal calificador.

A handwritten signature in black ink that reads "Ana Rey". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the left.

Fdo: Ana Rey Rico

A handwritten signature in blue ink that reads "Andrés". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the left.

Fdo: Andrés Martínez Lage

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a mis directores, a la Dra. Ana Rey Rico y al Dr. Andrés Martínez Lage por permitirme participar en este proyecto, guiándome y posibilitando continuar mi formación como biólogo. Gracias a Natalia por haberme ayudado a dar mis primeros pasos en un laboratorio de biología celular. A Mauro y a Nati por los buenos momentos pasados tanto en el laboratorio como fuera de él. Gracias a todos mis compañeros por compartir estos largos años de los que solo me llevo cosas positivas. Por último, agradecer a mi familia el apoyo incondicional, a mis amigos esos momentos de descanso tan necesarios y a Claudia, su paciencia y el estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. La mitocondria y la cadena de transporte electrónico.....	6
1.2. Especies reactivas de oxígeno y la mitocondria.....	6
1.3. Daño oxidativo, patologías y cáncer	7
1.4. Uso de moléculas dirigidas a la mitocondria como terapia contra el cáncer	8
1.5. Sondas mitocondriales de ROS	8
1.5.1. Transportador mitocondrial	9
1.5.2. Unidad moduladora de ROS	9
1.5.3. Unidad transductora.....	10
2. OBJETIVOS	11
3. Material y métodos	12
3.1. General.....	12
3.2. Cultivos celulares	12
3.2.1. Descongelación de las líneas celulares	12
3.2.2. Mantenimiento de las líneas celulares.....	13
3.3. Conteo en cámara de Neubauer	13
3.4. Preparación de los compuestos del estudio	14
3.5. Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular.....	15
3.5.1. Ensayo WST-1.....	15
3.5.2. Medida de la producción de ATP.....	16
3.6. Ensayo de medida de ROS.....	16
3.7. Uso de métodos estadísticos para el análisis de los resultados.....	17

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Estudio de la viabilidad celular en presencia de los compuestos estudiados.....	18
4.2. Medida de la producción de ATP	21
4.3. Estudio de la generación de ROS citosólicas.....	23
5. CONCLUSIONES	26
CONCLUSIÓN.....	27
CONCLUSIONS.....	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS: *reactive oxygen species*) son fundamentales en la señalización celular de múltiples procesos como la expresión génica o la apoptosis. Asimismo, se ha descrito una relación entre el aumento de ROS intracelular y diversas patologías como el cáncer o el Alzheimer. Debido a esto, el desarrollo de herramientas que permitan regular los niveles de ROS es necesario.

El presente trabajo de fin de grado se centró en el estudio preliminar de la citotoxicidad y la producción de ROS de distintos compuestos derivados del viológeno. Dos de estos compuestos presentan una unidad de viológeno en su estructura: el Paraquat (**P**), un herbicida conocido por su citotoxicidad y capacidad de inducción de estrés oxidativo y **PTPP**, un compuesto análogo al Paraquat que presenta un transportador mitocondrial que aporta selectividad en su diana celular. Los otros dos compuestos estudiados presentan un enlace hidrazona entre los anillos de piridinio de la unidad del viológeno: **H** es un compuesto de estructura similar a **P** pero con este enlace en su estructura y **HTPP**, un análogo de **H** dirigido a la mitocondria. La capacidad de estos compuestos de disminuir la viabilidad celular y de aumentar el estrés oxidativo fue estudiado en varias líneas celulares (RAW264.7, HeLa, A549), siendo las 2 últimas de origen tumoral.

Los resultados obtenidos parecen indicar que los compuestos con enlace hidrazona en su estructura (**H**, **HTPP**) presentan patrones de citotoxicidad y de producción de ROS distintos a los observados con los derivados del viológeno (**P**, **PTPP**). Además, se encontró una citotoxicidad selectiva para las células cancerígenas del compuesto **H**, si bien, es necesario realizar más estudios para determinar su potencial antitumoral y mecanismo de actuación.

Palabras clave: Viológeno, trifenilfosfonio, mitocondria, cáncer, viabilidad, ROS, ATP, WST-1, biología celular.

RESUMO

As especies reactivas de osíxeno (ROS: *reactive oxygen species*) son fundamentais na sinalización celular de múltiples procesos como a expresión xénica ou a apoptose. Do mesmo xeito, describiuse unha relación entre o aumento de ROS intracelular e distintas patoloxías coma o cancro ou o Alzheimer. Debido a isto, é necesario o desenvolvemento de ferramentas que permitan regular os niveis de ROS.

Este traballo de fin de grado centrouse no estudo preliminar da citotoxicidade e a produción de ROS de distintos compostos derivados do violóxeno. Dous destes compostos presentan unha unidade de violóxeno na súa estrutura: O Paraquat (**P**), un herbicida coñecido pola súa citotoxicidade e a capacidade de inducir estrés oxidativo e **PTPP**, un composto análogo ao Paraquat que presenta un transportador mitocondrial, que aporta selectividade na diana celular. Os outros dous compostos estudados presentan un enlace hidrazona entre os aneis de piridinio do violóxeno : **H** é un composto cunha estrutura similar a **P** pero con este enlace na súa estrutura e, **H TPP**, é un análogo de **H** dirixido á mitocondria. A capacidade destes compostos de diminuír a viabilidade celular e aumentar o estrés oxidativo estudouse en varias liñas celulares (RAW264.7, HeLa, A549), sendo as últimas dúas de orixe tumoral.

Os resultados obtidos parecen indicar que os compostos con enlace hidrazona na súa estrutura (**H**, **H TPP**) presentan patróns de citotoxicidade e de produción de ROS distintos aos observados nos derivados do violóxeno (**P**, **PTPP**). Ademais, encontrouse unha citotoxicidade selectiva para as células canceríxenas do composto **H**, aínda que é necesario realizar máis estudos para determinar o seu potencial antitumoral e o seu mecanismo de acción.

Palabras chave: Violóxeno, trifenílfosfonio, mitocondria, cancro, viabilidade, ROS, ATP, WST-1, bioloxía celular.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are essential in cell signalling of multiple processes such as gene expression or apoptosis. Likewise, a relationship between the increase in intracellular ROS and various pathologies such as cancer or Alzheimer's has been described. Due to this, the development of tools to regulate ROS levels is necessary.

This TFG is focused on the preliminary study of cytotoxicity and ROS production of different compounds derived from viologen. Two of these compounds contains a viologen moiety: Paraquat (**P**), an herbicide known for its cytotoxicity and capacity to induce oxidative stress, and **PTPP**, an analog of Paraquat bearing a mitochondrial carrier that provides selectivity in its cellular target. The other two compounds studied have a hydrazone bond between the pyridinium rings of the viologen: **H**, that is a compound with a similar structure to **P** but with this bond in its structure, and **HTPP**, an analog of **H** targeted to the mitochondria. The ability of these compounds to decrease cell viability and increase oxidative stress was studied in several cell lines (RAW264.7, HeLa, A549), being the last 2 ones from tumor origin.

The results obtained seem to indicate that the compounds with hydrazone bond in their structure (**H**, **HTPP**) presented patterns of cytotoxicity and ROS production different from those observed with the viologen derivatives (**P**, **PTPP**). In addition, a selective cytotoxicity for cancer cells of compound **H** was found, although more studies are needed to determine its antitumor potential and mechanism of action.

Key words: Viologen, triphenylphosphonium, mitochondria, cancer, viability, ROS, ATP, WST-1, cellular biology.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
Cel	Células
cm²	Centímetros cuadrados
DHE	Dihidroetidio
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido
h	Horas
MEM	Medio esencial mínimo
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimol
mm²	Milímetros cuadrados
mv	Milivoltios
NADH	Nicotín adenín dinucleótido
nm	Nanómetro
P/E	Penicilina/estreptomicina
PBS	Tampón fosfato salino
Redox	Reducción-oxidación

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
rpm	Revoluciones por minuto
TFG	Trabajo de fin de grado
TPP⁺	Trifenilfosfonio
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
V	Viológeno

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La mitocondria y la cadena de transporte electrónico

La mitocondria es el orgánulo celular encargado de la producción de la mayor parte de la energía necesaria para el funcionamiento de los organismos eucariotas. Esta energía se obtiene mediante la degradación de ácidos grasos y carbohidratos y se almacena en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa.¹ La producción de energía se lleva a cabo en la membrana mitocondrial interna. En ella se encuentran los 5 complejos que forman parte de la cadena de transporte electrónico (**Figura 1**), responsable de la producción de ATP.^{1,2}

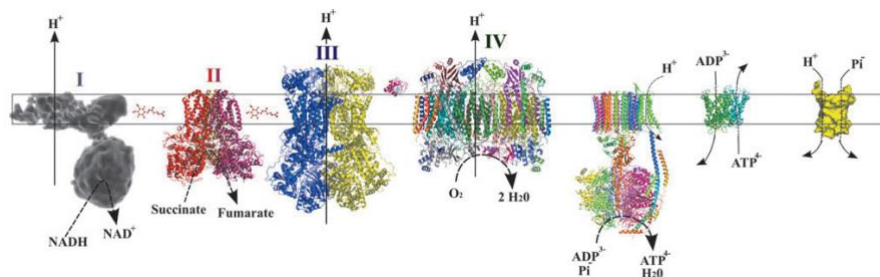


Figura 1. Cadena de transporte electrónico mitocondrial.³

Este proceso comienza cuando las coenzimas reducidas NADH y FADH₂, generadas en procesos catalíticos, ceden un par de electrones a la cadena de transporte. Posteriormente, estos electrones van a ser transportados por los distintos complejos hasta llegar al último aceptor de la cadena, el oxígeno, que toma dos protones del medio para formar H₂O.^{1,2}

Cuando los electrones llegan a los complejos I, III, y IV de la cadena, se genera un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. Este proceso genera un gradiente electroquímico (fuerza protón-motriz) a ambos lados de la membrana mitocondrial interna. Como los protones no son capaces de regresar a la matriz por difusión, requieren de canales de proteínas que les facilite este movimiento. El quinto complejo de la cadena, la ATP sintasa, aprovecha este movimiento de retorno para generar ATP a partir de ADP e iones fosfato.^{1,2}

1.2. Especies reactivas de oxígeno y la mitocondria

Las especies reactivas de oxígeno (ROS; acrónimo del inglés *reactive oxygen species*) presentan un papel fundamental en la señalización celular intra y extracelular actuando como segundos mensajeros en procesos como la apoptosis y regulación de la expresión génica, así como en la diferenciación y proliferación celular.

La mayor parte de las ROS producidas de forma intracelular se generan en la mitocondria.³ Durante el correcto funcionamiento mitocondrial, entre el 1 y el 2% del oxígeno de la cadena de transporte se

reduce a superóxido (O_2^-),⁴ el cual dismuta rápidamente a H_2O_2 bien de forma espontánea o catalizado por distintas enzimas.⁵ Es esta última especie la que actúa como principal mediador en los procesos de señalización. Estas ROS no se generan únicamente en la mitocondria, su producción ocurre en el citosol y en otros orgánulos celulares como el retículo endoplasmático o los peroxisomas.

A pesar de contribuir al correcto funcionamiento celular, el aumento de estas especies se ha relacionado con el daño oxidativo, llevando a un mal funcionamiento celular al dañar el ADN, así como lípidos y proteínas citosólicas.⁴ Para evitar el daño producido, las células presentan distintas herramientas destinadas a reducir el estrés oxidativo, estas pueden ser enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa...) o compuestos no enzimáticos con actividad antioxidante (vitamina E, ascorbato, transferrina...).³ De esta forma, se puede definir el estrés oxidativo como el desbalance entre la producción de especies oxidantes y la capacidad antioxidante de la célula para prevenir el daño.

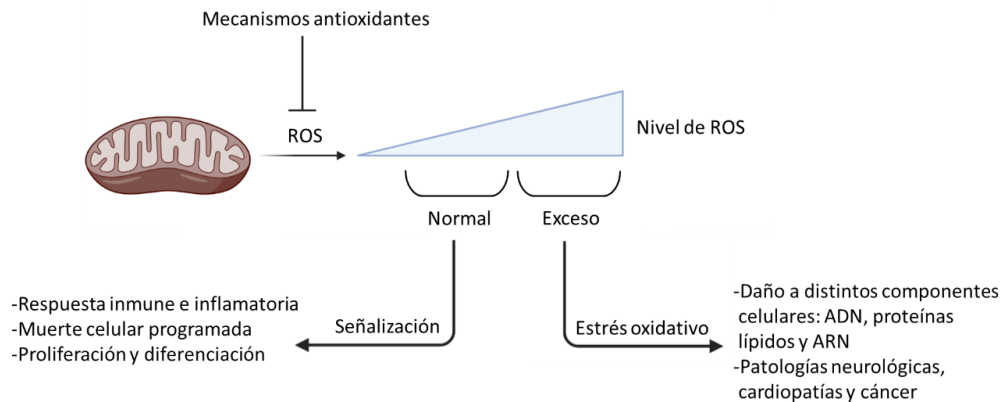


Figura 2. Esquema de los efectos de las ROS mitocondriales (elaboración propia).

1.3. Daño oxidativo, patologías y cáncer

Pese a que el aumento del daño oxidativo se asocia con diferentes patologías cardiovasculares, neurológicas y con el cáncer, aún no se conoce con profundidad el papel que desempeñan las ROS en el desarrollo de estas enfermedades.^{4,5} En concreto, en el cáncer, las especies reactivas de oxígeno intervienen en la mayoría de los procesos que caracterizan a esta patología como la proliferación descontrolada, la inestabilidad genética, la metástasis, la transformación celular, la transición epitelio mesénquima y la angiogénesis.⁴

Debido a esto, la mitocondria se ha convertido en una de las dianas farmacológicas más importantes, provocando el desarrollo de herramientas que ayuden al estudio de los procesos mediados por ROS y de diversos fármacos capaces de ayudar en la lucha contra el cáncer.

1.4. Uso de moléculas dirigidas a la mitocondria como terapia contra el cáncer

El objetivo terapéutico de los estudios contra el cáncer es conseguir aumentar la citotoxicidad en las células cancerígenas a la vez que se disminuye la toxicidad en las células normales.⁶ Debido al mayor potencial de membrana que presentan las células cancerígenas, es posible provocar la acumulación selectiva de moléculas bioactivas en ellas, abriendo la puerta a una serie de estrategias que permitan ayudar en la lucha contra el cáncer.^{4,5} Varios modos de actuación se enumeran a continuación.^{7,8}

- Acumulación selectiva de agentes alquilantes mediante una sonda basada en el grupo trifenilfosfonio (TPP⁺).
- Acumulación selectiva de dos productos que reaccionen entre si dando un producto tóxico.
- Adición de una sonda a fármacos preexistentes para mejorar su acumulación y especificidad.
- Acumulación de compuestos de oro capaces de inhibir las enzimas antioxidantes protectoras haciendo a las células más susceptibles al resto de fármacos.

En el presente TFG se emplearon modelos simplificados de sondas mitocondriales capaces de elevar de forma selectiva las ROS, lo que constituye una herramienta de estudio muy interesante.

1.5. Sondas mitocondriales de ROS

Para ser capaces de estudiar el efecto de las especies reactivas producidas en la mitocondria se requiere la existencia de herramientas capaces de internalizarse de forma selectiva en la matriz y elevar la concentración de ROS de forma rápida.^{5,7} Este tipo de sonda (**Figura 3**) presenta tres partes esenciales: un transportador mitocondrial, una unidad bioactiva moduladora de ROS y una unidad transductora que permita observar los cambios producidos en la actividad mitocondrial.⁵

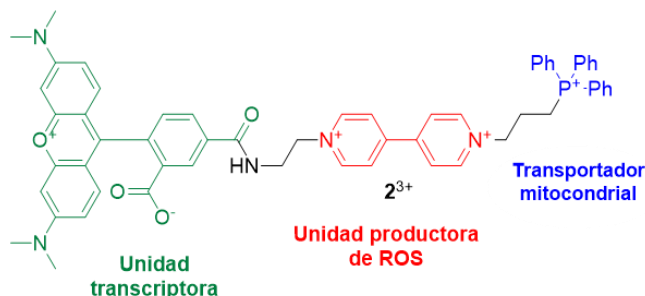


Figura 3. Ejemplo de sonda mitocondrial productora de ROS (elaboración propia).

1.5.1. Transportador mitocondrial

Esta fracción de la sonda será la encargada de provocar la acumulación selectiva del compuesto en la matriz mitocondrial. Uno de los transportadores más ampliamente utilizados y estudiados para la construcción de estas sondas son los derivados del TPP⁺.

La acumulación de estos transportadores se debe a la presencia de una carga positiva deslocalizada sobre una gran superficie hidrófoba que hará que la molécula se sienta atraída por el potencial de membrana de la mitocondria (150-160 mV). Este transportador es capaz de elevar la concentración de un compuesto en la mitocondria hasta 1000 veces manteniendo una baja toxicidad en sistemas biológicos.⁵

1.5.2. Unidad moduladora de ROS

Esta fracción será la encargada de modificar los niveles mitocondriales de ROS, debido a las propiedades redox de los derivados del viológeno (sales disustituidas de *N,N'*-4,4'-bipiridinio) que les otorga la capacidad de interactuar con los complejos I y III cadena de transporte y generar especies reactivas de forma catalítica. Un ejemplo de esto es el Paraquat (*N,N'*-4,4'-dimetilviológeno) uno de los herbicidas más utilizados que causa cada año la muerte de 300000 personas en el mundo.⁹ Estudios realizados con este compuesto ponen de manifiesto su capacidad de producir ROS intracelular en el citosol y distintos orgánulos, siendo la cadena de transporte mitocondrial, su principal diana.

El acoplamiento de un vector mitocondrial al Paraquat ha permitido estudiar el aumento selectivo de la producción de ROS en este orgánulo. De esta forma, el MitoParaquat (molécula muy similar a una de las utilizadas en el presente trabajo, **PTPP**) ha mostrado la capacidad de aumentar los niveles de ROS mitocondriales de forma selectiva convirtiéndose en una herramienta útil para el estudio del papel del estrés oxidativo en diversas patologías.¹⁰

En el presente TFG se trabajó con dos moduladores de ROS que presentan la fracción del viológeno en su estructura, el Paraquat y un derivado que presenta una sonda mitocondrial. Además, se estudió la actividad de dos moléculas que presentan un enlace hidrazona entre los dos anillos de la unidad de viológeno. Si bien se desconoce el mecanismo que presentan estos últimos compuestos para modificar la producción de ROS, estudios preliminares parecen indicar que estas moléculas no producen ROS de forma catalítica y, que, de ser capaces de producir ROS, lo harían de forma irreversible.

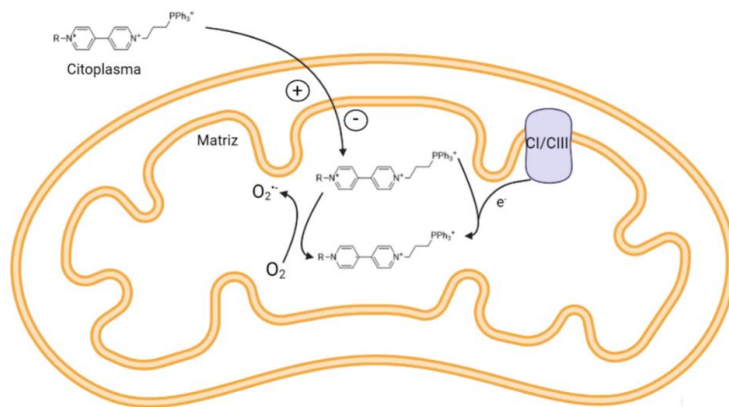


Figura 4. Internalización del compuesto con vector mitocondrial, interacción con los complejos I y II (CI/CIII) de la cadena de transporte y generación de ROS intramolecular (elaboración propia).

1.5.3. Unidad transductora

La finalidad de las unidades transductoras es reportar los cambios producidos en el entorno, en este caso, en los niveles de ROS. Las unidades de este tipo más utilizadas son moléculas fluorescentes debido a que son selectivas, sensibles, fáciles de manipular y permiten una monitorización en tiempo real.¹¹ En el presente trabajo, las moléculas de estudio son modelos simplificados de sondas, por lo que no presentan una unidad transductora en su estructura.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio preliminar de la actividad biológica que presentan una serie de compuestos derivados del viológeno con posible actividad moduladora de ROS, **P**, **H**, **PTPP** y **HTPP**. Donde **P** es el Paraquat (4,4'-N,N'-dimetilviológeno), **H** una molécula similar al Paraquat que presenta un enlace hidrazona entre los dos anillos de piridinio y **PTPP** y **HTPP** son los derivados de **P** y **H** que presentan un transportador mitocondrial en su estructura.

Para ello se planteó evaluar el efecto de estos compuestos sobre la viabilidad celular, la producción de ATP y la generación de ROS citosólicas en tres líneas celulares distintas, dos de ellas de carcinoma.

Sobre esta base, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un *screening* de citotoxicidad de los compuestos comprobando su dependencia de la concentración.
2. Cuantificar el descenso del ATP provocado por las moléculas de estudio.
3. Medir la generación de ROS citosólicas inducida por los distintos compuestos.
4. Relacionar la actividad biológica observada en los ensayos con la estructura química de los compuestos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. General

Para mantener las condiciones de esterilidad y seguridad en los procedimientos que implicaron el manejo de cultivos celulares, se utilizó una cabina de seguridad biológica clase 2 (*Telstar Bio-II-Advance*). Todo el material fungible utilizado (tubos Falcon, tubos Eppendorf, puntas de pipeta, frascos de cultivo) se encontraba en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación de las muestras. Además, previamente a su introducción en la cabina de seguridad, se desinfectó con etanol al 70% todo el material para reducir las posibilidades de contaminación.

3.2. Cultivos celulares

El estudio de la actividad biológica de los compuestos se llevó a cabo en tres líneas celulares distintas (**Figura 5**): una línea celular de macrófagos de ratón (RAW 264.7, ATCC TIB-71); una línea celular de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa, ATCC CCL.2TM); y una línea celular de carcinoma de pulmón humano (A549, ATCC CCL-185). Las líneas HeLa y RAW se mantuvieron disueltas en DMSO en crioviales en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización, mientras que la línea A549 se conservó de la misma forma a -80°C .

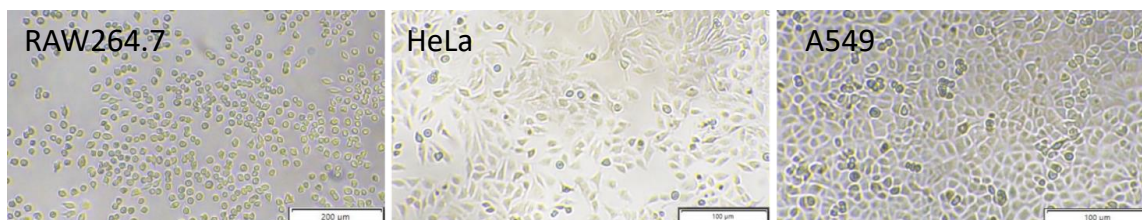


Figura 5. Imágenes de microscopía óptica (10X; barra=100 µm en HeLa y A549 y 5X; barra=200 µm en RAW264.7) de las líneas celulares utilizadas en los ensayos.

3.2.1. Descongelación de las líneas celulares

Para la descongelación de las distintas líneas, se tomaron en primer lugar 10 mL de medio de cultivo previamente atemperado a 37°C en un baño termostatzado. Posteriormente se añadió 1 mL de este medio a cada criovial, resuspendiendo varias veces con la pipeta hasta fundir todo el hielo. Conseguido esto, se añadió el resto del volumen de medio y se transfirió el contenido de cada criovial a un tubo Falcon de 15 mL que se centrifugó a 1650 rpm, durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar el DMSO necesario para la congelación de las muestras. Tras retirar el sobrenadante se resuspendió el *pellet* en 5 mL de medio fresco y se transfirió a frascos de cultivo con tapón ventilado (*Thermo Scientific™ Nunc™ EasYFlask™, ThermoFisher Scientific*) de 75 cm^2 en el caso de las líneas HeLa y RAW 264.7 y de 25 cm^2 en el de la línea A549, a los que posteriormente se adicionó medio hasta obtener 12 mL en el caso de los frascos de 75 cm^2 y 7 mL en el de 25 cm^2 . Las líneas

celulares se mantuvieron en incubación en un incubador Fisherbrand de atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

3.2.2. Mantenimiento de las líneas celulares

Para el mantenimiento de las líneas celulares HeLa y RAW 264.7 se utilizó un medio esencial mínimo (MEM, *Gibco-ThermoFisher Scientific*) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, *Gibco-ThermoFisher Scientific*) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/E) (medio MEM completo). Para la línea celular A549 se empleó medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, *Gibco-ThermoFisher Scientific*) alto en glucosa, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, *Gibco-ThermoFisher Scientific*) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/E) (medio DMEM completo). Estos medios se conservaron en nevera y antes de su utilización se atemperaron a 37°C en un baño termostatzado.

El cambio de medio de los cultivos de células se realizó cada 2-3 días. Para ello, se retiró el medio de los frascos y se realizó un lavado con 10 mL de PBS (Tampón fosfato salino de pH 7.4, *Gibco-ThermoFisher Scientific*) durante un minuto. Tras la retirada del PBS se añadieron 12 mL de medio nuevo y se devolvieron las células al incubador. En el caso de que la confluencia del frasco superara el 80-90% (comprobándolo al microscopio) se realizó un pase de las células.

Para la realización de los pases celulares se retiró el medio de cultivo de los frascos y se realizó un lavado previo de las monocapas de células con 10 mL de PBS. Tras su retirada, se añadieron 5 mL de tripsina-EDTA 1X que es el agente encargado de despegar las células del frasco mediante una digestión enzimática. El cultivo con la tripsina se incubó durante 5 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se comprobó mediante observación al microscopio que las células se encontraran en suspensión. Una vez despegadas, se añadieron 10 mL de medio suplementado para inactivar la tripsina y evitar el daño de las células. La suspensión celular se trasvasó a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 1600 rpm y 21°C obteniéndose un *pellet* de las células. Tras retirar el sobrenadante se resuspendió el *pellet* en 10 mL de medio celular y se realizó una estimación de la densidad celular mediante el uso de una cámara de Neubauer. Conocida la densidad de células, se calculó el volumen de suspensión celular necesario para realizar el pase de 100000-200000 células en el caso de las líneas RAW y HeLa, llevando el volumen a un nuevo frasco de cultivo y añadiendo medio hasta tener 12 mL. Para la línea A549 se dividió el total de volumen en dos frascos distintos, añadiendo medio completo hasta tener 7 mL en cada uno de ellos.

3.3. Conteo en cámara de Neubauer

La estimación de la densidad celular se realizó mediante el conteo de células en una cámara de Neubauer. Esta cámara consiste en un portaobjetos que presenta dos hendiduras con una cuadrícula

que permite realizar el conteo de células en una superficie determinada. Para preparar la muestra se tomaron 10 μL de la suspensión celular y se llevaron a un tubo Eppendorf. Posteriormente, se adicionaron 10 μL de azul tripán CorningTM (*Fisher Scientific*), un colorante que permite distinguir células viables de las células muertas, debido a la capacidad del mismo de atravesar únicamente la membrana de las células dañadas tiñendo de azul las células muertas. Finalmente se añadió la mezcla resultante (10 μL) en cada una de las hendiduras de la cámara, permitiendo realizar dos conteos de cada muestra. La estimación de la densidad se realizó mediante el conteo de las 4 cuadrículas adyacentes a la zona central marcada. Sabiendo que el área de cada cuadrícula es de 1 mm^2 que la distancia entre el cubreobjetos y la cámara es de 0.1 mm^2 , podemos conocer el número de células viables por unidad de volumen a partir de la **Ecuación 1**:

$$\text{células/ml} = \frac{n^{\circ} \text{células}}{4} 2 \times 10^4$$

Ecuación 1. Cálculo de la densidad celular.

3.4. Preparación de los compuestos del estudio

Los estudios se llevaron a cabo con cuatro compuestos distintos (**Figura 6**), dos de ellos contienen una unidad de viológeno (sales disustituidas de *N,N'*-4,4'-bipiridinio) y los dos restantes presentan un enlace hidrazona entre ambos anillos de piridinio. El Paraquat (**P**, *N,N'*-4,4' dimetilviológeno) es un herbicida ampliamente utilizado que presenta una elevada mortalidad en humanos. **PTPP** es un compuesto derivado del Paraquat al que se le acopló un transportador mitocondrial actuando como modelo de sonda moduladora de ROS. **H** es un compuesto de estructura semejante al Paraquat en la que existe un enlace hidrazona entre ambos anillos de piridina, modificando la capacidad de producción de ROS. El último compuesto, **HTPP**, surge de la unión del vector mitocondrial a la fracción bioactiva del compuesto **H**.

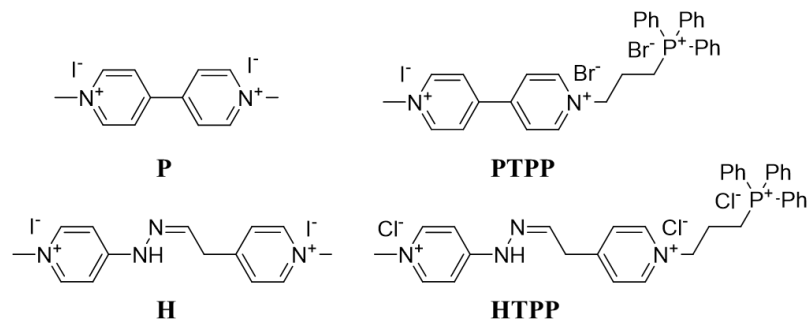


Figura 6. Estructura de las moléculas de estudio.

De cada uno de los compuestos de estudio se preparó una disolución madre 10 mM en 1.5 mL de PBS. A partir de esta disolución se prepararon diluciones de 1 mL a concentraciones de 5 mM, 1 mM, 0.5 mM y 0.1 mM.

3.5. Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular

Para la evaluación de la citotoxicidad de los compuestos estudiados se realizaron dos tipos de ensayos, el primero de ellos consiste en un ensayo colorimétrico de cuantificación espectrofotométrica mediante la adición del reactivo WST-1, el segundo en la cuantificación del ATP intracelular mediante medidas de luminiscencia.

3.5.1. Ensayo WST-1

El reactivo de proliferación celular WST-1 de la casa comercial Roche¹² contiene una sal de tetrazolio (WST-1) y un reactivo de acoplamiento de electrones diluidos en una solución salina tamponada con fosfato. La sal de tetrazolio se transforma en formazán por la acción de enzimas celulares en presencia de NADH. A mayor viabilidad celular se produce una mayor actividad metabólica que lleva a la formación de una mayor cantidad de formazán, el cual otorga un color rojizo al cultivo celular.¹²

La absorbancia de las muestras es proporcional a la cantidad de formazán en el medio y, por lo tanto, a la viabilidad celular. Para calcular esta última se dividió cada valor de absorbancia entre el valor medio obtenido para el control negativo de células sin tratar y se multiplicó por 100 (**Ecuación 2**). De esta forma se calculó el porcentaje de viabilidad en presencia de las diferentes concentraciones de cada compuesto asumiendo una viabilidad del 100% en el control negativo.

$$\%Viabilidad\ celular = \left(\frac{Absorbancia\ muestra}{Media\ Absorbancia\ control\ negativo} \right) \cdot 100$$

Ecuación 2. Cálculo de la viabilidad celular a partir de medidas de absorbancia.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos CorningTM (Fisher Scientific) En cada pocillo se sembraron 10000 células en un volumen total de 100 μ L. Se realizaron triplicados de cada concentración de los compuestos que se ensayaron en 2 experimentos independientes para obtener un mayor número de datos y comprobar la reproducibilidad del estudio.

Para realizar el sembrado de las células en la placa de 96 pocillos, se calculó previamente la densidad celular utilizando el mismo procedimiento descrito en la *sección 3.3*. Este cálculo se hizo del modo explicado anteriormente para el pase celular. Conocida la densidad celular de la muestra, se preparó una suspensión celular de 100000 cel/ml en un volumen total suficiente para sembrar 100 μ L en cada pocillo.

Una vez sembradas las células, se incubó la placa durante 24h, tiempo tras el cual se añadieron los compuestos a ensayar. Antes de su adición, se retiró el medio de los pocillos y se realizó un lavado previo de los mismos con medio completo de cultivo (100 μ L) antes de añadir medio nuevo (90 μ L). A continuación, se añadieron 10 μ L de los compuestos obteniendo una dilución final 1/10 de los

mismos con respecto a las disoluciones preparadas. En los controles negativos se adicionaron 10 μL de PBS. Las placas fueron incubadas durante 24h a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación comenzó el ensayo propiamente dicho. Para ello se retiró el medio con los compuestos y se realizó un lavado con 100 μL de medio MEM (DMEM en caso de la línea A549) sin suplementar. Tras retirar de nuevo el medio se añadieron otros 100 μL de medio sin suplementar y 10 μL del reactivo WST-1. La placa con el reactivo se incubó durante 2h, realizando medidas cada 30 minutos. Las medidas de absorbancia se realizaron en un lector espectrofotométrico de placas SinergyHTX a 450 nm.

3.5.2. Medida de la producción de ATP

La cantidad de ATP que presentan las células nos da información del estado metabólico de las mismas, de modo que, si las células se encuentran dañadas, en apoptosis o en necrosis, la producción de ATP disminuirá.

El ensayo se basa en la capacidad del ATP de producir una señal luminiscente a partir de D-luciferina en presencia de la enzima luciferasa, por lo que, a partir de las medidas de luminiscencia se puede conocer la cantidad de ATP.

Para la realización de este ensayo, se utilizó una placa blanca de 96 pocillos para luminiscencia Corning™ (*Fisher Scientific*). Como en el caso anterior, se sembraron 100 μL con 10000 células en cada pocillo y se incubaron durante 24h. En este ensayo solo se estudió el efecto de los compuestos en la producción de ATP a una concentración de 0.5 mM, elegida por ser una concentración intermedia en la que se observaron bien los efectos citotóxicos de los compuestos. La adición de estos se realizó de la misma forma que en el ensayo WST-1 y las placas fueron incubadas durante 24h a 37°C.

Transcurridas 24h se realizó el ensayo mediante el uso de un kit de cuantificación de ATP de la casa comercial Sigma-Aldrich.¹³ Para ello, se retiró el medio de los pocillos y se añadieron 90 μL del reactivo ATP, previamente preparado siguiendo las instrucciones del fabricante mediante la mezcla de 95 μL de tampón de ensayo, 1 μL de sustrato, 1 μL de cosustrato y 1 μL de enzima ATP en cada pocillo. La adición del reactivo se realizó utilizando una pipeta multicanal para disminuir los tiempos de espera. Una vez añadido el reactivo, la placa se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, tiempo tras el cual, se midió la luminiscencia en el lector de placas.

3.6. Ensayo de medida de ROS

El último ensayo realizado consistió en la medida de las ROS citosólicas a partir de un kit fluorimétrico de ROS intracelular de la casa comercial Sigma-Aldrich.¹⁴ Este ensayo se basa en la

capacidad de las ROS de reaccionar con un sensor fluorogénico localizado en el citoplasma, dando un producto fluorimétrico proporcional a la cantidad de ROS presente en el citosol.

Para la realización de este ensayo se utilizó una placa negra de 96 pocillos para fluorescencia Corning™ (*Fisher Scientific*) en la que se sembraron 10000 células en 100 μL de medio y se incubaron durante 24h. Pasado este tiempo, se añadieron 100 μL de una mezcla de 10 mL del tampón de ensayo y 20 μL de la disolución del reactivo de detección de ROS, previamente reconstituido con 40 μL de DMSO. La placa se incubó durante una hora, tiempo tras el cual se añadieron los compuestos. Como en el ensayo anterior, solo se estudiaron los compuestos a una concentración de 0.5 mM. Para el ensayo de ROS siguiendo las instrucciones del fabricante se adicionaron 20 μL de los compuestos a una concentración 11 veces superior a la de estudio (5.5 mM), preparada a partir de la disolución madre 10 mM. En el caso de los controles, se añadieron 20 μL de PBS. La placa se incubó a 37°C y se realizaron medias de fluorescencia a lo largo del tiempo (1, 2, 6 y 24 horas) a λ_{ex} 490 nm y λ_{em} 520 nm.

3.7. Uso de métodos estadísticos para el análisis de los resultados

Los resultados obtenidos en los distintos ensayos fueron sometidos a un análisis estadístico. Para ello, se comprobó la normalidad de los datos mediante un el test de Shapiro-Wilk a un nivel de significación del 5%. Posteriormente, se realizó un test de detección de datos atípicos, el test de Grubbs, a cada serie de replicados. Una vez eliminados estos valores, se calcularon las medias de la viabilidad, producción de ATP y producción de ROS citosólicas para cada medida, acompañando estos valores de su desviación estándar.

Por último, para comparar los distintos grupos de estudio entre sí se realizó el test t de Student a un nivel de confianza 95% para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Un p-valor (p) < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. El software utilizado para el tratamiento de datos fue el Excel.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de la viabilidad celular en presencia de los compuestos estudiados

Los resultados de viabilidad celular obtenidos en la línea celular RAW 264.7 (**Figura 7**) revelaron que los compuestos que presentan un enlace hidrazona en su estructura (**H**, **HTPP**) presentaron una citotoxicidad reducida a todas de las concentraciones de estudio. Así, la viabilidad celular en presencia de bajas concentraciones (0.01 - 0.5 mM) de estos compuestos fue en torno al 85-100%, mientras que a la concentración más elevadas (1 mM) fue próxima al 75%. En el caso de **H**, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre su concentración más baja y la más elevada ($p > 0.05$), mientras que para **HTPP** las diferencias si fueron significativas ($p < 0.05$).

En el caso de **P** y **PTTP** la viabilidad presentó una clara dependencia de la concentración de cada compuesto. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se observó una reducción de la viabilidad con el incremento de la concentración de **P** en esta misma línea celular de macrófagos.¹⁷ Estos estudios fueron realizados con concentraciones de Paraquat entre 0.05 y 0.2 mM observándose una reducción de la viabilidad al 50% a una concentración de **P** de 0.1 mM, concordando por tanto con las observaciones del presente estudio.

Cabe destacar que si bien los compuestos **P** y **PTTP** promovieron valores de viabilidad semejantes a los obtenidos con sus análogos con enlace hidrazona (**H** y **HTPP**) a la concentración más baja de compuesto (0.01 mM) ($p > 0.05$), estos promovieron un descenso mucho más acusado de la misma a partir de la concentración de 0.1 mM, viéndose drásticamente reducida (viabilidad celular ~15%) a las concentraciones más elevadas (0.5 y 1 mM) ($p < 0.05$). Estos resultados indican que **P** y **PTTP** presentan un carácter citotóxico mucho mayor que **H** y **HTPP** en la línea de macrófagos RAW 264.7.

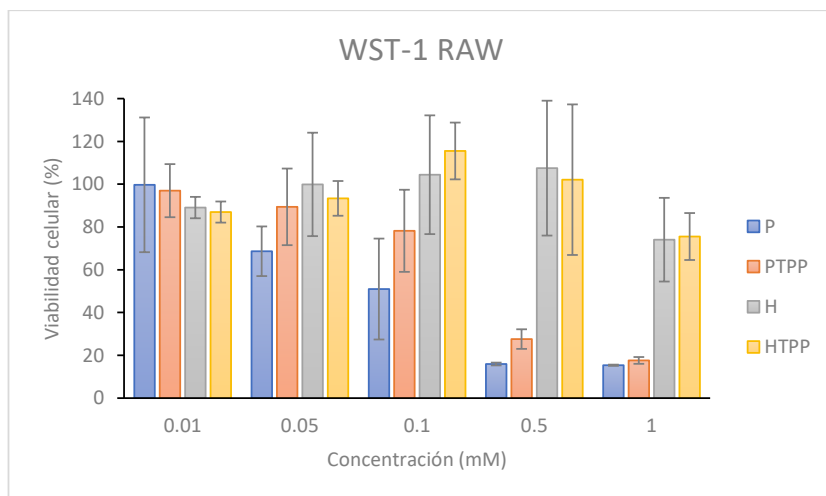


Figura 7. Ensayo de viabilidad de la línea RAW264.7 con distintas concentraciones de los compuestos estudiados.

Al relacionar estos resultados con su estructura, podemos inferir que en contraposición a lo observado con **P** y **PTPP**, la presencia del enlace hidrazona entre ambos anillos (**H** y **HTPP**) parece promover una disminución de su citotoxicidad en esta línea de macrófagos. Asimismo, la presencia del transportador mitocondrial en estos compuestos (**HTPP**) no parece potenciar su efecto citotóxico.

Al estudiar el efecto de los compuestos en la línea celular HeLa (**Figura 8**) se obtuvo una tendencia distinta a la observada en la línea no tumoral. Así, los valores de supervivencia celular en presencia de los distintos compuestos fueron, en general, superiores a los obtenidos en el caso anterior, debido probablemente al carácter tumoral de la línea HeLa lo que le confiere una mayor resistencia a la citotoxicidad inducida por los mismos. En cuanto al efecto de los compuestos, **P** y **H** promovieron un mayor descenso de viabilidad (66%, 56% respectivamente a una concentración de 1 mM) que sus análogos dirigidos a la mitocondria. Cuando se compararon ambos compuestos, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el perfil citotóxico de los mismos a dos de las concentraciones más elevadas de compuesto (0.1 y 1 mM), si bien no se observaron diferencias al resto de concentraciones (0.01, 0.05, 0.5 mM) ($p > 0.05$).

En contra, los compuestos conteniendo el transportador mitocondrial (**PTPP** y **HTPP**) fueron altamente citocompatibles a todas las concentraciones ensayadas, dando lugar a una ligera reducción de los valores de viabilidad en torno al 20% y 5% a la concentración más elevada (1 mM), observándose diferencias significativas entre ambos valores ($p < 0.05$).

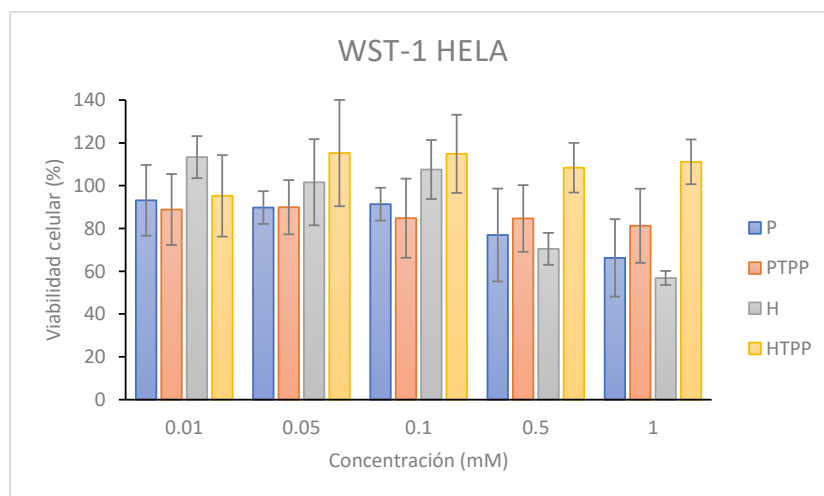


Figura 8. Ensayo de viabilidad de la línea HeLa con distintas concentraciones de los compuestos estudiados.

Estas observaciones parecen evidenciar que el perfil citotóxico del compuesto **H** es distinto en la línea celular no tumoral de macrófagos que en la línea celular de carcinoma HeLa. De este modo **H**

promovió valores elevados de viabilidad en la línea RAW incluso a la concentración más alta ensayada (75%), mostrando una citotoxicidad mucho más elevada del mismo en la línea celular HeLa (viabilidad celular 56%). Cabe destacar que la citotoxicidad de este compuesto no difirió estadísticamente de la del **P**; compuesto conocido por reducir la supervivencia celular de esta misma línea celular.^{15,16}

En la última línea celular ensayada, A549 (**Figura 9**), se observaron tendencias similares a las obtenidas en la línea celular HeLa, si bien la reducción de viabilidad en presencia de los compuestos **P** y **H** fue mucho más acusada (valores de viabilidad celular de 15% y 31%, respectivamente). **P** fue el compuesto más citotóxico dando lugar a viabilidades significativamente menores a las concentraciones 0.5 mM y 1 mM que aquellas obtenidas en presencia del compuesto **H** a estas mismas concentraciones ($p < 0.05$). En contra, los compuestos con el grupo trifenilfosfonio (**PTPP** y **HTPP**) dieron lugar a valores de supervivencia próximos al 100% a todas las concentraciones ensayadas.

La mayor reducción de la viabilidad de la línea A549 en presencia de los compuestos **P** y **H** podría deberse al diferente tipo celular de ambas líneas tumorales, siendo las HeLa células de adenocarcinoma de cuello de útero y las A549 de carcinoma de pulmón. En este sentido, diversos estudios han descrito que la elevada toxicidad del Paraquat afecta principalmente a las vías respiratorias, de ahí que la línea A549 sea una de las más empleadas para el estudio de la toxicidad de Paraquat¹⁸ De este modo, al igual que en el caso de **P**, cabría esperar que las células de pulmón presenten una mayor susceptibilidad a compuestos de esta índole.

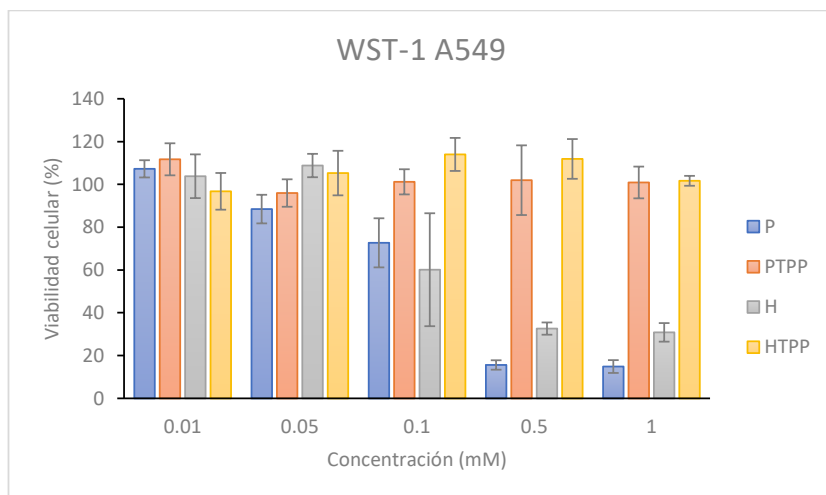


Figura 9. Ensayo de viabilidad de la línea A549 con distintas concentraciones de los compuestos estudiados.

De forma general el estudio preliminar de la viabilidad mostró diferencias claras entre el perfil citotóxico de los 4 compuestos ensayados. Así mientras **P** promovió la mayor citotoxicidad, **HTPP** fue el compuesto menos citotóxico. Por su parte el compuesto **PTPP** mostró una elevada toxicidad,

similar a la del Paraquat, en la línea no tumoral de macrófagos RAW, pero no en las líneas tumorales. Por último, el compuesto **H** mostró selectividad en su citotoxicidad generando un descenso elevado de la viabilidad únicamente en las líneas de carcinoma, por lo que lo convierte en un compuesto de gran interés como antitumoral, si bien se requieren más ensayos para elucidar su potencial y determinar su modo de actuación. Así pues, en estos ensayos adicionales se podrían añadir otras líneas no tumorales de origen humano (fibroblastos, por ejemplo) ya que la línea RAW, a pesar de ser una línea ampliamente utilizada en estudios de citotoxicidad,¹⁸ se trata de una línea celular de origen murino.

4.2. Medida de la producción de ATP

Con el fin de obtener más información del estado metabólico de las células en presencia de los distintos compuestos, se realizó además un ensayo de medida de la producción de ATP. Para la realización del estudio se utilizó únicamente la concentración 0.5 mM por ser la concentración intermedia en la que se observaron con mayor claridad las diferencias entre la actividad de los compuestos.

Los resultados obtenidos en la línea RAW (**Figura 10**) mostraron que, los 4 compuestos promovieron una disminución del ATP con respecto al control ($p < 0.05$). Asimismo, en concordancia con el ensayo de viabilidad celular la mayor disminución de ATP se produjo en presencia de **P**. En este sentido estudios previos han atribuido la reducción de ATP en presencia de **P** a su efecto represor de la actividad del complejo mitocondrial V.¹⁹

Del mismo modo y de acuerdo con lo observado en el ensayo WST-1, **PTPP** fue el segundo compuesto que provocó una mayor reducción del ATP. Finalmente, a pesar de que los compuestos **H** y **HPPP** dieron lugar a una disminución de la producción de ATP con respecto al control de células sin tratar ($p < 0.05$), esta reducción fue mucho menos acusada que la observada en los compuestos con una unidad de viológeno (**P** y **PTPP**) ($p < 0.05$). Cuando se comparó la reducción de ATP en presencia de los dos compuestos con enlace hidrazona (**H** y **HPPP**) y en contraste a lo observado en el ensayo WST-1, se constató una mayor reducción del mismo en presencia del compuesto conteniendo el transportador mitocondrial ($p < 0.05$). Las discrepancias observadas con respecto al ensayo WST-1 pueden deberse al diferente principio y sensibilidad de ambos ensayos. En este sentido, estudios previos han descrito una sobre-estimación del crecimiento celular en presencia de diferentes fármacos cuando se emplearon ensayos colorimétricos basados en reducción de sales de tetrazolio, en comparación con los ensayos basados en la medidas de luminiscencia para determinar la producción de ATP.²⁰

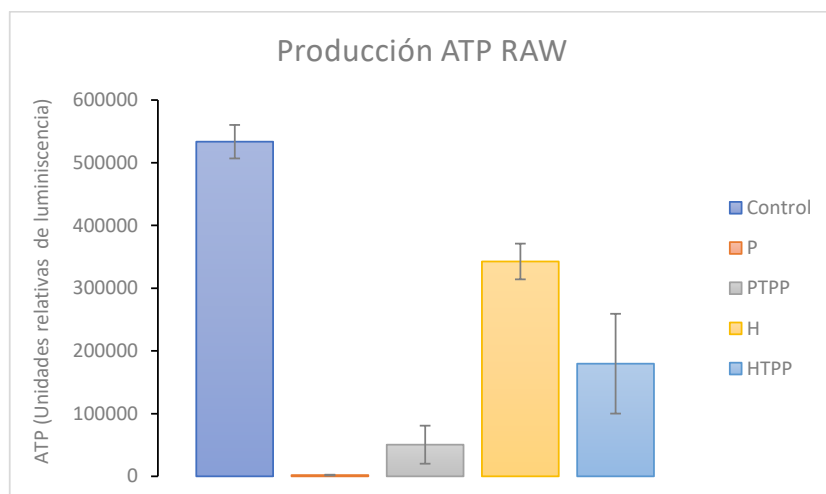


Figura 10. Producción de ATP en la línea RAW264.7 en presencia de los compuestos a una concentración de 0.5 mM. La medición de la producción de ATP en la línea celular HeLa (**Figura 11**), reveló nuevamente un descenso significativo del mismo en presencia de los compuestos **P**, **PTPP** y **H** ($p < 0.05$). En este caso, al tratarse de una línea de carcinoma, las diferencias no fueron tan notables como en la línea no tumoral, obteniendo una mayor disminución del ATP en presencia de los compuesto **H**, **P** y **PTPP**, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). De nuevo, estos resultados se corresponden con lo observado en el ensayo de viabilidad celular realizado en la línea celular Hela, a una concentración de compuesto de 0.5 mM. Asimismo, de acuerdo con su menor perfil citotóxico (**Figura 8**), **HTPP** promovió la menor reducción de la producción de ATP sin diferencias significativas con respecto al control ($p > 0.05$).

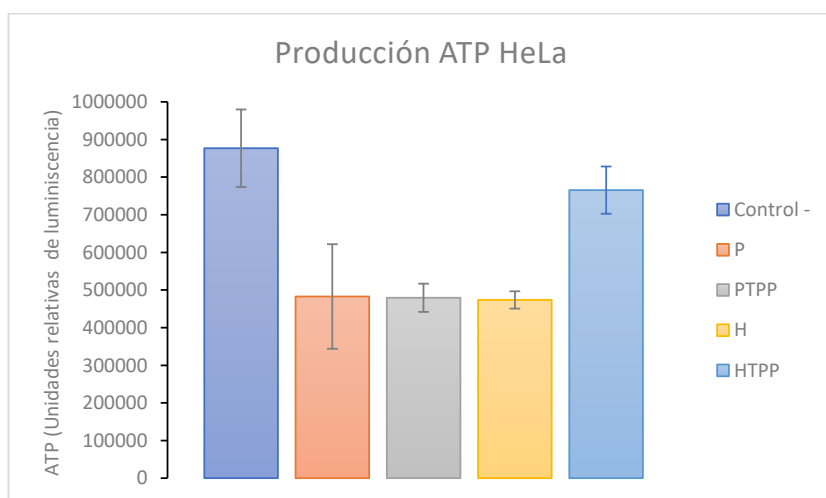


Figura 11. Producción de ATP en la línea HeLa en presencia de los compuestos a una concentración de 0.5 mM. Por último, en concordancia con los ensayos de viabilidad celular, los datos de la producción de ATP en la línea A549 (**Figura 12**), mostraron la mayor reducción de ATP en presencia de **P** ($p < 0.05$).

Estos resultados son consistentes con ensayos previos en los que se observó una drástica reducción de la producción ATP en esta misma línea celular en presencia de Paraquat.²¹ Del mismo modo, la incubación con los compuestos **PTPP** y **H** dio lugar a una disminución estadísticamente significativa de la producción de ATP ($p < 0.05$), mientras que **HTPP** no mostró diferencias con respecto al control de células sin tratar ($p > 0.05$).

El resultado más llamativo de este estudio fue que el compuesto **H** no produjo el descenso de ATP esperado, dado la elevada citotoxicidad observada en el ensayo de viabilidad (**Figura 9**). En este sentido y a falta de estudios previos en la bibliografía con las que contrastar estas observaciones, se requieren más investigaciones para dilucidar el mecanismo responsable del efecto citotóxico de este compuesto.

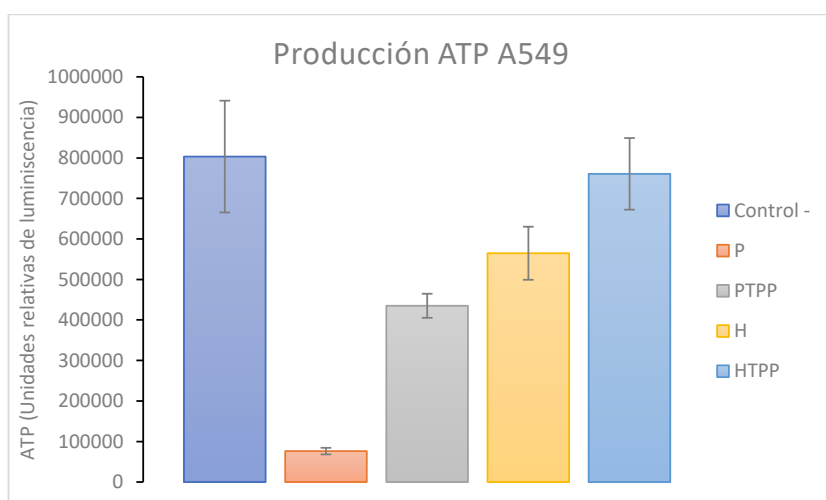


Figura 12. Producción de ATP en la línea A549 en presencia de los compuestos a una concentración de 0.5 mM.

De forma general, se puede comprobar que los resultados obtenidos en las medidas de la producción de ATP no se corresponden completamente con los obtenidos en el ensayo WST-1. De este modo sería necesario repetir los ensayos de medida de ATP con un mayor número de réplicas para comprobar su reproducibilidad y poder extraer conclusiones más precisas. Asimismo, la disparidad entre los resultados de ambos ensayos parece indicar que el mecanismo de descenso de la viabilidad de la molécula **H**, con un enlace hidrazona en su estructura, no se corresponde con el conocido para **P**.

4.3. Estudio de la generación de ROS citosólicas

Finalmente, con el fin de indagar en la inducción de la generación de ROS por los diferentes compuestos se realizó un ensayo de medición intracelular de estas especies reactivas (**Figura 13**). Los resultados obtenidos mostraron que **H** fue el compuesto que llevó a la mayor producción de ROS, especialmente en las líneas RAW264.7 y A549 (**Figura 13 A, C**).

Analizando cada línea celular por separado se observó que en la línea RAW el compuesto **H** incremento significativamente la producción de ROS, con respecto al control negativo de células sin tratar, a todos los puntos de tiempo ($p < 0.05$) (**Figura 13 A**). Asimismo, se observó que los compuestos **P** y **PTPP** llevaron también en un incremento de la producción de ROS, si bien su efecto fue más retardado en el tiempo, observándose un aumento significativo de su producción con respecto al control negativo sólo tras 24h de incubación ($p < 0.05$). En contra, **HTPP** no produjo un incremento significativo de la producción de ROS ($p > 0.05$) a ninguno de los tiempos estudiados.

Cuando se comparó la producción de ROS promovida por el compuesto **H** con la obtenida con los compuestos de la familia del Paraquat (**P**, **PTPP**) tras 24h de incubación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con **P** ($p > 0.05$) pero sí con **PTPP**, que presentó valores mucho menores que los obtenidos con **H** ($p < 0.05$). Estudios previos han descrito que el daño oxidativo responsable de la toxicidad de **P** y derivados como el **PTPP** se produce a nivel mitocondrial, llevando la activación de la caspasa-3 y a la inducción de la apoptosis.^{11,17} De este modo, si la inducción de la producción de especies reactivas ocurre preferentemente a nivel mitocondrial y el principio del presente ensayo se basa en la cuantificación de la producción de ROS en el citosol celular, esto podría explicar la reducida producción de ROS en presencia de estos compuestos en comparación con **H**.

Al estudiar el efecto de los compuestos en la línea HeLa (**Figura 13 B**) se encontraron diferencias significativas con respecto al control con todos los compuestos tras 24h de incubación ($p < 0.05$) si bien, el aumento de ROS citosólicas fue mucho menor al observado en la línea RAW. Esto podría deberse a una menor sensibilidad de esta línea celular al estrés oxidativo producida por los compuestos tal y como se ha descrito previamente con la exposición a **P** en una línea de neuroblastoma (SH-SY5Y).²² En cuanto al tiempo requerido para promover la producción de ROS citosólicas, se encontró que **H** elevó los niveles de ROS de manera significativa desde la primera hora de incubación ($p < 0.05$) al igual que **PTPP** ($p < 0.05$), mientras que **HTPP** y **P** solo mostraron diferencias significativas a partir de las 6 ($p < 0.05$) y 24 horas de incubación ($p < 0.05$), respectivamente.

Finalmente, en la línea celular A549 (**Figura 13 C**), se observó que la incubación con los compuestos **H** y **PTPP**, resultó en un aumento significativo de la producción de ROS con respecto al control, a todos los puntos de tiempo ensayados ($p < 0.05$). **HTPP** aumentó la producción a partir de las 6h de incubación ($p < 0.05$). y **P**, únicamente tras 24h de incubación ($p < 0.05$). La producción de ROS en presencia de **H** fue superior a la obtenida para el resto de los compuestos ($p < 0.05$).

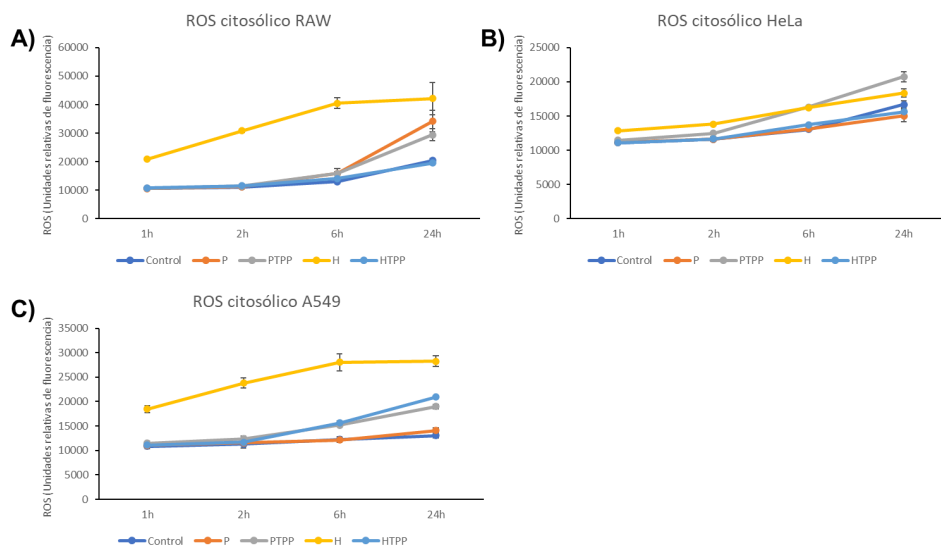


Figura 13. Medida de la producción de ROS citosólicas a lo largo del tiempo en las distintas líneas celulares (A: RAW264.7, B: HeLa, C: A549) en presencia de los compuestos a una concentración de 0.5 mM.

Estos resultados parecen indicar la existencia de distintos efectos del compuesto **H** sobre la producción de ROS y/o citotoxicidad en la línea no tumoral RAW y en la línea de cáncer de pulmón (A549). Así, si bien **H** produjo niveles comparables de ROS en ambas líneas, sólo resultó citotóxico en la línea tumoral de pulmón. Estas observaciones apuntan a que al menos en la línea de macrófagos, el efecto citotóxico de **H** no está correlacionado directamente con la generación de ROS. En este sentido, aunque la capacidad de producción de ROS de las moléculas con la unidad del viológeno (**P** y **PTPP**) ocurra de manera catalítica y preferentemente a nivel mitocondrial,^{22,23} se desconoce el mecanismo de actuación de las moléculas con enlace hidrazona como **H** y **HTPP**, si bien estudios preliminares parecen indicar que, la generación de ROS sería de forma irreversible o indirecta.

Dado que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel doble en una variedad de condiciones fisiológicas normales y patológicas,²⁴ se requieren más estudios para poder concluir el modo de actuación de estos compuestos. Así, futuras investigaciones podrían encaminarse al estudio de los mecanismos de apoptosis en las distintas líneas en presencia de estos compuestos o a la medida de la producción de ROS global de la célula. Este último estudio podría realizarse mediante la adición de los reactivos Dihidroetidio (DHE), MitoSOX Red y CM-H₂DCFDA (diacetato de 5-(y 6)-clorometil-2',7'-diclorohidrofluoresceína). Estos tres reactivos dan una visión global de la producción de ROS citosólicas y mitocondriales al formar productos fluorescentes con las especies reactivas.²⁵

Tomados en su conjunto los resultados del presente trabajo sugieren que si bien es necesario realizar más estudios para comprender su mecanismo de actuación, el compuesto **H** podría ser un compuesto con potencial antitumoral debido a su selectividad en inducir la muerte celular de las células tumorales reduciendo su producción de ATP e incrementando la producción de ROS en las mismas.

5. CONCLUSIONES

Las sondas mitocondriales reguladoras de ROS son una herramienta de gran utilidad para ampliar el conocimiento sobre el metabolismo mitocondrial y el papel del daño oxidativo producido por estas especies. En el presente trabajo se ha realizado un estudio preliminar de la actividad de distintos compuestos derivados del viológeno en distintas líneas celulares (RAW264.7, HeLa, A549). Las conclusiones que se pueden extraer de este TFG son las siguientes:

1. El Paraquat (**P**) fue el compuesto que presentó la citotoxicidad más elevada en las líneas de macrófagos (RAW264.7) y carcinoma de pulmón (A549), mientras que su análogo con transportador mitocondrial (**PTPP**) solo resultó citotóxico en la primera de ellas. En contra, **H** presentó el comportamiento contrario mostrando citotoxicidad únicamente en células tumorales. Por otra parte, **HTPP** no mostró grandes diferencias de viabilidad con respecto al control en ninguna de las líneas celulares ensayadas.
2. Todos los compuestos ensayados excepto **HTPP** dieron lugar a una reducción de la producción de ATP con respecto al control de células sin tratar en las 3 líneas celulares. La reducción del ATP por parte de **H** en la línea A549 fue menor a lo esperado lo que parece sugerir que el mecanismo de este compuesto para reducir la viabilidad no se corresponde con el conocido para los compuestos con una unidad de viológeno como el Paraquat. Se requiere pues la realización de más réplicas de este ensayo para confirmar este resultado.
3. Todos los compuestos ensayados promovieron, en mayor o menor medida, la producción de ROS en las líneas celulares estudiadas. La mayor inducción en la producción de ROS fue observada por el compuesto **H** en las líneas celulares RAW264.7 y A549. En estas mismas líneas, el menor efecto inductor fue observado en presencia del **P** lo que puede ser atribuido al propio principio del ensayo (medida de ROS citosólicas). Se requieren por tanto más estudios implicando la utilización de sondas mitocondriales para tener una visión global de todas las especies reactivas producidas en la célula.
4. Entre las líneas celulares utilizadas, la línea tumoral HeLa presentó una mayor resistencia a al efecto citotóxico de los compuestos y al estrés oxidativo inducido por los mismos. En contra la línea A549 presentó una elevada susceptibilidad a los mismos.

CONCLUSIÓN

As sondas mitocondriais reguladoras de ROS son unha ferramenta de gran utilidade para ampliar o coñecemento do metabolismo mitocondrial e o papel do dano oxidativo producido por estas especies. Neste traballo realizáronse estudos preliminares da actividade dos distintos compostos derivados do violóxeno nas distintas liñas celulares (RAW264.7, HeLa, A549). As conclusións que se poden extraer deste TFG son as seguintes:

1. O Paraquat (**P**) foi o composto que presentou a maior citotoxicidade nas liñas de macrófagos (RAW264.7) e carcinoma de pulmón (A549), mentres que o seu análogo có transportador mitocondrial (**PTPP**) só foi citotóxico na primeira liña. Pola contra, **H** mostrou o comportamento contrario mostrando citotoxicidade únicamente nas células tumorais. Por outra parte, **HTPP** non mostrou grandes diferencias na viabilidade con respecto ao control en ningunha das liñas celulares estudadas.
2. Todos os compostos estudados agás **HTPP** deron lugar a unha redución da produción de ATP con respecto ao control negativo nas 3 liñas celulares. A redución do ATP debido a **H** na liña A549 foi menor á esperada o que parece suxerir que o mecanismo para reducir a viabilidade deste composto non se corresponde có coñecido para os compostos cunha unidade de violóxeno (coma **P**). Precísase pois a realización dun maior número de réplicas deste ensaio para confirmar estes resultados.
3. Todos os compostos estudados promoveron, en maior ou menor medida, a produción de ROS nas liñas celulares estudadas. A maior indución na produción de ROS foi observada polo composto **H** nas liñas celulares RAW264.7 e A549. Nestas mesmas liñas, o menor efecto indutor foi o observado en presenza de **P** o que se pode atribuír ao propio principio do ensaio (medición de ROS citosólicas). Polo tanto, é necesario realizar mais estudos implicando a utilización de sondas mitocondriais para ter unha visión global de todas as especies reactivas producidas na célula.
4. Entre as liñas celulares utilizadas, a liña tumoral HeLa presentou unha maior resistencia ao efecto citotóxico dos compostos e ao estrés oxidativo inducido polos mesmos. Pola contra, a liña A549 presentou unha elevada susceptibilidade aos mesmos.

CONCLUSIONS

ROS mitochondrial probes are a very useful tool to broaden knowledge about mitochondrial metabolism and the role of oxidative damage produced by these species. In the present work a preliminary study of the activity of different compounds derived from viologen has been carried out in different cell lines (RAW264.7, HeLa, A549). The conclusions that can be drawn from this TFG are the following:

1. Paraquat (**P**) was the compound that presented the highest cytotoxicity in macrophage (RAW264.7) and lung carcinoma (A549) cell lines, while its analog with a mitochondrial carrier (**PTPP**) was only cytotoxic in the first one. In contrast, **H** showed the opposite behavior reducing the viability only in tumor cells. Moreover, **HTPP** did not show great differences in viability when compared with the control in any of the cell lines tested.
2. All compounds tested except **HTPP** resulted in a reduction of ATP production relative to untreated cell control in the three tested cell lines. The reduction of ATP by **H** in A549 cell line was lower than expected, which seems to suggest that the mechanism of this compound to reduce viability does not correspond to that known for molecules with viologen moiety such as Paraquat. More replications of this assay are required to confirm this result.
3. All the compounds tested promoted, to a greater or lesser extent, the production of ROS in the cell lines studied. The greatest induction in ROS production was observed by **H** compound in RAW264.7 and A549 cell lines. In these same cell lines, the least inductive effect was observed in the presence of **P**, which can be attributed to the assay principle itself (measurement of cytosolic ROS). Therefore, more studies involving the use of mitochondrial probes are required to have a global view from all the reactive species produced in the cell.
4. Among the cell lines tested, HeLa cells exhibited the highest resistance to the cytotoxic effect and the oxidative stress induced by the compounds. Conversely, A549 cell line, showed the highest susceptibility to them.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cooper, G. M.; Hausman, R. E. *La Célula*, séptima edición.; 2017. Madrid
- (2) Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A. *Biología Celular y Molecular*, quinta edición; 2005. Madrid
- (3) Rigoulet M, Yoboue ED, Devin A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H(2)O(2) signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14: 459-68. doi: 10.1089/ars.2010.3363.
- (4) Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, Castoria G, Migliaccio A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med*. 2020; 52: 192-203. doi: 10.1038/s12276-020-0384-2.
- (5) Zielonka J, Joseph J, Sikora A, Hardy M, Ouari O, Vasquez-Vivar J, Cheng G, Lopez M, Kalyanaraman B. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem Rev*. 2017; 117: 10043-10120. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00042.
- (6) Kalyanaraman B, Cheng G, Hardy M, Ouari O, Bennett B, Zielonka J. Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox Biol*. 2018; 15: 347-362. doi: 10.1016/j.redox.2017.12.012.
- (7) Smith RA, Hartley RC, Murphy MP. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15: 3021-38. doi: 10.1089/ars.2011.3969.
- (8) Manetta A, Gamboa G, Nasser A, Podnos YD, Emma D, Dorion G, Rawlings L, Carpenter PM, Bustamante A, Patel J, Rideout D. Novel phosphonium salts display in vitro and in vivo cytotoxic activity against human ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol*. 1996; 60: 203-12. doi: 10.1006/gyno.1996.0026.
- (9) Zhang X, Huang Q, Zhao ZZ, Xu X, Li S, Yin H, Li L, Zhang J, Wang R. An Eco- and User-Friendly Herbicide. *J Agric Food Chem*. 2019; 67: 7783-7792. doi: 10.1021/acs.jafc.9b00764.
- (10) Robb EL, Gawel JM, Aksentijević D, Cochemé HM, Stewart TS, Shchepinova MM, Qiang H, Prime TA, Bright TP, James AM, Shattock MJ, Senn HM, Hartley RC, Murphy MP. Selective superoxide generation within mitochondria by the targeted redox cycler MitoParaquat. *Free Radic Biol Med*. 2015; 89: 883-94. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.021.
- (11) Xu Z, Xu L. Fluorescent probes for the selective detection of chemical species inside mitochondria. *Chem Commun*. 2016; 52: 1094-119. doi: 10.1039/c5cc09248e.
- (12) Roche. *Cell Proliferation Reagent WST-1*. 2018. Cat. No.: 11 644 807 001. Recuperado el 6 de septiembre de 2021 de <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/350/519/cellprobul.pdf>
- (13) Sigma-Aldrich. *ADP/ATP Ratio Assay Kit*. 2014. Cat. No.: MAK135. Recuperado el 6 de septiembre de 2021 de <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/135/374/mak135bul.pdf>.
- (14) Sigma-Aldrich. *Fluorometric Intracellular ROS Kit Green Fluorescence*. 2015 Cat. No.: MAK143. Recuperado el 6 de septiembre de 2021 de <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/327/026/mak143bul.pdf>

- (15) Jang YJ, Won JH, Back MJ, Fu Z, Jang JM, Ha HC, Hong S, Chang M, Kim DK. Paraquat Induces Apoptosis through a Mitochondria-Dependent Pathway in RAW264.7 Cells. *Biomol Ther.* 2015; 23: 407-13. doi: 10.4062/biomolther.2015.075.
- (16) Petrovská H, Dušinská M. Oxidative DNA damage in human cells induced by paraquat. *Altern Lab Anim.* 1999; 27: 387-95. doi: 10.1177/026119299902700314.
- (17) Hathaichoti S, Visitnonthachai D, Ngamsiri P, Niyomchan A, Tsogtbayar O, Wisessaowapak C, Watcharasit P, Satayavivad J. Paraquat induces extrinsic pathway of apoptosis in A549 cells by induction of DR5 and repression of anti-apoptotic proteins, DDX3 and GSK3 expression. *Toxicol In Vitro.* 2017; 42: 123-129. doi: 10.1016/j.tiv.2017.04.016.
- (18) Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, Rygiel T, Król M. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One.* 2018; 13: e0198943. doi: 10.1371/journal.pone.0198943.
- (19) Yang W, Tiffany-Castiglioni E. The bipyridyl herbicide paraquat induces proteasome dysfunction in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2007; 70: 1849-57. doi: 10.1080/15287390701459262.
- (20) Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol In Vitro.* 2008; 22: 232- 9. doi: 10.1016/j.tiv.2007.08.006.
- (21) He Y, Zou L, Zhou Y, Hu H, Yao R, Jiang Y, Lau WB, Yuan T, Huang W, Zeng Z, Cao Y. Adiponectin ameliorates the apoptotic effects of paraquat on alveolar type II cells via improvements in mitochondrial function. *Mol Med Rep.* 2016; 14: 746-52. doi: 10.3892/mmr.2016.5328.
- (22) Maracchioni A, Totaro A, Angelini DF, Di Penta A, Bernardi G, Carrì MT, Achsel T. Mitochondrial damage modulates alternative splicing in neuronal cells: implications for neurodegeneration. *J Neurochem.* 2007; 100: 142-53. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04204.x.
- (23) Castello PR, Drechsel DA, Patel M. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *J Biol Chem.* 2007; 282: 14186-93. doi: 10.1074/jbc.M700827200.
- (24) Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48: 749-62. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.
- (25) Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol.* 2014; 542: 243-62. doi: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3.