

## **Título: El agente anticancerígeno nemorosona, es un nuevo y potente desacoplador protonofórico mitocondrial.**

**Autores:** Gilberto L. Pardo-Andreu <sup>a,c,\*</sup> ([gilbertopardo@infomed.sld.cu](mailto:gilbertopardo@infomed.sld.cu)), Yanier Nuñez-Figueroa <sup>b</sup>, Valeria G. Tudella <sup>c</sup>, Osmany Cuesta-Rubio <sup>d</sup>, Fernando P. Rodrigues <sup>c</sup>, Cezar R. Pestana <sup>c</sup>, Sérgio A. Uyemura <sup>e</sup>, Andréia M. Leopoldino <sup>e</sup>, Luciane C. Alberici <sup>c</sup>, Carlos Curti <sup>c</sup>

### **Centro de procedencia:**

<sup>a</sup> Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, ave. 23 # 21425 e/ 214 and 222, La Coronela, La Lisa, CP 13600, Ciudad Habana, Cuba.

<sup>b</sup> Centro para las Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos, Ave 26, No. 1605 Boyeros y Puentes Grandes, CP 10600, Ciudad Habana, Cuba

<sup>c</sup> Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Química, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, ave. 23 # 21425 e/ 214 and 222, La Coronela, La Lisa, CP 13600, Ciudad Habana, Cuba

<sup>e</sup> Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

**Palabras claves:** Nemorosona, Mitocondria, Desacoplador, Protonóforo, HepG2 muerte celular, Cáncer.

## **PREMIO EN LA INSTANCIA NACIONAL DEL CONCURSO**

### **RESUMEN**

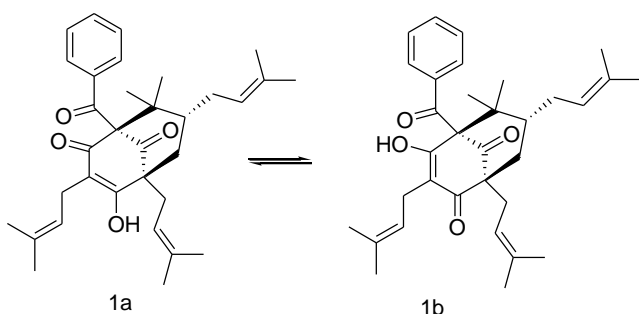
La nemorosona, un acilfloroglucinol policíclico y poliprenilado de origen natural, ha recibido una creciente atención por la comunidad científica internacional debido a su potente acción anticancerígena *in vitro*. En este trabajo se demuestra el efecto tóxico de la nemorosona (1-25  $\mu$ M) en la línea celular humana de cáncer hepático HepG2 por medio del ensayo de viabilidad del MTT, asociado a una disipación del potencial de membrana mitocondrial y una disminución de los niveles de ATP en este tipo celular. En mitocondrias aisladas a partir del hígado de ratas se demostró que la nemorosona (50-500 nM) mostró una potente actividad protonofórica desacopladora, comparable al desacoplador protonofórico clásico carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP). La nemorosona incrementó la velocidad de respiración en estado 4, disipó el potencial de membrana mitocondrial, estimuló la liberación de  $Ca^{2+}$  e inhibió su captación por el organelo, y redujo considerablemente sus niveles de ATP. La capacidad protonofórica de la nemorosona se demostró por medio de la inducción de hinchamiento mitocondrial en un medio hipo-osmótico suplementado con  $K^+$  y acetato, en presencia de valinomicina. Por otro lado, concentraciones desacopladoras de la nemorosona, en presencia de calcio y rojo de rutenio, indujeron un proceso conocido como transición de permeabilidad mitocondrial. Por tanto, se demuestra que la nemorosona es un potente desacoplador mitocondrial protonofórico, y esta propiedad está potencialmente involucrada en su toxicidad sobre las células cancerígenas.

### **1. Introducción:**

La nemorosona (1-benzoil-4-hidroxi-8,8-dimetil-3,5,7-tris(3-metil-2-butenil)-biciclo-[3.3.1]-non-3-ene-2,9-diona; un tautómero) (Fig. 1) es un acilfloroglucinol policíclico y poliprenilado de origen natural, componente mayoritario de la resina de la especie *Clusia* (~50%) y responsable de su actividad antimicrobiana (Ciochina and Grossman, 2006; de Oliveira et al., 1999). Se ha observado que el propóleo cubano marrón, cuyo componente principal es la nemorosona, ejerce una importante actividad antiproliferativa sobre las células humanas de cáncer de mama MCF-7 (Popolo et al., 2009). Por otro lado, la nemorosona aislada ejerce una importante acción citotóxica *in vitro* contra un amplio

rango de líneas celulares cancerígenas que incluyen mama, colon, cerebro, ovario, hígado, sangre y pulmón (Cuesta-Rubio et al., 2002; Diaz-Carballo et al., 2003; 2008a; 2008b). Específicamente, la toxicidad de la nemorosona sobre neuroblastomas y líneas celulares parentales de leucemia se ha asociado a su capacidad de modular los mecanismos transductores de señales dependientes de Akt/PKBr (Diaz-Carballo et al., 2008a; 2008b).

Eventos mitocondriales tales como la disipación del potencial de membrana, la generación de especies reactivas de oxígeno y la liberación de proteínas activadoras de caspasas, están muy vinculados a los mecanismos celulares de muerte por apoptosis y/o necrosis (Kroemer and Reed, 2000). Es por eso que aquellos compuestos lo suficientemente lipofílicos para acceder a las membranas mitocondriales, podrían inducir muerte celular mediada por mecanismos mitocondriales. En este sentido, es probable que la nemorosona cumpla con este criterio pues el valor teórico de su constante de reparto Log P, es de 8.3 y le brinda la capacidad de atravesar las membranas celulares y mitocondriales. En este contexto, hemos evaluado el potencial desacoplador de la nemorosona y su toxicidad sobre células cancerígenas. Los estudios se desarrollaron en una línea celular de carcinoma hepático (HepG2) y en mitocondrias aisladas a partir del hígado de ratas; la potencia desacopladora de la nemorosona se comparó con la del desacoplador protonofórico carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP). Los resultados demuestran que la nemorosona, además de ser citotóxica contra las células HepG2, es un potente desacoplador protonofórico mitocondrial.



**Fig. 1.** Estructura de la nemorosona (1-benzoil-4-hidroxi-8,8-dimetil-3,5,7-tris(3-metil-2-butenil)-biciclo-[3.3.1]-non-3-ene-2,9-diona; un tautómero).

## 2. Materiales y Métodos:

### 2.1. Compuestos y reactivos

Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Las soluciones se prepararon utilizando agua destilada y desionizada. Las soluciones de nemorosona se prepararon en dimetil sulfóxido (DMSO) y se utilizaron en los cultivos celulares o en los medios de reacción mitocondrial con una dilución de 1/1000 (v/v).

### 2.2. Obtención de la nemorosona

La nemorosona se extrajo de la resina floral de *C. rosea* según reporte previo (Cuesta-Rubio et al., 2001).

### 2.3. Cultivo de las células HepG2

Las células HepG2 se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC), No. HB 8065. Se cultivaron en medio Dulbecco suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 100 IU/ml penicilina G, 100 mg/ml estreptomycin y 1 µg/ml anfotericina.

#### 2.4. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad de las células HepG2, y HEK293T (ATCC), se evaluó por medio de un ensayo colorimétrico que emplea [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro] (MTT). Las células ( $2 \times 10^4$ ) se incubaron por 8h en placas de 96 pozos en ausencia (células controles) o presencia de nemorosona o CCCP en un volumen final de 200  $\mu$ l. La viabilidad celular se expresó como % en relación a las células no tratadas (control).

#### 2.5. Ensayo para determinar el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) en las células HepG2.

El potencial de membrana mitocondrial se estimó por medio de la retención celular del marcador catiónico fluorescente rodamina 123 (Lemasters et al., 1993; Nakagawa and Moore, 1999). Su concentración se determinó en el sobrenadante por medio de un espectrofotómetro de fluorescencia F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japan) a 505/535 nm (excitación/emisión). Los datos se expresan como por ciento de los valores de fluorescencia en relación a las células no tratadas (control).

#### 2.6. Determinación de ATP en las células HepG2.

El ATP celular se determina por medio del ensayo de la luciferina-luciferasa. Las células ( $6 \times 10^4$ ) se incubaron 1h en placas de cultivo de 24 pozos, en ausencia (control) o presencia de nemorosona (5-25  $\mu$ M) o CCCP (25  $\mu$ M). La bioluminiscencia se determinó en el sobrenadante con un kit analítico de Sigma-Aldrich, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, empleando un fotómetro de luminiscencia AutoLumat LB953 (Perkin-Elmer Life Sciences, Wilbad, Germany).

#### 2.7. Aislamiento de las mitocondrias de hígado de ratas.

Las mitocondrias se aislaron por el método clásico de centrifugación diferencial a partir del hígado de ratas Wistar machos (Pedersen et al., 1978).

#### 2.8. Procedimientos de incubación

Las mitocondrias se energizaron con 5 mM de succinato de potasio (más 2.5  $\mu$ M rotenona) en un medio de incubación estándar que contenía 125 mM de sacarosa, 65 mM KCl y 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4, a 30°C.

#### 2.9. Ensayos mitocondriales

La respiración mitocondrial se monitoreó polarográficamente por medio de un oxígrafo equipado con un electrodo tipo Clark (Hansatech instruments, oxytherm electrode unit, UK). El potencial de membrana mitocondrial se determinó espectrofluorimétricamente usando como marcador fluorescente la safranina O (10  $\mu$ M) (Zanotti and Azzone, 1980) en un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi, modelo F-4500 (Tokyo, Japan) a 495/586 nm (excitación/emisión). Estos experimentos se desarrollaron en presencia de 0.1 mM EGTA y 2 mM  $K_2HPO_4$ . La movilidad del  $Ca^{2+}$  se monitoreó espectrofluorimétricamente utilizando como marcador 150 nM de Calcium Green 5N (Molecular Probes, OR, USA) a 506/531 nm (excitación/emisión) (Rajdev and Reynolds, 1993). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se monitorearon espectrofluorimétricamente utilizando como marcador fluorescente 1  $\mu$ M Amplex red (Molecular Probes, OR, Eugene) y 1 UI/ml de peroxidasa de rábano a 563/587 nm (excitación/emisión) (Votyakova and Reynolds, 2001). La curva patrón obtenida por medio de la adición de cantidades conocidas de  $H_2O_2$  al medio de ensayo en presencia de los reactivos (ampless red y peroxidasa de rábano) mostró linealidad hasta 2  $\mu$ M. La pendiente asociada al incremento de la fluorescencia se convirtió en concentración de  $H_2O_2$  (10 unidades de fluorescencia representaron 80 pmol  $H_2O_2$ ). El hinchamiento mitocondrial se

estimó espectrofotométricamente a partir de la disminución de la absorbancia aparente a 540 nm, utilizando un espectrofotómetro Hitachi, Modelo U-2910 (Japón).

### 2.10. Determinación de ATP en la mitocondria

El ATP mitocondrial se determinó por medio del ensayo de la luciferina-luciferasa (Lemasters and Hackenbrock, 1976). La bioluminiscencia se determinó en el sobrenadante utilizando un kit analítico de Sigma/Aldrich, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se empleó un fotómetro de luminiscencia AutoLumat LB953 (Perkin-Elmer Life Sciences, Wilbad, Germany).

### 2.11. Ensayo de hinchamiento mitocondrial en medio hipo-osmótico con acetato de potasio

Las mitocondrias (0.45 mg proteína) se incubaron en un medio que contenía 54 mM de acetato de potasio, 5 mM HEPES-NaOH pH 7.1, 0.1 mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM azida de sodio, 0.1% albúmina sérica bovina, 15  $\mu$ M atractilósido, 1  $\mu$ M antimicina A, y 0.3 mM propanolol para inhibir los canales de aniones de la membrana interna mitocondrial. Luego se añadió 1  $\mu$ M de valinomicina y la nemorosona o el CCCP en un volumen final de 1.5 ml. El hinchamiento se determinó a partir de la disminución en la absorbancia a 540 nm (Mingatto et al., 2000; Nicholls, 1982).

### 2.12. Análisis estadístico

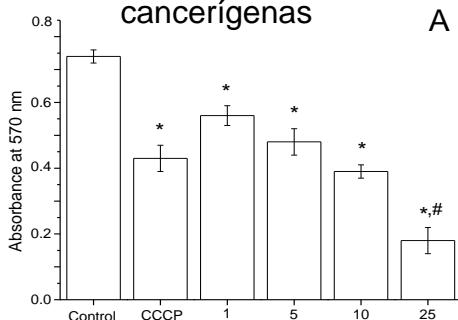
Se realizó un ANOVA de dos vías asumiendo igualdad de varianzas con el test post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples pareadas. Los resultados se presentan como medias  $\pm$  SEM. Los resultados con  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 3. Resultados:

### 3.1. Efectos de la nemorosona sobre la viabilidad, potencial de membrana mitocondrial y niveles de ATP en las células HepG2

La incubación de las células HepG2 con la nemorosona por 8h resultó en una disminución de la viabilidad celular, estimado por el ensayo del MTT (Fig. 2A). La nemorosona a 25  $\mu$ M indujo aproximadamente un 75% de muerte celular, un efecto casi dos veces más citotóxico que el mostrado por el desacoplador clásico CCCP. Por otro lado, se observó un efecto disipador del potencial de membrana mitocondrial, estimado por la retención mitocondrial de la rodamina 123, luego de 1h de incubación (Fig. 2B). El efecto fue dosis-dependiente, y la potencia de la nemorosona fue superior a la del CCCP. Se aprecia una evidente correlación entre este efecto y la disminución de la viabilidad celular (Fig. 2A), sugiriendo una relación causa-efecto entre ellos. También 1h de incubación con la nemorosona indujo una disminución de los niveles de ATP en las células, de manera dosis-dependiente (Fig. 2C), y con un patrón similar a la disipación del potencial de membrana mitocondrial y la disminución de la viabilidad celular.

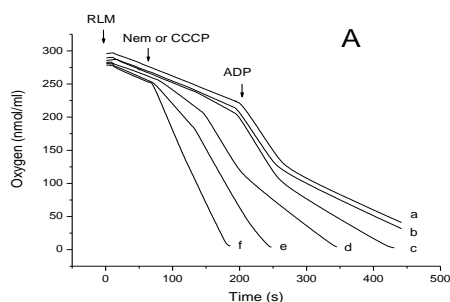
Resulta interesante el hecho de que a diferencia de las células HepG2, la exposición de las células embrionarias de riñón humano no cancerígenas HEK293T a 25  $\mu$ M de nemorosona resultó en un pobre efecto sobre la viabilidad celular (~10% de muerte) en comparación con el CCCP (~40 % de muerte), estimado por el ensayo del MTT (no se muestran los resultados), lo que abre nuevas perspectivas para futuros ensayos sobre la toxicidad de la nemorosona en diferentes líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas



**Fig. 2.** Efectos de la nemorosona o el CCCP sobre la viabilidad de las células HepG2 (A), potencial de membrana mitocondrial (B) y niveles de ATP (C). Las condiciones de ensayo se describen en Materiales y Métodos. Las barras representan las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes <sup>\*</sup>, # Diferencias significativas en relación al Control o CCCP, respectivamente, para  $P < 0.05$ .

### 3.2. Efectos de la nemorosona sobre la respiración de mitocondrias aisladas a partir del hígado de ratas

La figura 3A muestra efectos dosis dependiente de la nemorosona sobre la respiración mitocondrial. Las mitocondrias se incubaron con succinato (más rotenona), sustrato respiratorio del complejo II, seguido de la adición de ADP para iniciar la fosforilación (estado 3). Después que el ADP se consume para la síntesis de ATP, la respiración alcanza un estado basal (estado 4). La nemorosona a 50-500 nM indujo un marcado incremento en la velocidad de respiración en estado 4 ( $V_4$ ), comportándose como un potente desacoplador mitocondrial (ver también Fig. 3B). La nemorosona no disminuyó la velocidad de respiración en estado 3 ( $V_3$ ), indicando que no inhibe a los componentes de la cadena respiratoria, ni a la ATP sintasa (Fig. 3A and 3B); el ligero incremento observado en  $V_3$  probablemente refleja su potente efecto desacoplador. Como era de esperar, el efecto desacoplador resultó en una disminución dosis dependiente de la razón de control respiratorio (RCR, valor control de  $4.6 \pm 0.2$ ) (Fig. 3C). La razón ADP/O para las mitocondrias controles fue de  $1.70 \pm 0.26$ ; no fue posible evaluar los efectos de la nemorosona en este parámetro pues a concentraciones de 250-500 nM, las mitocondrias perdían su control respiratorio debido al marcado efecto desacoplador.

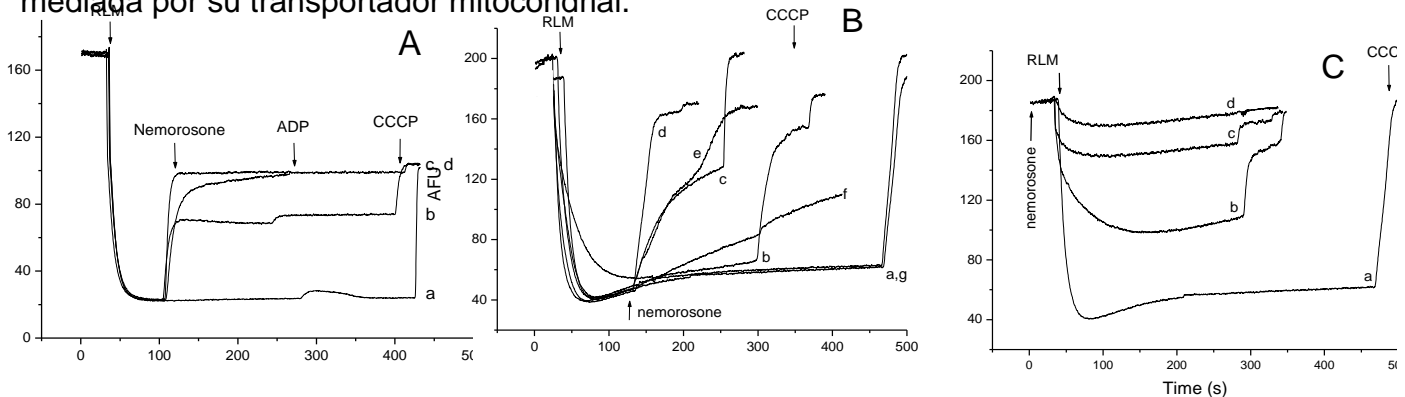


**Fig. 3.** Efectos de la nemorosona o el CCCP sobre la respiración de mitocondrias aisladas a partir del hígado de ratas (RLM) y energizadas con succinato. Trazos representativos (A), velocidades de respiración fosforilativa ( $V_3$ ) y basal ( $V_4$ ) (B), y razón de control respiratorio, RCR (C). RLM (0.5 mg proteínas/ml) se incubaron en ausencia (control) o presencia de nemorosona o CCCP en un medio estándar suplementado con 0.1 mM EGTA, y en las condiciones descritas en Materiales Métodos. Para la determinación de  $V_3$  se añadieron 100  $\mu$ M de ADP.  $V_4$  se determinó una vez consumido el ADP añadido. Las adiciones en el Panel A se indican con flechas. Las barras representan las medias  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). <sup>\*</sup> Diferencias significativas en relación al Control, para  $P < 0.05$ .

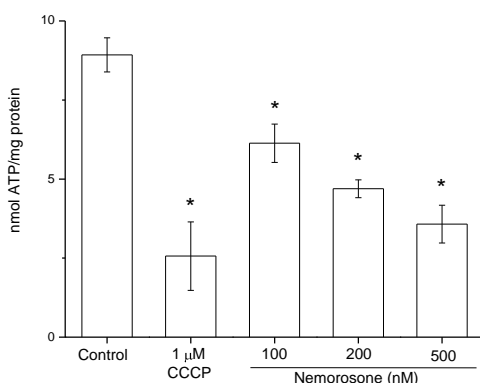
### 3.3. Efectos de la nemorosona sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) y la liberación de $Ca^{2+}$

La figura 4A muestra que la nemorosona promueve una disipación del potencial de membrana mitocondrial de forma dosis-dependiente, observándose el mayor efecto a 500

nM. Las unidades de fluorescencia (media  $\pm$  SEM a 250 s) fueron:  $23.10 \pm 4.71$  (línea a),  $72.28 \pm 5.13$  (línea b),  $96.21 \pm 6.46$  (línea c) and  $98.64 \pm 8.14$  (línea d). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la (línea a) y el resto de las líneas para  $P < 0.05$ . Esto es consistente con el incremento en  $V_4$  inducido por la nemorosona y refuerza su potente actividad desacopladora. En este sentido, la figura 4B muestra que la nemorosona indujo una liberación del  $Ca^{2+}$  mitocondrial de manera insensible al inhibidor clásico de la transición de permeabilidad mitocondrial, ciclosporina A, y prevenido parcialmente por el rojo de rutenio, inhibidor del transportador de  $Ca^{2+}$  mitocondrial. Solo la combinación del rojo de rutenio con la ciclosporina A fue capaz de prevenir completamente la liberación de  $Ca^{2+}$  mitocondrial inducida por la nemorosona. Las unidades de fluorescencia (media  $\pm$  SEM a 250 s) fueron:  $58.42 \pm 5.12$  (línea a),  $61.66 \pm 8.80$  (línea b),  $127.24 \pm 13.58$  (línea c),  $169.94 \pm 10.39$  (línea d),  $155.21 \pm 12.95$  (línea e),  $73.39 \pm 5.84$  (línea f) y  $58.25 \pm 11.42$  (línea g). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la (línea a) y las líneas (c), (d), (e) y (f), para  $P < 0.05$ . No se encontraron diferencias significativas entre la línea a y la línea g. La nemorosona, de manera similar al CCCP, también previno la captación de  $Ca^{2+}$  por las mitocondrias (Fig. 4C). Las unidades de fluorescencia (media  $\pm$  SEM a 250 s) fueron:  $56.73 \pm 5.92$  (línea a),  $104.65 \pm 10.26$  (línea b),  $156.94 \pm 8.70$  (línea c) and  $177.06 \pm 12.09$  (línea d). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la (línea a) y el resto de las líneas para  $P < 0.05$ . Por lo tanto, la disipación del potencial de membrana mitocondrial inducido por la nemorosona, probablemente impide la captación de  $Ca^{2+}$  mediada por su transportador mitocondrial.



**Fig. 4.** Efectos de la nemorosona o CCCP sobre el potencial de membrana (A), liberación de  $Ca^{2+}$  (B) y captación de  $Ca^{2+}$  (C) en las mitocondrias (0.5 mg proteínas/ml) energizadas con succinato, expresados como Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (AFU), y según lo descrito en Materiales y Métodos. Paneles A y C: (a) ninguna adición (control), (b) 250 nM nemorosona, (c) 500 nM nemorosona, y (d) 100 nM CCCP. Panel B: lo mismo que en los paneles A/C más (e) 500 nM nemorosona con 1  $\mu$ M ciclosporina A, (f) 500 nM nemorosona con 1  $\mu$ M rojo de rutenio, y (g) 500 nM nemorosona con 1  $\mu$ M rojo de rutenio y 1  $\mu$ M ciclosporina A. El ADP (100  $\mu$ M) y CCCP (1  $\mu$ M) fueron añadidos donde se indica en los gráficos. Los resultados son representativos de tres experimentos con diferentes preparaciones mitocondriales.



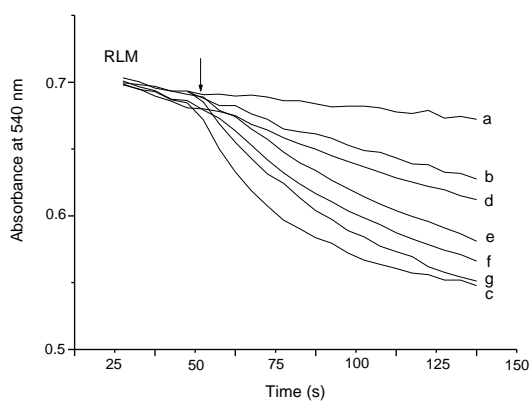
### 3.4. Efectos de la nemorosona sobre los niveles mitocondriales de ATP

La figura 5 muestra que la nemorosona induce de manera dosis-dependiente, una disminución de los

niveles de ATP en las mitocondrias aisladas luego de 10 min de incubación con estas. A 500 nM, este compuesto indujo una disminución de más del 50% del ATP en relación a las mitocondrias controles. Este efecto fue similar al provocado por 1  $\mu$ M de CCCP. Como en el caso de las células HepG2, este efecto sobre las mitocondrias aislada es probablemente consecuencia de la disipación del potencial de membrana mitocondrial debido a la acción desacopladora de la nemorosona.

**Fig. 5.** Efectos de la nemorosona o CCCP sobre los niveles de ATP en las mitocondrias (1 mg proteína/ml) energizadas con succinato, 10 min después de la incubación en un medio estándar según Materiales y Métodos. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM (n=3). \* Diferencias significativas en relación al Control, para  $P < 0.05$ .

### 3.5. Hinchamiento mitocondrial inducido por la nemorosona en mitocondrias tratadas con valinomicina e incubadas en un medio hipo-osmótico con $K^+$ y acetato



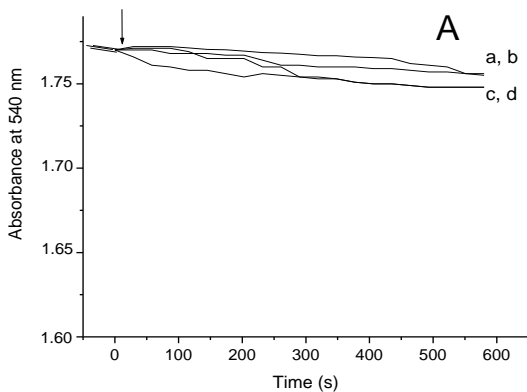
Con el objetivo de caracterizar las propiedades protonofóricas de la nemorosona, llevamos a cabo ensayos de hinchamiento mitocondrial en un medio hipo-osmótico en presencia de  $K^+$  y acetato (Nicholls, 1982). La valinomicina, ionóforo para  $K^+$ , se incubó con las mitocondrias no energizadas para forzar la entrada de iones  $K^+$  al interior del organelo; en estas condiciones el acetato atraviesa las membranas mitocondriales en su forma protonada, generando así un gradiente de protones.

**Fig. 6.** Hinchamiento inducido por la nemorosona o el CCCP en mitocondrias tratadas con valinomicina e incubadas en un medio hipo-osmótico en presencia de iones potasio y acetato según Materiales y Métodos. RLM (0.45 mg proteína) se incubaron con el medio en un volumen final de 1.5 ml. Las adiciones fueron: (a) ninguna, (b) 1  $\mu$ M valinomicina, (c) 1  $\mu$ M valinomicina + 1  $\mu$ M CCCP, (d) 1  $\mu$ M valinomicina + 200 nM nemorosona, (e) 1  $\mu$ M valinomicina + 300 nM nemorosona, (f) 1  $\mu$ M valinomicina + 500 nM nemorosona y (g) 1  $\mu$ M valinomicina + 2  $\mu$ M nemorosona. Los resultados son representativos de tres experimentos con diferentes preparaciones mitocondriales.

Las sustancias protonofóricas inducen un hinchamiento mitocondrial en estas condiciones pues promueven el paso de protones desde la matriz mitocondrial al medio extra-mitocondrial, lo que favorece la entrada de más iones  $K^+$  y acetato al interior de la mitocondria (Nicholls, 1982). En este sistema, tanto la nemorosona como el CCCP indujeron un hinchamiento mitocondrial de forma dosis-dependiente (Fig. 6). La caída en la absorbancia evidencia el hinchamiento mitocondrial. Los valores de absorbancia (media  $\pm$  SEM a 100 s) fueron:  $0.682 \pm 0.015$  (línea a),  $0.659 \pm 0.016$  (línea b),  $0.567 \pm 0.018$  (línea c),  $0.626 \pm 0.013$  (línea d),  $0.614 \pm 0.019$ , (línea e),  $0.598 \pm 0.020$  (línea f) y  $0.584 \pm 0.015$  (línea g). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre la (línea b) y las líneas (c), (d), (e), (f) y (g). Estos resultados demuestran que la nemorosona desacopla a las mitocondrias por un mecanismo protonofórico.

### 3.6. Efectos de la nemorosona sobre el hinchamiento mitocondrial mediado por $Ca^{2+}$ en ausencia o presencia de rojo de rutenio

La figura 7A muestra que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y ausencia del rojo de rutenio, en medio isotónico con sacarosa, tanto la nemorosona como el CCCP solo inducen un ligero hinchamiento dado por una pequeña disminución en la absorbancia. De hecho, no se encontraron diferencias estadísticas entre las diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, cuando se añadió el rojo de rutenio luego de la captación del  $\text{Ca}^{2+}$  por las mitocondrias (Fig. 7B), ambos compuestos indujeron un extenso hinchamiento de forma dosis-dependiente, y sensible a la ciclosporina A. Esta inducción de hinchamiento está asociada al proceso de transición de permeabilidad mitocondrial (Zoratti and Szabó, 1995). Los valores de absorbancia (medias  $\pm$  SEM a los 100 s) para el panel (B) fueron:

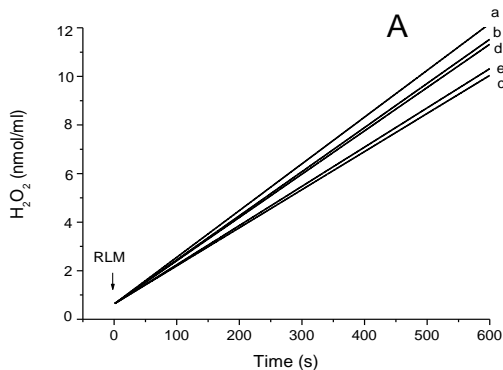


1.734  $\pm$  0.015 (línea a), 1.670  $\pm$  0.012 (línea b), 1.618  $\pm$  0.013 (línea c), 1.744  $\pm$  0.017 (línea d), 1.682  $\pm$  0.014 (línea e) y 1.754  $\pm$  0.019 (línea f). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre la (línea

a) y las líneas (b), (c) y (e). Las líneas (d) y (f) no son diferentes a la (línea a).

**Fig. 7.** Efectos de la nemorosona o el CCCP sobre el hinchamiento iso-osmótico de mitocondrias energizadas con succinato en ausencia (A) o presencia (B) del rojo de rutenio. RLM (0.5 mg proteína/ml) se incubaron en medio estándar suplementado con 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , y bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Una caída en la absorbancia indica el hinchamiento mitocondrial. Las adiciones fueron: (a) ninguna adición (control), (b) 250 nM nemorosona, (c) 500 nM nemorosona, (d) 500 nM nemorosona + 1  $\mu\text{M}$  ciclosporina A, (e) 1  $\mu\text{M}$  CCCP, (f) 1  $\mu\text{M}$  CCCP + 1  $\mu\text{M}$  ciclosporina A. En el panel (B), el rojo de rutenio se añadió luego de 100-s incubación de las mitocondrias con 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados son representativos de tres experimentos con diferentes preparaciones mitocondriales.

### 3.7. Efectos de la nemorosona sobre la generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ERO)



**Fig. 8.** (A) Efectos de la nemorosona o el CCCP sobre la generación de ERO en mitocondrias energizadas con succinato. RLM (1 mg proteína) se incubaron en un medio estándar suplementado con 0.1 mM EGTA, 1  $\mu\text{M}$  Amplex Red y 1 UI/ml de peroxidasa de

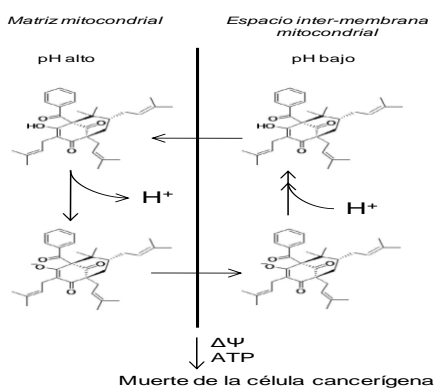


rábano, en un volumen final de 2 ml como se describe en Materiales y Métodos. Las condiciones de incubación fueron: (a) sin adición (control), (b) 250 nM nemorosona, (c) 1  $\mu$ M nemorosona, (d) 100 nM CCCP, (e) 200 nM CCCP. Los datos se expresan como AFU (unidades arbitrarias de fluorescencia). (B) Velocidad de generación de las ERO: las leyendas son las mismas que en (A). Las barras representan las medias  $\pm$  SEM (n=3). \* Diferencias significativas en relación al Control para  $P < 0.05$ .

La pérdida de la impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial a los protones puede producirse en situaciones asociadas a una extensa y no específica permeabilización de la misma como en el caso de los efectos de la peroxidación lipídica como resultado de la acumulación de las ERO (Castilho et al., 1994). Sin embargo, la figura 8 muestra que en el rango de concentración desacopladora, la nemorosona no presenta ningún efecto pro-oxidante sobre la mitocondria. Por el contrario, tanto la nemorosona como el CCCP redujeron ligeramente la velocidad basal de generación de ERO en el organelo, efecto esperado considerando un estado relativamente más oxidado de los componentes de la cadena de transporte de electrones, dado el desacoplamiento mitocondrial.

#### 4. Discusión:

La nemorosona, acilfloroglucinol policíclico y poliprenilado de origen natural, ha recibido una creciente atención debido a su potente efecto anticancerígeno in vitro. (Cuesta-Rubio et al., 2002; Diaz-Carballo et al., 2003; 2008a; 2008b; Popolo et al., 2009). Se han



propuesto varios mecanismos para explicar este efecto, entre ellos, la capacidad de la nemorosona de modular las vías transductoras de señales dependientes de Akt/PKB (Diaz-Carballo et al., 2008a; 2008b) y de inducir la enzima p300 histona acetiltransferasa (Dal Piaz et al., 2010). En este trabajo mostramos por primera vez que además del efecto citotóxico sobre las células HepG2, la nemorosona es un potente desacoplador mitocondrial protonofórico. Los agentes desacopladores mitocondriales transportan

**Fig. 9.** Representación esquemática del mecanismo de desacoplamiento protonofórico mitocondrial propuesto para la nemorosona protones a través de la membrana interna mitocondrial, disipando de esta forma el gradiente de protones requerido para el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Son generalmente ácidos orgánicos débiles con valores de  $pK_a$  entre 4-7 (Terada, 1981, 1990). Las características químicas que le aportan a la nemorosona la capacidad de desacoplar las mitocondrias son las siguientes: un grupo hidroxilo disociable con características ácidas y valor de  $pK_a = 4.5 \pm 1$ , agrupaciones electronegativas (grupos carbonilos y benzoicos), y grupos isoprenílicos hidrofóbicos. El arreglo geométrico espacial de estos grupos se considera crítico en la capacidad desacopladora mitocondrial de las moléculas. (Terada, 1981). También la estabilidad de las especies aniónicas del desacoplador en las membranas hidrófobas contribuye a la eficacia desacopladora (Terada, 1981; 1990). El equilibrio ceto-enólico de la nemorosona, junto a la extensa conjugación de sus dobles enlaces desde el grupo 4-hidroxi al 2-ceto, podrían estabilizar sus especies iónicas, favoreciendo la deslocalización de la carga

negativa a través de su estructura. Así, la nemorosona protonada podría difundir desde el espacio inter-membrana mitocondrial (alta concentración de  $H^+$ ) hasta la matriz (concentraciones relativamente bajas de  $H^+$ ), disociarse y difundir nuevamente hacia el espacio inter-membrana, esta vez en su forma ionizada, donde podría protonarse nuevamente y repetir el ciclo de difusión (Fig. 9).

Se ha demostrado que los desacopladores mitocondriales son capaces de inducir apoptosis en varios tipos celulares (Armstrong et al., 2001; de Graaf et al., 2004; Dispersyn et al., 1999; Han et al., 2008; 2009; Linsinger et al., 1999; Marton et al., 1997; Stoetzer et al., 2002). El 2,4 dinitrofenol (DNP) y el carbonilcianuro-4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), por ejemplo, detienen el ciclo celular en la fase G1, disipan el potencial de membrana mitocondrial e inducen apoptosis en las células Calu-6 (Han et al., 2008; 2009). Este efecto se ha asociado a una inducción de p27 y una reducción de CDKs y proteínas tipo ciclinas (Han et al., 2008, 2009). La apoptosis inducida por el FCCP se ha vinculado tanto a su efecto directo sobre la mitocondria (de Graaf et al., 2004) como a señales de muerte mediadas por Fas (Linsinger et al., 1999). Debido a que el desacoplamiento mitocondrial puede originar permeabilización de las membranas del organelo, la apoptosis inducida por los desacopladores podría estar asociada a la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol, seguido de activación de caspasas.

En las células cancerígenas, el desacoplamiento mitocondrial se asocia con un reajuste del metabolismo oxidativo del piruvato hacia la oxidación desacoplada de la glutamina y ácidos grasos (Gambert and Ricquier, 2007). En este sentido, el protonóforo 2,4-dinitrofenol disminuye la entrada del piruvato al ciclo de Krebs, lo que provoca un desplazamiento metabólico hacia el empleo de fuentes de carbono no asociadas a la glucosa para mantener la función mitocondrial (Pecqueur et al., 2008; Rossmeisl et al., 2000). En este sentido, se puede decir que los desacopladores en general son agentes anticancerígenos potenciales. El rottlerin y el FCCP, desacopladores de la función mitocondrial disminuyen la actividad de transcripción del factor inducible por hipoxia (HIF-1) en las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y DU-145 en condiciones de hipoxia o normoxia (Thomas and Kim, 2007).

La transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) es otro evento potencialmente implicado en la toxicidad de la nemorosona sobre las células cancerígenas. Se ha propuesto que la caída del potencial de membrana mitocondrial debido al desacoplamiento, incrementa la probabilidad de apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, que es muy sensible al potencial de membrana (Bernardi, 1992; Petronilli et al., 1993; 1994). A bajos potenciales de membrana, la enzima NAD(P)H transhidrogenasa es incapaz de mantener altos niveles de equivalentes reductores en la mitocondria, favoreciendo así la acumulación en el organelo de ERO, la oxidación de grupos tiólicos proteicos de membrana y la ocurrencia de MPT (Vercesi, 1987). Es por eso que la actividad desacopladora de la nemorosona, bajo determinadas condiciones como las creadas en presencia de rojo de rutenio (retención de  $Ca^{2+}$  en el organelo) puede promover la ocurrencia de la transición de permeabilidad mitocondrial. De hecho, el desacoplamiento inducido por el 4,6-dinitro-o-cresol o el FCCP en mitocondrias cargadas con  $Ca^{2+}$  y tratadas con rojo de rutenio, produce la permeabilización de la membrana interna mitocondrial, evento inhibido por ciclosporina A, inhibidor específico de la transición de permeabilidad mitocondrial (Bernardi, 1992; Castilho et al., 1997; Petronilli et al., 1994). Por otro lado, el desacoplamiento mitocondrial provocado *in vivo* por análogos de ácidos grasos de cadenas largas derivados de ácidos dicarboxílicos metil sustituidos, inducen MPT así como una inhibición de la expresión de Raf1 y actividad quinasa (Samovski et al., 2010).

Los mecanismos de toxicidad de la nemorosona sobre neuroblastomas y líneas celulares de leucemia ya se han descrito en la literatura e incluyen: (i) incremento en los niveles de expresión del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21<sup>Cip1</sup> y disminución de los niveles proteicos de N-myc, (ii) fragmentación del ADN, (iii) estimulación de la actividad caspasa-3, (iv) inhibición de la actividad quinasa de Akt/PKB e (v) inhibición de la desfosforilación de ERK1/2, probablemente asociado a una inhibición de la actividad MEK1/2 quinasa (Diaz-Carballo et al., 2008a; 2008b). Debido a la rapidez con que se observó en este estudio el desacoplamiento mitocondrial inducido por la nemorosona en las células HepG2 (1h de incubación), este podría ser un mecanismo potencial que preceda a los efectos anteriormente propuestos para la nemorosona.

Hay que destacar que en este estudio se demuestra que la nemorosona desacopla la función mitocondrial a concentraciones muy bajas (nanomolar), con una potencia comparable a la del desacoplador clásico CCCP. Por otro lado, y en correspondencia con datos reportados previamente (Diaz-Carballo et al., 2008a), observamos que la nemorosona exhibe muy poca toxicidad en las células no tumorales HEK293T. Pensamos que su pK<sub>a</sub> ácido podría ser responsable de su aparente selectividad citotóxica frente a las células HepG2, probablemente debido a una mayor proporción de la forma no disociada de la molécula disponible para estas células. De hecho, se ha reportado que el microambiente de las células normales es neutro, mientras que el del tejido tumoral es ácido (Gerweck and Seetharaman, 1996; Gerweck et al., 2006). Junto a su elevada lipofiliidad, esta condición podría conducir a una acumulación selectiva del compuesto en las células HepG2, similar a como ocurre con el análogo apoptogénico de la Vitamina E  $\alpha$ -tocoferil succinato (revisado en Biasutto et al., 2010). Se ha propuesto que el incremento de la actividad catabólica en las células cancerígenas como la glicólisis, la beta-oxidación, hidrólisis de proteínas y nucleótidos resulta en un exceso en la producción de protones intracelularmente, que a menudo se manifiesta por una acidificación del medio extracelular o acidosis. El pH ácido del tumor y las características biofísicas de ciertos fármacos quimioterápicos propone un modelo donde las alteraciones del pH pueden influir en el éxito terapéutico (Raghunand et al., 1999), por lo que las propuestas farmacológicas pueden estar influenciadas por esta peculiaridad del tejido cancerígeno. Estos compartimentos ácidos pueden promover la captación de moléculas basado en propiedades químicas específicas de las mismas, como el caso de bases débiles con la propiedad de atravesar las membranas plasmáticas (Hurwitz et al., 1997; Luciani et al., 2004).

El hecho de que la nemorosona a concentraciones nanomolares es capaz de desacoplar a las mitocondrias, sugiere que este organelo es probablemente el principal blanco de su citotoxicidad. Las diferencias de concentraciones citotóxicas en las células HepG2 y mitotóxicas, en mitocondrias aisladas pueden explicarse por la lógica correlación entre la disponibilidad de las moléculas a diferentes niveles biológicos: las concentraciones de fármacos requeridas a nivel celular o de organismo tienden a ser superiores que aquellas requeridas a niveles subcelulares.

Como **conclusión**, en este trabajo se demuestra por primera vez que la nemorosona es un potente desacoplador mitocondrial protonofórico y que esta propiedad podría estar involucrada en los mecanismos de toxicidad sobre las células cancerígenas. Nuevos estudios con otras líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas se requerirán para establecer definitivamente la selectividad citotóxica de este compuesto frente a las células cancerígenas, así como para proponerlo como un potencial fármaco contra el cáncer.

## Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto CAPES-Brazil/MES-Cuba (064/09).

## Referencias Bibliográficas;

- Armstrong, J.S., Steinauer, K.K., French, J., Killoran, P.L., Walleczek, J., Kochanski, J., Knox, S.J., 2001. Bcl-2 inhibits apoptosis induced by mitochondrial uncoupling but does not prevent mitochondrial transmembrane depolarization. *Exp. Cell Res.* 262, 170–179.
- Bernardi, P., 1992. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* 267, 8834–8839.
- Biasutto, L., Dong, L.F., Zoratti, M., Neuzil, J., 2010. Mitochondrially targeted anti-cancer agents. *Mitochondrion* (in press), doi:10.1016/j.mito.2010.06.004.
- Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Almeida, A.M., Hermes-Lima, M., Vercesi, A.E., 1994. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate is potentiated by Ca<sup>2+</sup> and includes lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. *Arch. Biochem. Biophys* 308, 158–163.
- Castilho, R.F., Vicente, J.A.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1997. 4,6-Dinitro-o-cresol uncouples oxidative phosphorylation and induces membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1005–1011.
- Ciochina, R., Grossman, R.B., 2006. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. *Chem. Rev.* 106, 3963–3986.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Urbe, B.A., Ramirez-Apan, T., Cardenas, J., 2002. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Z. Naturforsch.* 57, 372–378.
- Cuesta-Rubio, O., Velez-Castro, H., Frontana-Urbe, B.A., Cardenas, J., 2001. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Phytochemistry* 57, 279–283.
- Dal Piaz, F., Tosco, A., Eletto, D., Piccinelli, A.L., Moltedo, O., Franceschelli, S., Sbardella, G., Remondelli, P., Rastrelli, L., Vesci, L., Pisano, C., De Tommasi, N., 2010. The identification of a novel natural activator of p300 histone acetyltransferase provides new insights into the modulation mechanism of this enzyme. *Chembiochem.* 11, 818–827.
- de Graaf, A.O., van den Heuvel, L.P., Dijkman, H.B.P.M., De Abreu, R.A., Birkenkamp, K.U., de Witte, T., van der Reijden, B.A., Smeitink, J.A., Jansen, J.H., 2004. Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 299, 533–540.
- de Oliveira, C.M.A., Porto, A.L.M., Bittrich, V., Marsaioli, A.J., 1999. Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. *Phytochemistry* 50, 1073–1079.
- Díaz-Carballo, D., Malak, S., Bardenheuer, W., Freistuehler, M., Reusch, H.P., 2008a. Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2598–2608.
- Díaz-Carballo, D., Malak, S., Freistühler, M., Elmaagacli, A., Bardenheuer, W., Reusch, H.P., 2008b. Nemorosone blocks proliferation and induces apoptosis in leukemia cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 46, 428–439.
- Diaz-Carballo, D., Seeber, S., Strumberg, D., Hilger, R.A., 2003. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 41, 622–633.

- Dispersyn, G., Nuydens, R., Connors, R., Borgers, M., Geerts, H., 1999. Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1428, 357–371.
- Gambert, S., Ricquier, D., 2007. Mitochondrial thermogenesis and obesity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10, 664–670.
- Gerweck, L.E., Seetharaman, K., 1996. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.* 56, 1194–119.
- Gerweck, L.E., Vijayappa, S., Kozin, S., 2006. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1275–1279.
- Hail, N.Jr., 2005. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis* 10, 687–705.
- Han, Y.H., Hwa Moon, H.J., You, B.R., Kim, S.Z., Kim, S.H., Park, W.H., 2009. Effects of carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone on the growth inhibition in human pulmonary adenocarcinoma Calu-6 cells. *Toxicology* 265, 101–107.
- Han, Y.H., Kim, S.W., Kim, S.H., Kim, S.Z., Park, W.H., 2008. 2,4-Dinitrophenol induces G1 phase arrest and apoptosis in human pulmonary adenocarcinoma Calu-6 cells. *Toxicol. in Vitro* 22, 659–670.
- Kroemer, G., Reed, J.C., 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6, 513–519.
- Hurwitz, S.J., Terashima, M., Mizunuma, N., Slapak, C.A., 1997. Vesicular anthracycline accumulation in doxorubicin-selected U-937 cells: participation of lysosomes. *Blood* 89, 3745–3754.
- Lemasters, J.J., Hackenbrock, C.R., 1976. Continuous measurement and rapid kinetics of ATP synthesis in rat liver mitochondria, mitoplasts and inner membrane vesicles determined by firefly-luciferase luminescence. *Eur. J. Biochem.* 67, 1–10.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Chacon, E., Imberti, R., Gores, G., Reece, J.M., Herman B., 1993. Use of fluorescent probes to monitor mitochondrial membrane potential in isolated mitochondria, cell suspensions and cultured cells, in: Lash, L.H., Jones, D.P. (Eds), *Mitochondrial Dysfunction*. Academic Press, San Diego, pp. 404–415.
- Linsinger, G., Wilhelm, S., Wagner, H., Hacker, G., 1999. Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal. *Mol. Cell Biol.* 19, 3299–3311.
- Luciani, F., Spada, M., De Milito, A., Molinari, A., Rivoltini, L., Montinaro, A., Marra, M., Lugini, L., Logozzi, M., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Parmiani, G., Arancia, G., Belardelli, F., Fais, S., 2004. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1702–1713.
- Marton, A., Mihalik, R., Bratincsak, A., Adleff, V., Petak, I., Vegh, M., Bauer, P.I., Krajcsi, P., 1997. Apoptotic cell death induced by inhibitors of energy conservation—Bcl-2 inhibits apoptosis downstream of a fall of ATP level. *Eur. J. Biochem.* 250, 467–475.
- Mingatto, F.E., dos Santos, A.C., Rodrigues, T., Pigoso, A.A., Uyemura, S.A., Curti, C., 2000. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. *Brit. J. Pharmacol.* 131, 1154–1160.
- Nakagawa, Y., Moore, G., 1999. Role of mitochondrial membrane permeability transition in p-hydroxybenzoate ester-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 58, 811–816.
- Nicholls, D.G., 1982. *Bioenergetics. An introduction to the chemiosmotic theory*, first ed. Academic Press, London.
- Pedersen, P.L., Greenawalt, J.W., Reynafarje, B., Hullihen, J., Decker, G.L., Soper, J.W., Bustamante, E., 1978. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver derived tissues. *Methods Cell Biol.* 20, 411–481.

- Pecqueur, C., Bui T., Gelly, C., Hauchard, J., Barbot, C., Bouillaud, F., Ricquier, D., Miroux, B., Thompson, C.B., 2008. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB J.* 22, 9–18.
- Petronilli, V., Cola, C., Bernardi, P., 1993. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix  $\text{Ca}^{2+}$ . *J Biol Chem.* 268, 1011–1016.
- Petronilli, V., Costantini, R., Scorrano, L., Colonna, R., Passamonti, S., Bernardi, P., 1994. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by oxidation-reduction state of vicinal thiols. *J. Biol. Chem.* 269, 16638–16642.
- Popolo, A., Piccinelli, L.A., Morello, S., Cuesta-Rubio, O., Sorrentino, R., Rastrelli, L., Pinto, A., 2009. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1711–1716.
- Raghunand, N., He, X., van Sluis, R., Mahoney, B., Baggett, B., Taylor, C.W., Paine-Murrieta, G., Roe, D., Bhujwalla, Z.M., Gillies, R.J., 1999. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br. J. Cancer* 80, 1005–1011.
- Rajdev, S., Reynolds, I.J., 1993. Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. *Neurosci. Lett.* 162, 149–152.
- Rossmesl, M., Syrový, I., Baumruk, F. Flachs, P., Janovská P., Kopecký, J., 2000. Decreased fatty acid synthesis due to mitochondrial uncoupling in adipose tissue. *FASEB J.* 14, 1793–1800.
- Samovski, D., Kalderon, B., Yehuda-Shnaidman, E., Bar-Tana, J., 2010. Gating of the mitochondrial permeability transition pore by long chain fatty acyl analogs in vivo. *J. Biol. Chem.* 285, 6879–6890.
- Skulachev, V.P., 1996. Why are mitochondria involved in apoptosis? *FEBS Lett.* 397, 7–10.
- Stoetzer, O.J., Pogrebniak, A., Pelka-Fleischer, R., Hasmann, M., Hiddemann, W., Nuessler, V., 2002. Modulation of apoptosis by mitochondrial uncouplers: apoptosis delaying features despite intrinsic cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 63, 471–83.
- Terada, H., 1981. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 639, 225–242.
- Terada, H., 1990. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* 87, 213–218.
- Thomas, R., Kim, M.H., 2007. Targeting the hypoxia inducible factor pathway with mitochondrial uncouplers. *Mol. Cell. Biochem.* 296, 35–44.
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S., 2007. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12, 835–840.
- Vercesi, A.E., 1987. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 252, 171–178.
- Votyakova, T.V., Reynolds, I.J., 2001. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 79, 266–277.
- Zanotti, A., Azzone, G.F., 1980. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 255–265.
- Zoratti, M., Szabó, I., 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139–176.