

Evaluación de la actividad anticancerígena de nuevos híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina y derivados indeno[2,1c] quinolínicos, y determinación del modo de acción de algunos híbridos moleculares en células de melanoma murino.

Luis Carlos Vesga Gamboa

Trabajo de investigación para optar al título de Doctor en Química

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Doctora en ciencias-Bioquímica

Co-Director

Arnold Rafael Romero Bohórquez

Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

«La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo.»

Nelson Mandela

A mis amados, Carmen Cecilia Gamboa (Q.E.P.D), Carlos Arturo Vesga, Andrés Felipe Vesga y
Alberto Pinto

Agradecimientos

A Dios y a la vida por brindarme la oportunidad de conocer el mundo, pero sobre todo seguir creciendo como persona y como investigador

A mi familia por su apoyo y cariño en todo momento a lo largo del desarrollo de esta tesis. A mi mamá Carmen Cecilia quien me brindó su apoyo incondicional, aun después de su partida, estoy seguro lo sigue haciendo. A Carlos Arturo, hombre trabajador que me enseña que hay que seguir adelante todos los días de la vida.

A Alberto Pinto, por acompañarme en esta etapa de mi vida, y estar ahí brindándome su apoyo incondicional día a día, por estar ahí en cada momento apoyándome y dándome la fuerza necesaria para superar todas las dificultades.

A la profesora Stelia, quien me ha brindado todo su apoyo y conocimiento, desde que empecé mi trabajo de grado en el pregrado hasta hoy que finalizo mi trabajo de tesis doctoral. Gracias a su compromiso incondicional en mi formación como químico y ahora como doctor, pude entender que encontré en ella un gran ser humano que además de brindarme orientación académica, también me brindó una mano amiga.

A mis amigos Mayra y Faruck, porque en ellos pude entender que hay personas a las que uno puede considerar como hermanos, con ellos he podido compartir grandes momentos y siempre han estado ahí conmigo en los buenos y malos momentos de la vida. Espero poder seguir compartiendo más momentos.

Al grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM) de la universidad industrial de santander, especialmente a mis compañeros del laboratorio 402 en EDI. Allí pude encontrar personas como Marilyn, Yenny, Sandra P, Gonzalo, Melina, Ana milé, Lizeth, Leonardo, y Brayan, con quienes compartí el gusto por la mitocondria y la bioquímica, gracias a ellos pude adquirir grandes conocimientos en esta área, pero sobre todo quiero agradecer por la oportunidad de permitirme aprender de ustedes y tomar lo mejor de cada uno de ustedes.

Al grupo de investigación en compuestos orgánicos de interés medicinal (CODEIM), en cabeza del profesor Arnold y sus estudiantes Camilo y Fausto quienes además del interés en

participar en este tipo de proyectos interdisciplinarios, tuvieron toda la disponibilidad para ayudarme a resolver dudas presentadas a lo largo de esta tesis.

Al bioterio de la universidad industrial de Santander, en especial a don Jesus por su colaboración en el suministro de los animales empleados acá.

A la Universidade Federal do Paraná, y en especial al profesor Glaucio Valdameri por su cordial invitación a su grupo de investigación donde pude realizar una estancia de investigación que sirvió como base para la generación de un trabajo colaborativo sobre los transportadores de la familia ABC.

A la University of Eastern Finland, y en especial al profesor Antti Poso quien me aceptó en su laboratorio para la realización de mi pasantía de investigación por 1 año, donde pude aprender sobre modeling molecular. A Thales, por su valioso apoyo en el análisis de datos y escritura del plan de investigación y articulo resultado de mi pasantía de investigación.

A la Universidad Industrial de Santander, la Escuela de Química, y en especial al Programa de Posgrados en Química por su apoyo económico para la participación en los diferentes congresos.

Al programa de doctorados nacionales COLCIENCIAS, del cual fui beneficiario durante los 4 años de formación doctoral.

Contenido

Introducción.....	16
1. Híbridos moleculares tetrahydroquinolina/isoxazolina y derivados indenoquinolínicos como nuevos compuestos con actividad anticancerígena.....	19
1.1. Marco de referencia y antecedentes.....	19
1.1.1. Cáncer en cifras.....	19
1.1.2. Compuestos heterocíclicos como agentes anticancerígenos.....	21
1.1.2.1. Tetrahydroquinolina.....	22
1.1.2.2. Isoxazolina.....	30
1.1.2.3. Indenoquinolinas.....	37
1.1.3. Muerte celular y su rol en el tratamiento contra el cáncer.....	42
1.1.3.1. Apoptosis intrínseca.....	45
1.1.3.2. Apoptosis extrínseca.....	49
1.1.3.3. MPT-Necrosis inducida por la transición de permeabilidad mitocondrial.....	52
1.1.3.4. Necroptosis.....	54
1.1.3.5. Relevancia de la necroptosis en cáncer.....	57
1.1.3.6. Muerte celular dependiente de autofagia.....	58
1.1.3.7. Otros tipos de muerte celular regulada.....	61
1.2. Objetivos.....	62
1.2.1. Objetivo general.....	62
1.2.2. Objetivos específicos.....	62
1.3. Materiales y métodos.....	63
1.3.1. Compuestos heterocíclicos.....	64
1.3.2. Evaluación de la actividad anticancerígena de híbridos moleculares (Fase I).....	65

1.3.2.1.Células..	65
1.3.2.1.1.Actividad citotóxica de compuestos heterocíclicos (Método 1)..	66
1.3.2.1.2.Actividad citotóxica de compuestos heterocíclicos (Método 2)..	68
1.3.2.2.Cambios en la morfología celular como indicio de muerte celular.....	69
1.3.2.3.Liberación de citocromo c como biomarcador de apoptosis (vía intrínseca).	69
1.3.2.4.Identificación de muerte celular.....	70
1.3.3.Análisis estadístico	70
1.4.Resultados.....	71
1.4.1.Actividad citotóxica de compuestos heterocíclicos (Método 1)	71
1.4.2.Actividad citotóxica de compuestos heterocíclicos (Método 2)	74
1.4.3.Cambios en la morfología celular como indicio de muerte celular.....	76
1.4.4.Liberación de citocromo c como biomarcador de apoptosis (vía intrínseca)	77
1.4.5.Identificación de muerte celular.....	78
1.5.Discusión de resultados	81
1.6.Conclusiones del capítulo.....	89
2. Los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina modulan la bioenergética mitocondrial y el sistema redox células de melanoma murino.....	90
2.1.Marco de referencia y de antecedentes.....	91
2.1.1.Vías metabólicas en melanoma: proliferación, invasión y metástasis	91
2.1.1.1.Glucólisis como principal fuente de energía y precursores metabólicos.	94
2.1.1.2.Metabolismo del lactato como mayor contribuyente de la metástasis en melanoma.....	97
2.1.1.3.Fosforilación oxidativa y ciclo de Krebs como motor de crecimiento tumoral en ciertos tipos de melanoma.	98
2.1.2.Estrés oxidativo y su rol en el desarrollo, avance y tratamiento del melanoma	100
2.1.2.1.Especies reactivas de oxígeno en el desarrollo del cáncer.....	103
2.1.3.Terapia antioxidante en el melanoma.....	105

2.1.4.Mitocondria y fosforilación oxidativa como diana emergente en el tratamiento del cáncer ...	107
2.1.5.Inhibidores de la OXPHOS con potencial actividad terapéutica	113
2.2.Materiales y métodos.....	115
2.2.1.Consideraciones generales	115
2.2.2.Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre la vía glucolítica como fuente de energía en el cáncer.	116
2.2.2.1.Hexoquinasa.....	116
2.2.2.2.Fosfofructoquinasa.....	117
2.2.2.3.Piruvato quinasa.	118
2.2.3.Efecto de los híbridos moleculares sobre la respiración celular en la línea B16F10.....	119
2.2.4.Efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el potencial de membrana ..	120
2.2.5.Efecto de los híbridos moleculares sobre la bioenergética mitocondrial	120
2.2.5.1.Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.	121
2.2.5.2.Determinación del consumo de oxígeno.....	122
2.2.5.3.Efecto sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.....	123
2.2.5.3.1.NADH oxidasa.....	123
2.2.5.3.2.NADH deshidrogenasa.	124
2.2.5.3.3.NADH citocromo c reductasa.....	125
2.2.5.3.4.Succinato oxidasa.	125
2.2.5.3.5.Succinato deshidrogenasa.	126
2.2.5.3.6.Succinato citocromo c reductasa.....	126
2.2.5.3.7.Citocromo c oxidasa.	127
2.2.5.3.8.ATPasa en mitocondrias integras y fragmentadas.....	127
2.2.6.Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre el sistema redox	128

2.2.6.1.Superóxido dismutasa (SOD).....	128
2.2.6.2.Catalasa (CAT).....	128
2.2.6.3.Glutationa peroxidasa (Gpx).....	129
2.2.6.4.Glutationa reductasa.	129
2.2.7.Análisis estadístico	130
2.2.8.Consideraciones éticas.....	130
2.2.8.1.Disposición adecuada de los residuos o desechos químicos.....	130
2.2.8.2.Ensayos con células.....	131
2.3.Resultados.....	131
2.3.1.Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre la vía glucolítica como fuente de energía en el cáncer.	133
2.3.2.Efecto de los híbridos moleculares sobre la respiración celular en la línea B16F10	135
2.3.3.Efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el potencial de membrana ..	136
2.3.4.Efecto de los híbridos moleculares sobre la bioenergética mitocondrial	137
2.3.4.1.Efecto sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.....	141
2.3.5.Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre el sistema redox	143
2.4.Discusión	147
2.5.Conclusiones del capítulo.....	157
3.Híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina como nuevos agentes frente a la resistencia a medicamentos.	159
3.1.Marco de referencia y antecedentes	160
3.1.1.Transportadores multidroga y su rol en la resistencia a fármacos.....	160
3.1.2.Transportador ABCG2: estructura, mecanismo e inhibidores	162
3.2.Materiales y métodos.....	166
3.2.1.Cultivo Celular.....	167

3.2.2.Efecto de los híbridos moleculares sobre la actividad de los transportadores de la familia ABC	167
3.2.3.Identificación de los sitios de unión e interacciones de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el transportador ABCG2	168
3.2.3.1.Identificación del modo de unión de los híbridos moleculares al transportador ABCG2 por docking molecular.....	168
3.2.3.2.Validación de los sistemas proteína-ligando mediante simulaciones de dinámica molecular.	170
3.2.4.Análisis estructural y figuras	171
3.3.Resultados.....	171
3.3.1.Efecto de los híbridos moleculares sobre la actividad de los transportadores de la familia ABC.....	171
3.3.2.Identificación de los sitios de unión e interacciones de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el transportador ABCG2	174
3.3.2.1.Identificación del modo de unión de los híbridos moleculares al transportador ABCG2 por docking molecular.....	174
3.3.2.2.Validación de los sistemas proteína-ligando mediante simulaciones de dinámica molecular.....	179
4.Análisis y discusión de resultados globales.....	183
5.Conclusión.....	198
6.Recomendaciones.....	199
Referencias	202
Apéndices	¡Error! Marcador no definido.

Lista de figuras

Figura 1. Derivados de tetrahydroquinolina con actividad anticancerígena	23
Figura 2. Derivado de THQ inhibidor de anhidrasas carbónicas.....	24
Figura 3. Derivados de THQ DM8 y DM12 con actividad anticancerígena	25
Figura 4. Derivados de THQ con actividad inhibitoria de la tubulina.....	27
Figura 5. Derivado de THQ con actividad inhibitoria frente a proteínas que contienen bromo dominios (BCPs).....	29
Figura 6. Derivado de THQ con actividad inhibitoria frente a HDACs	29
Figura 7. Estructura general de la isoxazolina.....	30
Figura 8. Derivados de isoxazolina con actividad anticancerígena.	31
Figura 9. Metabolito presente en la esponja del mar rojo subereamollis con actividad citotóxica frente a MDA-MB-231.....	32
Figura 10. Derivados espiro-isoxazolina con actividad anticancerígena.....	33
Figura 11. Derivado de indolil-isoxazolina con actividad anticancerígena.	34
Figura 12. Derivados de cumarina e isoxazolina con actividad anticancerígena frente a melanoma	35
Figura 13. Híbridos de THQ-isoxazol con actividad anticancerígena en hepatocarcinoma humano, Hep-G2	36
Figura 14. Derivados de indenoquinolinas con actividad inhibitoria frente AChE y BuChE.....	38
Figura 15. Estructura del fármaco antitumoral TAS-103.....	39
Figura 16. Derivados con efecto inhibitorio sobre el complejo Topo I-ADN.....	40
Figura 17. Estructura cristalina de la enzima Topo I y análisis docking de los respectivos ligandos con actividad inhibitoria.....	40
Figura 18. Derivados de indenoquinolina con actividad anticancerígena.....	41
Figura 19. Principales vías de muerte celular propuesta por Galluzzi y colaboradores..	44
Figura 20. Mecanismo de los miembros de la familia Bcl-2 en la formación del poro de permeabilidad mitocondrial, liberación de citocromo c y formación del apoptosoma.....	47
Figura 21. Unión de ligando Fas al receptor de muerte y formación del complejo inductor de muerte DISC..	50
Figura 22. Mecanismo de activación de la muerte celular apoptótica extrínseca.	51
Figura 23. Vía de activación de la necroptosis y formación del necrosoma.....	55

Figura 24. Vía de señalización de la autofagia.....	60
Figura 25. Diseño metodológico del estudio.....	64
Figura 26. Efecto citotóxico de los híbridos 3a , 3i y 3m mediante el método de cristal violeta..	75
Figura 27. Cambios morfológicos observados en B16F10 después de 24 horas de tratamiento con los híbridos 3a , 3i y 3m en concentración de 10 μ M.....	77
Figura 28. Liberación de citocromo c generada por efecto de los híbridos moleculares 3a , 3i y 3m (10 μ M) durante 24 horas de tratamiento sobre la línea B16F10	78
Figura 29. Efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina en la inducción de apoptosis, tinción anexina V/ 7AAD en células de melanoma murino B16F10.....	80
Figura 30. Esquema de derivados de indenoquinolina. I-III derivados evaluados en este trabajo, IV-V siguiente generación de derivados con cadena lateral básica necesaria para inhibición de topoisomerasas (a evaluar en próximos proyectos).	84
Figura 31. Vías de señalización que promueven la progresión y regulación del melanoma.	92
Figura 32. Mecanismo de defensa antioxidante presente en la célula	102
Figura 33. Fosforilación oxidativa, vía metabólica generadora de ATP a través del transporte electrones a través de los complejos mitocondriales	108
Figura 34. Estructura química de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina 3a , 3i y 3m	132
Figura 35 . Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre las enzimas de la vía glucolítica en la línea B16F10.....	134
Figura 36. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en la respiración de celular en la línea B16F10.	136
Figura 37. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el potencial en la línea B16F10.	137
Figura 38. Efecto de los híbridos 3a , 3i y 3m sobre la bioenergética mitocondrial.	140
Figura 39. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre las enzimas antioxidantes en mitocondrias aisladas.....	144
Figura 40. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre las enzimas antioxidantes en la línea B16F10.	146
Figura 41. Estructura química del compuesto antitumoral GEN-27 inhibidor de hexoquinasa.	149

- Figura 42.** Representación esquemática del mecanismo de liberación de sustratos y estructura cristalina del transportador ABCG2, estado inactivo del transportador ABCG2 con la presencia de las cavidades 1 y 2 163
- Figura 43.** Inhibidores específicos del transportador ABCG2 165
- Figura 44.** Efecto inhibitor de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre los transportadores A) P-gp, B) ABCG2, C) MRP1. 172
- Figura 45.** Imágenes representativas de las interacciones de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el sitio de unión en la cavidad 1 del transportador ABCG2 176
- Figura 46.** Imagen representativa de los valores observado de la desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal de la proteína para los siete complejos de proteína-ligando a lo largo de los 500 ns. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 47.** Estructura representativa de últimos frames de las simulaciones de dinámica molecular de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina 181
- Figura 48.** Representación gráfica de la frecuencia de las interacciones proteína-ligando a lo largo de la simulación de dinámica molecular de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina 182
- Figura 49.** Representación gráfica del sistema proteína-ligando-membrana preparado para las simulaciones de dinámica molecular. 186
- Figura 50.** Esquema del mecanismo de acción propuesto para el híbrido de THQ/isoxazolina **3a** en los modelos evaluados, mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular B16F10.. 190
- Figura 51.** Esquema del mecanismo de acción propuesto para el híbrido de THQ/isoxazolina **3i** en los modelos evaluados, mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular B16F10.. 193
- Figura 52.** Esquema del mecanismo de acción propuesto para el híbrido de THQ/isoxazolina **3m** en los modelos evaluados, mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular B16F10.. 195

Lista de tablas

Tabla 1. Actividad citotóxica de híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina.	72
Tabla 2. Actividad citotóxica de derivados indenoquinolínicos.....	74
Tabla 3. Inhibidores de la fosforilación oxidativa evaluados in vitro, in vivo o fase clínica para terapia anticancerígena.....	113
Tabla 4. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina 3a, 3i y 3m sobre las enzimas de las cadena respiratoria mitocondrial.	142

Resumen

TÍTULO: Evaluación de la actividad anticancerígena de nuevos híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina y derivados indeno[2,1c]quinolínicos¹

AUTOR: Luis Carlos Vesga Gamboa²

Palabras Clave: Actividad citotóxica, Cáncer, Especies reactivas de oxígeno, Fosforilación oxidativa, Híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina, Melanoma, Mitocondria, Muerte celular.

DESCRIPCIÓN:

Debido al constante aumento en los casos de incidencia del cáncer, así como el aumento a la resistencia generada a los fármacos convencionalmente empleados, surge la necesidad de identificar nuevos compuestos con actividad citotóxica que puedan ser empleados para el tratamiento de esta enfermedad. Esta necesidad de encontrar fármacos más efectivos motivó al desarrollo de esta tesis doctoral, que tuvo como objetivo general evaluar la actividad anticancerígena de una nueva familia de híbridos moleculares a partir de los farmacóforos tetrahydroquinolina e isoxazolina, así como una familia de compuestos indenoquinolínicos análogos al antitumoral TAS-103.

De esta forma, inicialmente se evaluó el efecto citotóxico de 16 híbridos moleculares y 16 compuestos indenoquinolínicos sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (A549), hígado (Hep-G2), cérvix (HeLa), mama (MCF-7) y melanoma murino (B16F10), junto con la línea no cancerígena de riñón de mono verde africano (Vero), empleando los métodos de MTT y cristal violeta. Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron los híbridos **3a**, **3i**, y **3m**, quienes presentaron el mejor efecto citotóxico con CC_{50} = 11,37, 21,95, y 25,59 μ M, respectivamente, en la línea celular de melanoma murino B16F10. Adicionalmente, como criterio de selección también se tomó en cuenta el índice de selectividad (IS), es decir la relación del efecto citotóxico de los compuestos en una línea celular no cancerígena (Vero) frente a una línea celular cancerígena. Después, con el fin de conocer el modo de acción de estos híbridos, se evaluó el efecto en la inducción de procesos de muerte celular mediante citometría de flujo empleando Anexina-v y 7-AAD, así como la liberación de citocromo c como biomarcador para apoptosis mediada por la mitocondria. Adicionalmente, se evaluaron los daños en potencial de membrana, empleando rodamina 123, y el efecto de los híbridos sobre la actividad de algunas enzimas de la vía glucolítica y enzimas antioxidantes. Finalmente, para conocer el mecanismo de acción de los híbridos moleculares sobre la mitocondria, como blanco terapéutico, se evaluó su efecto sobre la bioenergética mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata, así como en la respiración celular en las células B16F10 empleando técnicas polarográficas y espectrofotométricas.

Los resultados obtenidos sugieren que los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** presentan actividad citotóxica en la línea de melanoma murino B16F10, después de 48 horas de tratamiento. Su actividad citotóxica induce procesos de muerte celular apoptótica, con liberación de citocromo c para el híbrido **3a**. Además, el efecto citotóxico en B16F10 estaría relacionado al posible aumento en las especies reactivas de oxígeno, debido a la inhibición de ~52% y ~68% en la actividad de la catalasa para los híbridos **3a** y **3m**, respectivamente. Asimismo, el aumento en las especies reactivas de oxígeno puede ser consecuencia del bloqueo en el transporte de electrones desde el complejo I al complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, representado en la disminución de la velocidad del consumo de oxígeno en estado 3 por el híbrido **3a** (~42%, 1 μ M), cuando la mitocondria es energizada con glutamato. Por otra parte, los híbridos moleculares disminuyen el flujo de sustratos a través de la vía glucolítica, inhibiendo enzimas importantes en la regulación de esta vía como lo son la hexoquinasa, enzima inhibida en ~30%, ~20% y ~45%, para los híbridos **3a**, **3i**, y **3m**, respectivamente, y la enzima piruvato quinasa, inhibida por los híbridos **3a** (~50%), **3i** (~26%), y **3m** (~40%).

Finalmente, los resultados obtenidos corroboran la hipótesis de que los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina y los derivados de las Indeno[2,1-c]quinolinas presentan efectos citotóxicos promisorios y selectivos sobre algunas de las líneas celulares cancerígenas A549, Hep-G2, HeLa, MCF 7, o B16F10. Además, inducen procesos de muerte celular programada, inhibiendo rutas metabólicas involucradas en la proliferación celular o modulando las funciones de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Además, los resultados obtenidos indican que los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina podrían ser una buena alternativa al tratamiento del melanoma, gracias a su efecto citotóxico relacionado con la modulación de la bioenergética mitocondrial, inhibición de vías metabólicas y alteraciones en el sistema redox.

¹ Tesis doctoral

² Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Stelia Carolina Méndez S. Codirector: Arnold Rafael Romero

abstract

TITLE: Anticancer Activity of new molecular hybrids of tetrahydroquinoline/isoxazoline and Indeno [2, 1c] quinolinic derivatives³

AUTHOR: Luis Carlos Vesga Gamboa⁴

KEYWORDS: Cancer, Cytotoxic activity, Death cell, Melanoma, Mitochondria, Oxidative phosphorylation, Reactive oxygen species, Tetrahydroquinoline/isoxazoline hybrids.

DESCRIPTION:

Due to the constant increase in cases of cancer incidence, as well as the increase in resistance generated to the conventional drugs, arise the necessity to identify new compounds with cytotoxic activity that can be used to treat this disease. For that reason to find more effective drugs motivated the development of this doctoral thesis, which had as general objective to evaluate the anticancer activity of a new family of molecular hybrids from the tetrahydroquinoline and isoxazoline pharmacophores, as well as a family of indenoquinolinic compounds analogous to antitumoral TAS-103.

In this way, the cytotoxic effect of 16 molecular hybrids and 16 indenoquinolin compounds on the cell lines of lung adenocarcinoma, A549, liver (Hep-G2), cervix (HeLa), mother (MCF-7) and murine melanoma (B16F10) along with the non-carcinogenic line of African green monkey kidney (Vero) was evaluated using the MTT and crystal violet methods. Based on the selected results, hybrids **3a**, **3i**, and **3m** were selected, which have the best cytotoxic effect with $CC_{50} = 11.37$, 21.95 , and $25.59 \mu\text{M}$, respectively, in the murine melanoma cell line B16F10. Furthermore, as a selection criterion, the selectivity index (SI) was also taken into account, that is, the ratio of the cytotoxic effect of the compounds in a non-cancer cell line (Vero) compared to a cancer cell line. Then, to know the mode of action of these hybrids, the effect on the induction of cell death processes was evaluated by flow cytometry using Annexin-v and 7-AAD, as well as the release of cytochrome c as a biomarker for mitochondria-mediated apoptosis. Besides, assess the damage to membrane potential using rhodamine 123, and the effect of hybrids on the activity of some glycolytic enzymes and antioxidant enzymes. Finally, to know the mechanism of action of molecular hybrids on mitochondria, as a therapeutic target, we evaluated their effect on mitochondrial bioenergetics in mitochondria affected by rat liver, as well as on cellular respiration in B16F10 cells using polarographic and spectrophotometric techniques. .

The results indicated that hybrids **3a**, **3i**, and **3m** show cytotoxic activity in the B16F10 murine melanoma line, after 48 hours of treatment. Its cytotoxic activity induces apoptotic cell death processes, with release of cytochrome c for hybrid **3a**. Furthermore, the cytotoxic effect on B16F10 was related to the possible increase in reactive oxygen species, due to the inhibition of ~52% and ~68% in catalase activity for **3a** and **3m** hybrids, respectively. Similarly, the increase in reactive oxygen species may be a consequence of the blockage in the transport of electrons from complex I to complex III of the mitochondrial respiratory chain, presented in the decrease in the rate of oxygen consumption in state 3 by hybrid **3a** (~42%, $1 \mu\text{M}$), when the mitochondria is energized with glutamate. On the other hand, molecular hybrids decrease the flow of substrates through the glycolytic pathway, inhibiting important enzymes in the regulation of this pathway such as hexokinase, an enzyme inhibited by ~30%, ~20% and ~45%, for hybrids **3a**, **3i**, and **3m**, respectively, and the pyruvate kinase enzyme, inhibited by hybrids **3a** (~50%), **3i** (~26%), and **3m** (~40%).

Finally, the results obtained corroborate the hypothesis that the molecular hybrids of tetrahydroquinoline / isoxazoline and the derivatives of the Indeno [2,1-c] quinolines show promising and selective cytotoxic effects on some of the A549, Hep-G2, cancer cell lines. HeLa, MCF 7, or B16F10. Furthermore, they induce processes of programmed cell death, inhibiting metabolic pathways involved in cell proliferation or modulating the functions of complexes of the mitochondrial respiratory chain. Furthermore, the results indicating that tetrahydroquinoline / isoxazoline hybrids may be a good alternative to the treatment of melanoma, due to their cytotoxic effect related to modulation of mitochondrial bioenergetics, inhibition of metabolic pathways, and alterations in the redox system.

³ Doctoral thesis

⁴ Faculty of Sciences. School of chemistry. Director: Stelia Carolina Méndez S. Codirector: Arnold Rafael Romero

Introducción

Actualmente la humanidad se encuentra sujeta a malos hábitos alimenticios, al sedentarismo, y a la exposición a factores de riesgo (tabaco, alcohol, entre otros), lo que ha desencadenado que un gran número de enfermedades se conviertan en problemas de salud pública global (Bray et al., 2018). Dentro de estas enfermedades encontramos el cáncer, segunda causa de muerte a nivel mundial siendo superado únicamente por las enfermedades coronarias (Siegel, Miller, & Ahmedin, 2017; Siegel, Miller, & Jemal, 2016). De acuerdo con la organización mundial de la salud y el proyecto GLOBOCAN, se presentaron 9.6 millones de muertes asociadas al cáncer en 2018, así como 18.1 millones de nuevos casos, siendo el cáncer de pulmón, próstata, estómago, cáncer de piel no melanoma, e hígado los de mayor incidencia (Ferlay et al., 2019).

Con el fin de encontrar nuevos compuestos con actividad anticancerígena, nace la idea de emplear dos farmacóforos en la misma molécula y así buscar mejorar la actividad biológica que pueda presentar cada núcleo por separado. Idea similar al uso de dos o más fármacos en el tratamiento del cáncer con el fin de atacar más de una diana farmacológica y así evadir los posibles casos de resistencia adquirida presentes en los agentes químicos empleados convencionalmente (Al-lazikani, Banerji, & Workman, 2012; Kamath, Sunil, Ajees, Pai, & Das, 2015). Con el fin de contribuir al desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento del cáncer, en el grupo de investigación CODEIM, se sintetizaron híbridos moleculares de tetrahydroquinolina e isoxazolina, y en esta tesis se presentan los resultados de la evaluación de estos híbridos sobre diferentes líneas celulares cancerígenas y “normales”. Con base en lo anterior, en esta tesis doctoral se corroboró la siguiente hipótesis *“Los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/Isoxazolina y los derivados de las Indeno[2,1-c]quinolinas, presentan efectos citotóxicos sobre algunas de las*

líneas celulares tumorales A549, Hep-G2, HeLa, MCF 7 y B16F10. Además, inducen procesos de muerte celular programada, inhibiendo rutas metabólicas involucradas en la proliferación celular o modulando las funciones de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial". Para comprobar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos: Objetivo general, Evaluar la potencial actividad anticancerígena de nuevos híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina y una serie de derivados Indeno [2,1-c]quinolina sobre líneas celulares cancerígenas Hep-G2, A549, HeLa, MCF 7 y B16F10, y como objetivos específicos;

- Establecer el efecto de ambas familias de compuestos heterocíclicos objeto de esta investigación, sobre la viabilidad celular en las diferentes líneas tumorales.
- Evaluar los efectos causados por los compuestos con actividad citotóxica sobre la morfología celular.
- Describir el mecanismo de muerte celular inducido por la acción de los compuestos más promisorios.
- Proponer un mecanismo de acción para los compuestos más citotóxicos sobre el metabolismo celular (Fosforilación oxidativa y glucólisis).

Para facilitar la presentación de los resultados obtenidos, esta tesis se dividió en tres capítulos diferentes. De esta forma, en el primer capítulo se expone la situación actual del cáncer y su tratamiento; así como las actividades biológicas reportadas en la literatura de derivados e híbridos que presentan en su estructura los farmacóforos empleados en esta tesis. Adicionalmente, se presentan los resultados del efecto de los híbridos moleculares y la familia de derivados indenoquinolínicos sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (A549), hígado (Hep-

G2), cérvix (HeLa), mama (MCF 7) y melanoma murino (B16F10), con el fin de seleccionar los compuestos más citotóxicos sobre estas líneas cancerígenas. Como resultado de este screening se seleccionaron los híbridos **3a**, **3i** y **3m** (Figura 36) debido a su efecto citotóxico sobre la línea de melanoma murino B16F10.

Más adelante, en el capítulo dos se presenta el mecanismo molecular que permite el desarrollo del melanoma, y cómo la mitocondria juega un papel importante en la génesis, avance y tratamiento de esta enfermedad. Adicionalmente, con los híbridos seleccionados en el capítulo anterior, se evaluó su efecto sobre la inducción en cambios en la morfología celular, inducción de muerte celular, así como la inducción en la liberación de citocromo c. Así, los resultados obtenidos demuestran que los híbridos **3a**, **3i** y **3m** presentan efectos citotóxicos en la línea B16F10 después de 24 horas de tratamiento a 10 μ M con inducción de procesos de muerte celular apoptótica, posiblemente por vía mitocondrial para el caso del compuesto **3a**.

Finalmente, como capítulo tres se expone la función de los transportadores de la familia ABC, así como su papel en el desarrollo de la resistencia a la terapia en el cáncer, además, se muestran los resultados obtenidos durante las pasantías de investigación realizadas en la Universidade Federal do Paraná y la University of Eastern Finland, donde se demuestra que los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina puede inhibir los transportadores ABCB1, ABCC1, y ABCG2. Adicionalmente, se presentan los diferentes modos de unión de los híbridos moleculares al transportador ABCG2, así como sus interacciones a lo largo de simulaciones de dinámica molecular, donde se establece que los híbridos moleculares pueden unirse al transportador ABCG2 en la cavidad 1 del transportador, mediante interacciones de tipo puente de hidrógeno con residuos encargados del reconocimiento de sustratos como los residuos Arg 482 y Pro 485, al igual que

interacciones de tipo Van der Waals con el residuo Leu 555 encargado del paso de sustratos a la cavidad 2 y posteriormente al espacio extracelular.

1. Híbridos moleculares tetrahydroquinolina/isoxazolina y derivados indenoquinolínicos como nuevos compuestos con actividad anticancerígena.

1.1. Marco de referencia y antecedentes

1.1.1. Cáncer en cifras

Las enfermedades no transmisibles son la principal causa de muerte en el mundo, y se espera que dentro de estas enfermedades, el cáncer sea la primera causa de muerte y principal barrera para aumentar la esperanza de vida en todos los países durante el siglo XXI (Bray et al., 2018). La incidencia (número de nuevos casos de cáncer en una población en un periodo determinado) y mortalidad (tasa de muertes en una población en determinado tiempo) en cáncer están aumentando rápidamente a lo largo del mundo y las razones son bastante complejas, dentro de ellas se encuentra un rápido crecimiento y envejecimiento de la población mundial, así como factores asociados a los hábitos alimenticios y la calidad de vida de las personas, entre otros factores de riesgo, varios de los cuales están asociados al desarrollo socioeconómico (Siegel et al., 2017, 2016). De acuerdo con los datos suministrados por el proyecto GLOBOCAN 2018, se estimaron cerca de 9.6 millones de muertes asociadas con cáncer, así como 18.1 millones de nuevos casos diagnosticados en el mundo durante el mismo año, donde existe alrededor de un 20% de probabilidad de padecer esta enfermedad antes de los 75 años y un 10% de probabilidad de morir a causa de ella (Ferlay et al., 2019).

Dentro de los tipos de cáncer con mayor incidencia en hombres se encuentran el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de próstata, estómago, cáncer no melanoma e hígado, siendo el cáncer

de pulmón, hígado, estómago y próstata los de mayor mortalidad (Bray et al., 2018). Por otra parte, mujeres los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad corresponden al cáncer de mama, pulmón y cérvix (Bray et al., 2018). Igualmente, en Colombia se ha presentado un incremento en las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer y donde se estima que para el año 2030 se presentarán 125.000 nuevos casos de cáncer y 76.000 muertes por año (Observatorio Nacional De Salud, 2015). Según el observatorio nacional de salud para el periodo comprendido entre 2010-2014 se registraron 132.799 nuevos casos de cáncer en mujeres, siendo los de mayor incidencia cáncer de seno, cuello uterino y tiroides, y los de mayor mortalidad seno, pulmón, estómago y colon (Observatorio Nacional De Salud, 2015). Entre tanto, para hombres el tipo de cáncer con mayor incidencia fue el cáncer de próstata, seguido del cáncer de colon y estómago respectivamente, mientras, la tasa de mortalidad por cáncer en hombres es debida principalmente al cáncer de estómago, próstata y pulmón (Observatorio Nacional De Salud, 2015).

En el contexto del cáncer de piel, durante el 2018 solo en Estados Unidos se diagnosticaron más de 90.000 nuevos casos de melanoma invasivo y 87.000 nuevos casos de melanoma. Aunque el cáncer de piel más común en la población es el tipo no melanoma, es el cáncer de piel tipo melanoma el más agresivo y metastásico, con un pronóstico de supervivencia desfavorable de tan solo 5.3 a 10 meses dependiendo del estado en el que sea diagnosticado el paciente (Saleh, 2018; Tracey & Vij, 2019). De acuerdo con la Sociedad Americana para el Cáncer, el melanoma ha aumentado sus tasas de incidencia y mortalidad en los últimos 30 años y se esperan más de 100.000 nuevos casos y más de 7.000 muertes debido al melanoma en Estados Unidos para el 2020, posicionándose como el sexto tipo de cáncer de mayor incidencia en el país americano (American Cancer Society, 2019; Siegel, Miller, & Jemal, 2020).

Por lo anterior, el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos se ha mantenido dentro de los objetivos de la química medicinal, buscando como resultado un nuevo fármaco que sea altamente selectivo frente a las diversas alteraciones presentadas en el cáncer, evitando a su vez los efectos secundarios y la resistencia al tratamiento, problemas que pretenden ser solucionados con la terapia combinatoria y la síntesis de nuevos compuestos heterociclos a partir de productos naturales, entre otras (Klippstein, Bansal, & Al-jamal, 2016; Opatov, Cumov, Slíva, Vodi, & Rejhov, 2018).

Con base en los principios de la terapia combinatoria que pretende mejorar la actividad anticancerígena al adicionar más de 2 farmacóforos en la misma estructura química, y considerando que el objetivo principal de este trabajo fue la evaluación de una familia de híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina, y de una familia de compuestos indenoquinolínicos análogos al antitumoral TAS-103, a continuación, se describen algunas de las propiedades citotóxicas sobre cultivos de células cancerígenas presentadas por derivados que tienen dentro de su estructura el núcleo tetrahydroquinolina, isoxazolina o indenoquinolina.

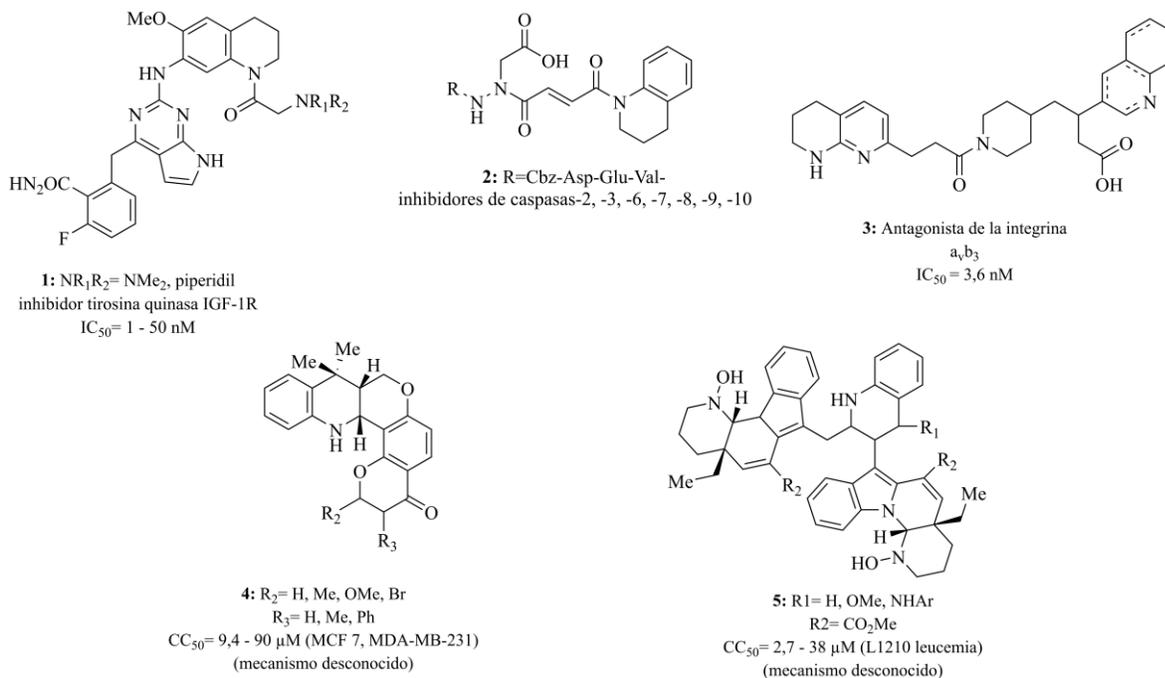
1.1.2. Compuestos heterocíclicos como agentes anticancerígenos

1.1.2.1. Tetrahydroquinolina. El núcleo tetrahydroquinolina ha sido un farmacóforo privilegiado en la identificación de nuevos compuestos con interés medicinal, ya que se han reportado diversas actividades biológicas para derivados que contienen dentro de su estructura este núcleo. Dentro de las principales actividades reportadas para estos derivados se encuentran: actividad antibacteriana, así como compuestos inhibidores de la transcriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), inhibidores de las prostaglandinas en el tratamiento de alergias, actividad antioxidante y anticancerígena (Gedawy, Kassab, & El-malah, 2015; Ghorab, Ragab, & Hamed, 2009; Goli et al., 2017; J. Liu et al., 2009).

En lo que respecta a derivados de tetrahydroquinolina con actividad biológica contra el cáncer, se ha encontrado que derivados como los compuestos **(1-5)** (Figura 1), presentan actividad anticancerígena teniendo diversos modos de acción tales como, la inhibición del receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), mediante la interacción iónica de la amina terminal C5' con la Asp1056 de la enzima, generando inhibición enzimática en el rango $IC_{50} = 1 - 50$ nM **(1)** (Chamberlain et al., 2009). También, el derivado de tetrahydroquinolina **(2)** (Figura1) genera inhibición de las caspasas caspasas-2, -3, -6, -7, -8, -9, y -10, mediante un ataque nucleofílico generado por el grupo tiol presente en el sitio activo al carbono 3 (C3) del derivado tetrahydroquinolínico (Ekici et al., 2006). Asimismo, la actividad anticancerígena del compuesto **(3)** se basa en la actividad antagonistas de la integrina $\alpha v \beta 3$, también conocido como el receptor de vitronectina (Ghosh et al., 2004). De igual forma los derivados **(4-5)** (Figura 1) de tetrahydroquinolina cuyo mecanismo aún no ha sido desvelado, se tiene la hipótesis que su citotoxicidad está basada en la capacidad de inhibir diversas quinasas dependientes de ciclinas (Lewin et al., 2000; Nagaiah et al., 2010; Sridharan, Suryavanshi, & Menéndez, 2011).

Figura 1

Derivados de tetrahydroquinolina con actividad anticancerígena.



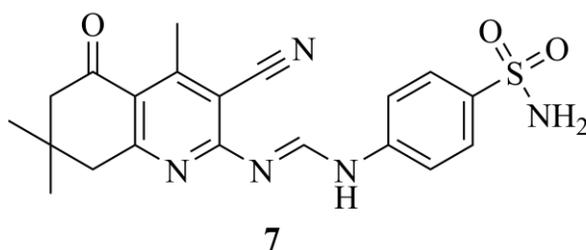
Nota: Adaptado de (Sridharan et al., 2011)

Además, se ha reportado que algunos derivados de tetrahydroquinolina pueden inhibir la anhidrasa carbónica, metaloproteína encargada de catalizar la conversión de dióxido de carbono y agua a bicarbonato (Thiry et al., 2006). En el compuesto **7** (Figura 2) se observa que la adición del grupo sulfonamida y el farmacóforo tetrahydroquinolina en la misma estructura puede inhibir la anhidrasa carbónica, mediante la formación de 2 puentes de hidrógeno; el primer puente de hidrógeno se realiza entre el oxígeno de la sulfonamida y el aminoácido Thr199 presente en el sitio activo de la proteína, el segundo puente de hidrógeno es realizado entre el nitrógeno de la sulfonamida y el cofactor (Zn) de la enzima, generando una inhibición de 2,62 $\mu g/mL$ en la actividad de la enzima. Además, la adición del farmacóforo tetrahydroquinolina permitió mejorar

el efecto citotóxico presentado frente a la línea de adenocarcinoma de mama (MCF 7) ($IC_{50} = 6,37 \mu M$), respecto a los derivados que contenían solo el núcleo sulfonamida ($IC_{50} = 13,43 \mu M$) (Ghorab et al., 2009).

Figura 2

Derivado de THQ inhibidor de anhidrasas carbónicas.

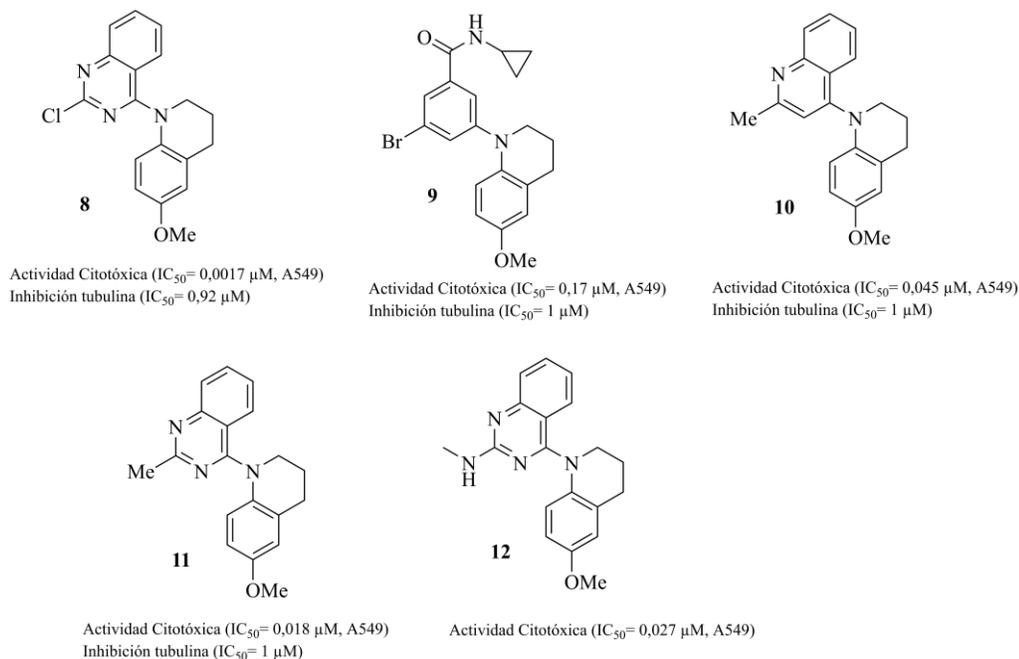


Derivado de THQ inhibidor de anhidrasas carbónicas, $IC_{50} = 2,62 \mu g/mL$
Actividad anticancerígena (MCF 7, 48 h tratamiento), $IC_{50} = 6,37 \mu M$

Nota: tomado de (Ghorab et al., 2009)

Adicionalmente, Muñoz y colaboradores., 2011 sintetizaron una nueva serie de derivados de THQ, dentro de los cuales destacan los compuestos denominados **DM8** y **DM12** (Figura 3) por su actividad citotóxica frente a la línea celular MCF 7 en un rango de concentraciones entre 11,30 – 73,89 μM . En sus resultados se encontró que la adición de estos compuestos junto con fármacos de referencia como paclitaxel (0,16 μM) y gemcitabina (0,1 μM) genera un efecto sinérgico que intensifica su efecto citotóxico frente a la línea celular en concentraciones por debajo de 0,1 μM , postulándolos como unos posibles compuestos coadyuvantes en el tratamiento del cáncer de seno (Muñoz et al, 2011).

cromosomas y consecuentemente la inhibición de la división celular, inhibe la vascularización del tumor y en general desencadena procesos de muerte celular necrótica en el tratamiento del cáncer de seno (Hadfield et al., 2003; Haltinner, 2013). La inhibición de estas estructuras ha motivado la síntesis de diversos compuestos con actividad anticancerígena y con objetivo la tubulina, entre ellos encontramos los derivados de tetrahydroquinolina sintetizados por Wang y colaboradores., 2013 quienes sintetizaron una serie de 24 compuestos a los cuales se les evaluó su actividad anticancerígena frente a las líneas celulares A549 (adenocarcinoma de pulmón), KB (células HeLa que contienen virus de papiloma humano), y DU145 (carcinoma de próstata). Los compuestos **8**, **9**, **10**, **11** y **12** (Figura 4) presentaron actividad citotóxica potente con rangos de IC_{50} entre 1.5 y 1.7 nM, siendo más potente que fármacos como el paclitaxel ($IC_{50} = 0,0076 \mu M$) en algunos de los ensayos realizados. Además, la actividad inhibitoria de la tubulina fue evaluada encontrándose que los compuestos **9**, **10** y **11** presentaron la mayor inhibición con IC_{50} entre 0.92 y 1 μM , donde además los ensayos de docking molecular demostraron que la presencia del grupo metoxilo en el anillo de la THQ es necesaria para garantizar la formación de puentes de hidrógeno con el aminoácido Cys241 en el sitio de unión de la colchicina (X. F. Wang et al., 2013).

Figura 4*Derivados de THQ con actividad inhibitoria de la tubulina*

Nota: tomado de (X. F. Wang et al., 2013).

Asimismo, se ha demostrado que diversos derivados de tetrahidroquinolina actúan como inhibidores de moduladores epigenéticos como las proteínas que contienen bromodominios (BCPs), y de histonas desacetilasas (HDACs), convirtiéndose en un farmacóforo para una nueva generación de compuestos anticancerígenos. Como ejemplo, se encuentra el compuesto denominado **I-BET295** (Figura 5) que exhibe actividad inhibitoria frente a bromodominios BRD4 (IC_{50} = 0,28 μ M), pero no presentan actividad inhibitoria frente a las HDACs (Atkinson et al., 2014). Por otro lado, el derivado de THQ **13** (Figura 6) es un ejemplo de inhibidor de HDACs, con concentración inhibitoria de IC_{50} = 35,75 nM, presenta efecto de forma selectiva por HDACs de la clase I. Además, se evidenció que su administración oral en ratones inoculados con la línea

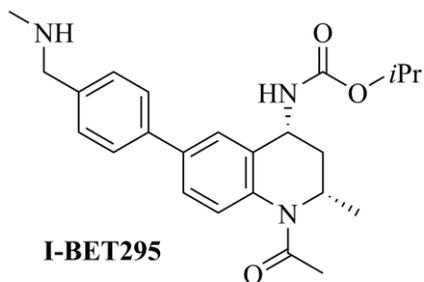
tumoral humana PC-3 presentan una reducción del tamaño inicial del tumor de ~38.8% (tamaño inicial: ~170mm³) en dosis de 100 mg/kg, postulando este compuesto como un fármaco prometedor en el tratamiento de cáncer de próstata (Y. M. Liu et al., 2015).

La acetilación de lisinas en las histonas es un marcador epigenético asociado con la activación genética (Marushige, 1976). La adición y remoción de estos grupos acetilos se hace gracias a la histona acetiltransferasa (HATs) e histona desacetilasa (HDACs). Las HDACs funcionan como “borradores” epigenéticos removiendo los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas induciendo la condensación de la cromatina y de este modo inhibiendo la transcripción (Filippakopoulos et al., 2010). Las HDACs juegan un rol importante en la coordinación de las vías de señalización intracelular encargadas de la estabilización de la cromatina, así como la transcripción mediante la unión a proteínas involucradas en la activación genética de proteínas que contienen bromodominios para mediar específicamente la expresión génica durante la activación, diferenciación y división celular (Filippakopoulos & Knapp, 2012).

Estudios indican que la desregulación en la actividad de las HDACs y por ende en las proteínas con bromodominios BCPs se encuentra relacionada con el desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer tales como el carcinoma de la línea media NUT y la leucemia mieloide aguda (AML) (Schwartz et al., 2011). Además, se ha demostrado que la inhibición en la desregulación de los bromodominios extraterminales bloquean la proliferación de células cancerígenas e inducen procesos de muerte celular apoptótica en leucemia mieloide aguda (AML), carcinoma de la línea media NUT y en linfoma (Zhang et al., 2016).

Figura 5

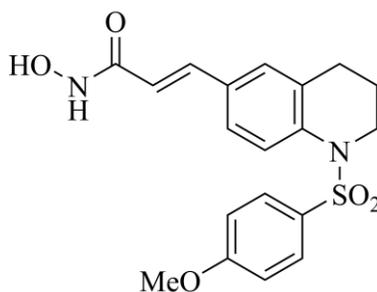
Derivado de THQ con actividad inhibitoria frente a proteínas que contienen bromo dominios (BCPs).

**I-BET295**

Inhibición BRD4 ($IC_{50}=0,28 \mu M$)

Figura 6

Derivado de THQ con actividad inhibitoria frente a HDACs

**13**

Inhibidor histona desacetilasa $IC_{50}=35,75 \mu M$

Actividad anticancer $IC_{50}=0,20 \mu M$

Nota: tomado de (Y. M. Liu et al., 2015)

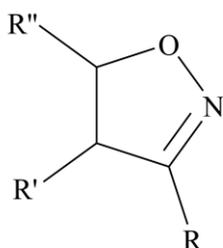
De esta forma, se observa cómo el farmacóforo tetrahydroquinolina presente en los derivados anteriormente expuestos, mejoran el efecto citotóxico frente a líneas cancerígenas mediante mecanismos que incluyen la inhibición de caspasas, inhibición de la formación del huso

mitótico, entre otras. Asimismo, el farmacóforo isoxazolina se encuentra presente en derivados con actividad biológica, donde por supuesto se encuentra presente la actividad anticancerígena.

1.1.2.2. Isoxazolina .Las isoxazolininas son una clase importante de heterociclos de cinco miembros que contienen nitrógeno y oxígeno dentro de su estructura química (Figura 7), pertenecen a la familia de los azoles y exhiben actividad anticancerígena en las líneas celulares HeLa, HT-29 (línea celular de adenocarcinoma de colon), MDA-MB-231 (línea extraída de adenocarcinoma de mama metastásico), entre otras (Kaur, Kumar, Sharma, & Gupta, 2014).

Figura 7

Estructura general de la isoxazolina



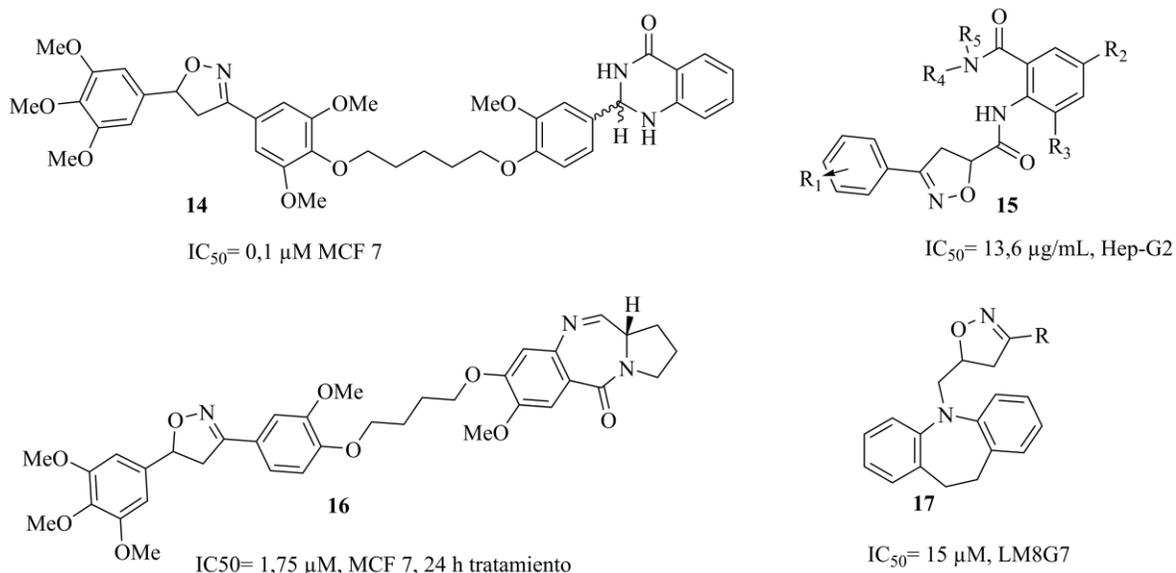
R, R', R''= H, alquil, aril o heteroaril

Derivados de isoxazolina como los compuestos **14**, **15**, **16** y **17** (Figura 8) presentan una potente actividad anticancerígena frente a las líneas cancerígenas MDA-MB-231, RPMI-8226 (leucemia), y MCF 7, donde su principal mecanismo de acción se basa en la detención del ciclo celular en fase G2/M, inhibición de la angiogénesis, y desregulación en las proteínas de la familia BCL-2, proteínas que regulan la muerte celular mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, permitiendo la liberación de agentes apoptóticos al citosol desencadenando activación de caspasas y muerte celular apoptótica (Ciaraldi, Nikoulina, Bandukwala, Carter, &

Henry, 2007; Digirolamo, Newby, & Lovejoy, 1992; Gerardo Guillen-Nieto & Luis Herrera-Martínez, 2013; Rodríguez et al., 2016; Sadashiva et al., 2012).

Figura 8

Derivados de isoxazolina con actividad anticancerígena



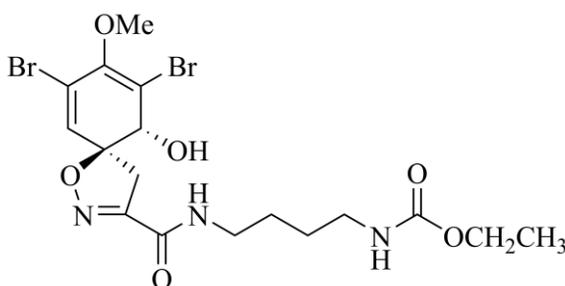
Nota: tomado de (Abou-shoer, Shaala, Diaa, Badr, & Habib, 2008).

Por otra parte, debido a la importancia de los productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos, han emergido diversas investigaciones sobre la actividad anticancerígena de aquellos productos naturales que contengan en su estructura farmacóforos como la isoxazolina. De esta forma, se ha reportado la presencia de un metabolito con isoxazolina en el extracto alcohólico de la esponja del mar rojo *subereamollis* (Abou-shoer et al., 2008). Este metabolito **18** (Figura 9) es un potente inhibidor de la migración e invasión evaluado *in vitro* en células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 ($IC_{50} = 1,7 \mu M$). Además, a partir de este estudio se encontró que la presencia del grupo terminal etilcarbamato juega un rol importante en el aumento de la actividad

antimigratoria, (IC_{50} = 400 nM), para la misma línea celular. (Abou-shoer et al., 2008; Shaala et al., 2012).

Figura 9

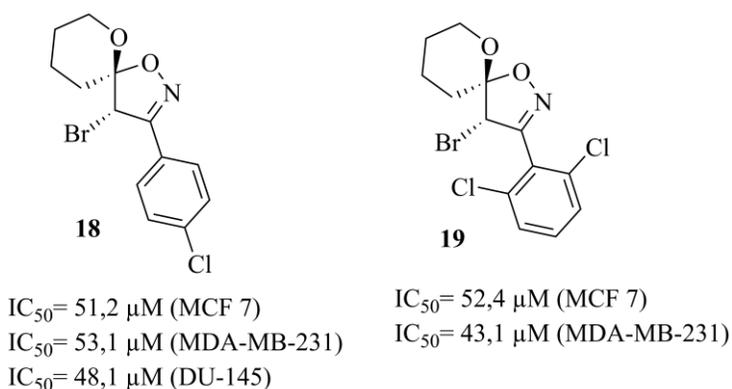
Metabolito presente en la esponja del mar rojo subereamollis con actividad citotóxica frente a MDA-MB-231.



18

IC_{50} = 1,7 μ M, MDA-MB-231

De forma similar, derivados de isoxazolina sintetizados en el laboratorio, al igual que los compuestos espiro-isoxazolina presentes en la naturaleza presentan efecto citotóxico frente a líneas celulares cancerígenas. Das y colaboradores., 2015 sintetizaron una nueva quimioteca de espiro-isoxazolininas, a través de una cicloadición 1,3-dipolar encontrando que los derivados **18** y **19** (Figura 10) presentan actividad anticancerígena frente a las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, y las líneas de cáncer de próstata PC-3 y DU-145. Mediante ensayos de viabilidad de MTT se encontró que de los derivados sintetizados de espiro-isoxazolininas, aquellos *p*-cloro o *o*-dicloro sustituidos presentaron el mayor efecto tóxico con IC_{50} 43 – 56 μ M (Das et al., 2015).

Figura 10*Derivados espiro-isoxazolina con actividad anticancerígena*

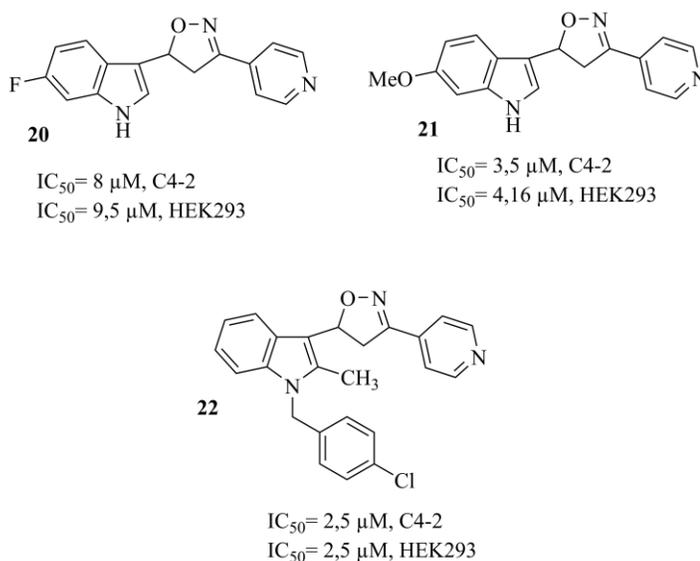
Nota: tomado de (Das et al., 2015).

De la misma manera, con el fin de aumentar las diferentes actividades biológicas presentadas por cada farmacóforo, se ha empleado la hibridación molecular para unir dos o más núcleos en la misma molécula, y de este modo mejorar el efecto citotóxico que presenta cada núcleo basándose en el principio de la terapia combinatoria de tener múltiples dianas farmacológicas posibles (Opattov et al., 2018). De este modo, el núcleo isoxazolina ha sido empleado en la síntesis de derivados con actividad anticancerígena, ejemplo de ello son los derivados de indolil-isoxazolina sintetizados por Chaitanya y colaboradores., 2018. En este trabajo, encontraron que los híbridos **20**, **21** y **22** (Figura 11) presentan actividad anticancerígena frente a las líneas celulares HEK293, MDA-MB-231, PC3 y C4-2 con IC_{50} entre 2,5 – 9,5 μM . Además, con el fin de conocer un poco sobre su mecanismo de acción evaluaron el efecto de los derivados de indolil-isoxazolina sobre la línea celular C4-2, demostrando inducción de apoptosis, probablemente debido al daño en el AD debido al aumento en la expresión de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP), enzima encargada del reconocimiento y reparación en el daño al ADN, así

como en la inducción de procesos de muerte celular programada (Boulares et al., 1999; Chaitanya et al., 2018).

Figura 11

Derivado de indolil-isoxazolina con actividad anticancerígena

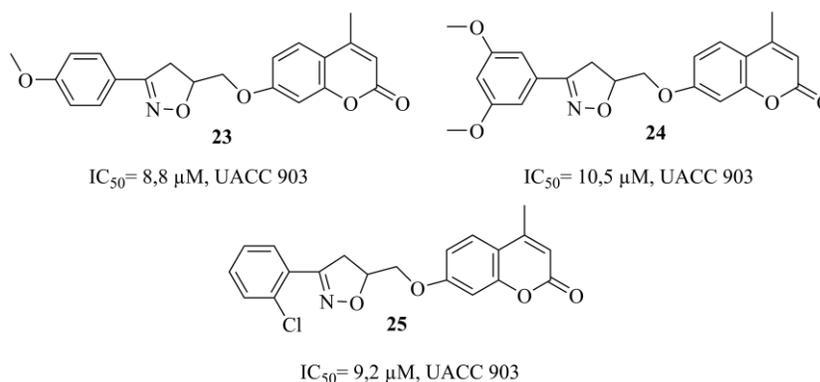


Nota: , tomado de (Chaitanya et al., 2018) .

Del mismo modo, Lingaraju y colaboradores., 2018 sintetizaron derivados de cumarinas junto con isoxazolina como potenciales compuestos con actividad anticancerígena frente a la línea celular de melanoma humano UACC 903. Los derivados **23**, **24**, **25** y **26** (Figura 12) presentaron actividad anticancerígena con IC_{50} entre 4.5 – 10 μM . Además, el compuesto **24** fue administrado de forma intraperitoneal en ratones Swiss albinos con carcinoma de ascitis de Ehrlich en concentración de 100 mg/Kg de peso, con el fin de identificar inhibición del crecimiento tumoral, encontrándose una inhibición de hasta el 85% del crecimiento tumoral respecto a los ratones sin tratamiento (Lingaraju et al., 2018).

Figura 12

Derivados de cumarina e isoxazolina con actividad anticancerígena frente a melanoma



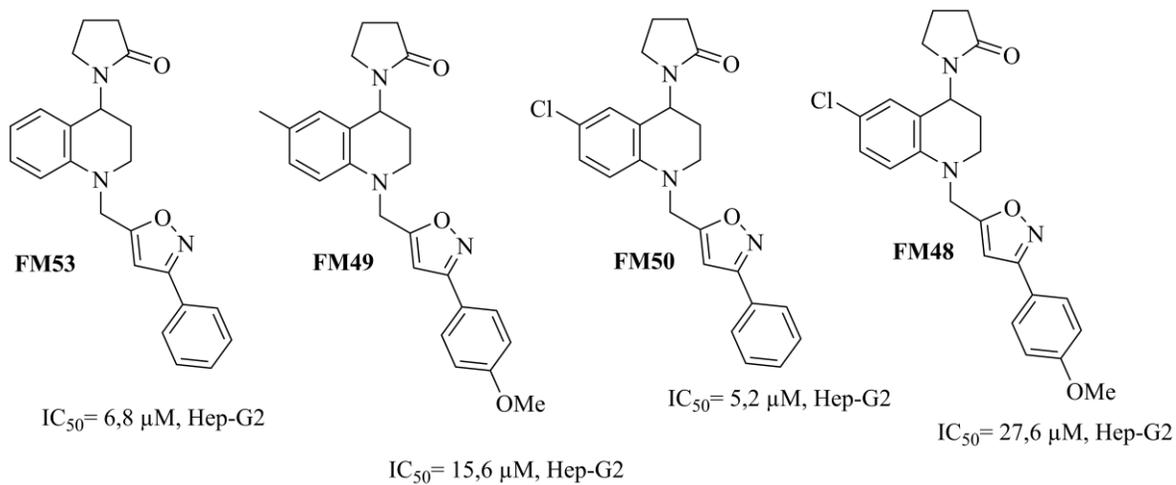
Nota: tomado de (Lingaraju et al., 2018).

Finalmente, Álvarez y colaboradores., 2019 evaluaron una familia de híbridos moleculares con otro miembro de la familia de los azoles, en este caso isoxazoles junto con el farmacóforo tetrahydroquinolina. En este trabajo se encontró que estos híbridos moleculares identificados como **FM48**, **FM49**, **FM50** y **FM53** (Figura 13) presentan efecto citotóxico en la línea de hepatocarcinoma humano Hep-G2 en concentraciones IC_{50} entre 5-6 μM después de 48 horas de tratamiento. Además, estos híbridos moleculares (25 μM) afectan la bioenergética mitocondrial inhibiendo los estados basal ~73%, leak ~53% y desacoplado ~69% en células Hep-G2 a 24 horas de tratamiento. A su vez, estos híbridos moleculares inhiben el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata (Álvarez santos et al., 2019). El bloqueo en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial se ve reflejado en la disminución del consumo de oxígeno en estado 3 (en presencia de ATP), así como en la inhibición de la actividad en la NADH oxidasa (~30%) y la NADH citocromo c

reductasa (~41%). Bloqueando así el paso de electrones desde el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Álvarez santos et al., 2019)

Figura 13

Híbridos de THQ-isoxazol con actividad anticancerígena en hepatocarcinoma humano, Hep-G2

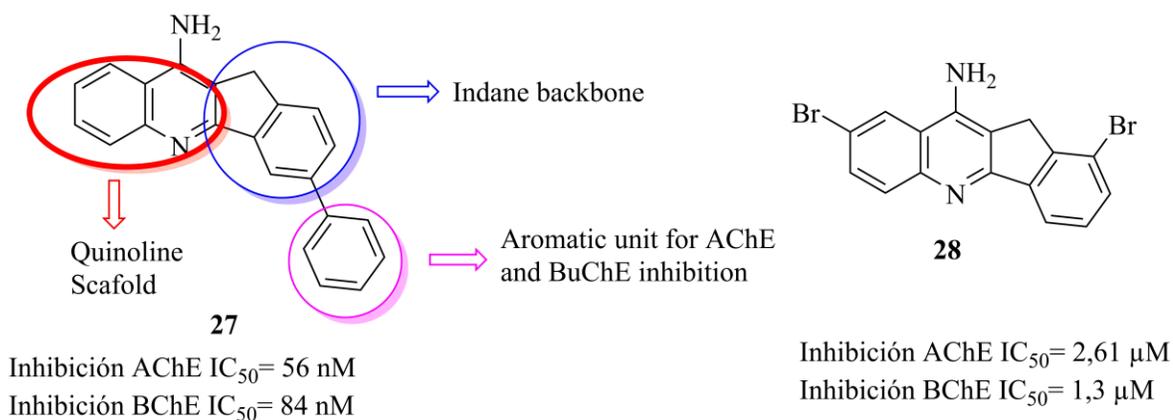


Nota: tomado de (Álvarez santos et al., 2019).

1.1.2.3. Indenoquinolinas. Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos heterociclos que contienen nitrógeno dentro de su estructura han llamado la atención por la amplia gama de actividades biológicas que presentan sus derivados. En los últimos años, los sistemas de anillos fusionados como la familia de las quinolinas han sido estudiados extensamente debido a sus diversas aplicaciones en la química de coordinación, química analítica y por su puesto en la quimioterapia. Además, los diversos derivados de la familia de las quinolinas han presentado excelente actividad biológica en el área farmacéutica, como actividad antibacteriana, antituberculosis, antiviral, antiparasitaria, antimalárica y como se mencionó anteriormente este farmacóforo es ampliamente conocido por su actividad anticancerígena (Aggarwal & Khurana, 2017). Adicionalmente, se ha diseñado una variedad de derivados de indenoquinolina para el tratamiento del Alzheimer. Es así como Ekiz y colaboradores diseñaron los compuestos 27 y 28 (Figura14), como agentes potenciales para el tratamiento de esta enfermedad a partir de derivados de indenoquinolinas con efecto inhibitorio frente a acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BChE) y anhidrasa carbónica con IC_{50} en el rango entre los 37 -200 nM (Ekiz et al., 2018).

Figura 14

Derivados de indenoquinolinas con actividad inhibitoria frente AChE y BuChE



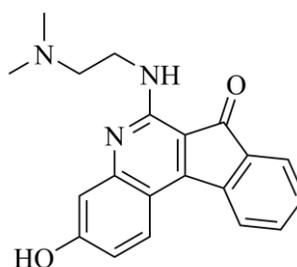
Nota: tomado de (Ekiz et al., 2018)

Por otra parte, respecto a los derivados de indenoquinolina con actividad anticancerígena, quizá el derivado más conocido es el fármaco antitumoral **TAS-103** (Figura 15). Este fármaco ha demostrado tener un potente efecto citotóxico frente diversas líneas celulares cancerígenas entre ellas, cáncer gástrico (AZ521, TMK-1), colon (HCT116, HT-29, COLO 320DM, y LoVo), pulmón (A549) y seno (MDA-MB-435S), en concentración IC_{50} en el rango de 0,4 – 1,4 μ M y en algunos de los casos su efecto es 20 veces más fuerte que el etopósido IC_{50} 0,9 – 10,9 μ M. Además, el estudio de su mecanismo de acción señala que la exposición al TAS-103 inhibe el crecimiento tumoral en células cáncer gástrico AZ521, cerca del ~70% después del tratamiento a 20 μ M durante 24 h , así como la inducción de mecanismo de muerte celular por apoptosis mediado por proteínas de la familia Bcl-2 (Ohyama et al., 1999). Adicionalmente, el antitumoral TAS-103 es ampliamente conocido por su efecto inhibitorio sobre las topoisomerasas I y II (Fortune et al., 1999). Las topoisomerasas, son enzimas encargadas de interactuar con las hebras del ADN

afectando su topología permitiendo de tal forma la replicación del mismo y a su vez la síntesis de proteínas convirtiéndose en diana significativa de agentes anticancerígenos como el TAS-103, para el cual estudios han demostrado su efecto inhibitorio frente a las topoisomerasas I y II (Fortune et al., 1999; Ishida & Asao, 2002; Ohyama et al., 1999).

Figura 15

Estructura del fármaco antitumoral TAS-10



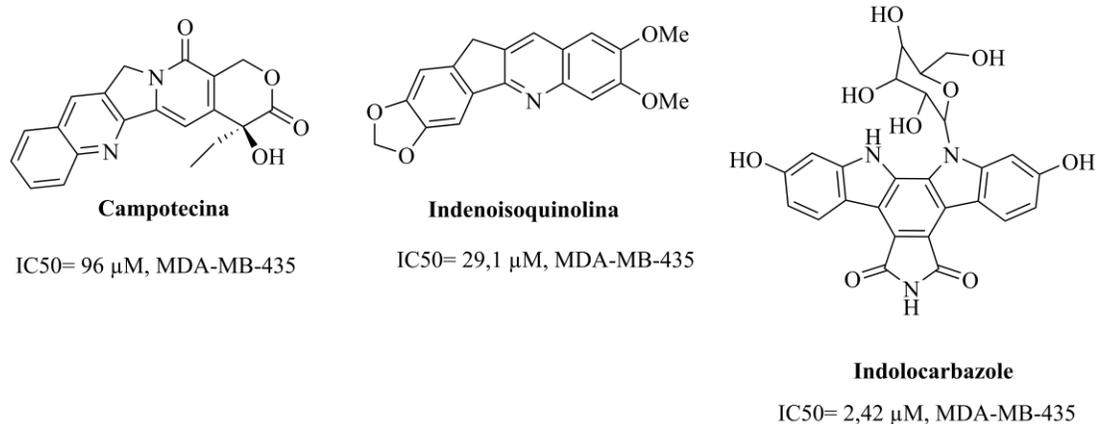
Inhibición topoisomerasa II, $IC_{50} = 4 \mu M$

Nota: , tomado de (Ishida & Asao, 2002)

Así, derivados de indenoquinolina y un gran número de alcaloides han demostrado tener efecto anticancerígeno, teniendo como mecanismo de acción la inhibición de las topoisomerasas. Este mecanismo también es empleado por diferentes compuestos antitumorales como la camptotecina, derivados de indenoisoquinolina e indolocarbazol (Figura 16), quienes se une al complejo Topo I-ADN inhibiendo las etapas de replicación del ADN (Marchand et al., 2006; Staker et al., 2005). La topoisomerasa I es inhibida mediante la formación de puentes de hidrógeno con los residuos asparagina 722, aspartato 533 y arginina 364, tal y como lo revelan estudios de docking en el complejo formado por la enzima y el ADN (Figura 17), encontrándose para el caso de la camptotecina solo el enantiómero *S* es activo, indicando la especificidad del sitio de unión al fármaco (Marchand et al., 2006; Pommier, 2006).

Figura 16

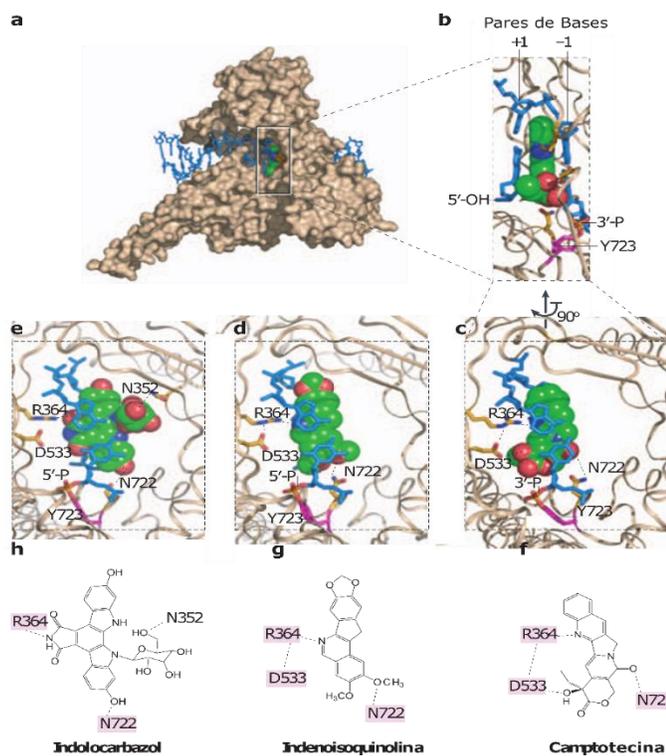
Derivados con efecto inhibitorio sobre el complejo Topo I-ADN



Nota: tomado de (Marchand et al., 2006; Pommier, 2006)

Figura 17

Estructura cristalina de la enzima Topo I y análisis docking de los respectivos ligandos con actividad inhibitoria.

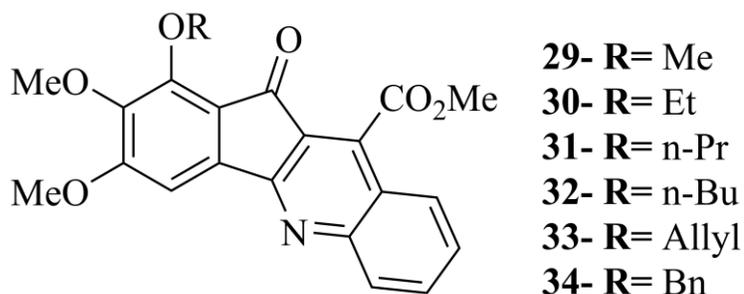


Nota : tomado de (Pommier, 2006)

Adicionalmente, Chakrabarty y colaboradores., 2013 reportaron la síntesis y actividad anticancerígena de los compuestos tetracíclicos **29-34** (Figura 18) frente a las líneas de adenocarcinoma de pulmón (A549) $IC_{50}= 0,005 - 0,098 \mu M$, mama (MCF-7) $IC_{50}= 0,002 - 0,04 \mu M$ y cérvix (HeLa) $IC_{50}= 0,006 - 0,11 \mu M$. Encontrando que la actividad citotóxica para estos compuestos en algunos casos es mejor que compuestos de referencia como la camptotecina con $IC_{50}= 0,02 - 0,05 \mu M$ (Chakrabarty, Croft, Marko, & Moyna, 2013).

Figura 18

Derivados de indenoquinolina con actividad anticancerígena



Nota: tomado de (Chakrabarty et al., 2013)

El conocimiento de las diferentes actividades biológicas presentadas por los farmacóforos tetrahydroquinolina, isoxazolina e indenoquinolina, permite un mejor abordaje a los posibles tipos de muerte celular inducidos después del tratamiento con nuestros híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina, así como nuestra familia de compuestos indenoquinolínicos. Por esta razón a continuación, se presenta una breve reseña con los principales tipos de muerte celular, sus características morfológicas y moleculares y su rol en el tratamiento del cáncer.

1.1.3. Muerte celular y su rol en el tratamiento contra el cáncer

La muerte celular es una consecuencia inevitable en la vida celular, conociéndose que la muerte celular regulada (RCD por sus siglas en inglés “regulated cell death”) no es la única forma de muerte en la célula, y que tiene como objetivo mantener la homeostasis en condiciones fisiológicas y patológicas (Tang, et al., 2019). A diferencia de la forma de muerte celular accidental (ACD, por sus siglas en inglés “accidental cell death”) que se basa en la muerte de las células de forma espontánea y catastrófica después de la exposición a condiciones físicas adversas (alta presión, temperaturas, cambios fuertes de pH). Por su parte, la muerte celular regulada posee un mecanismo molecular que puede ser modulado (retrasada o acelerada) por fármacos, desencadenando procesos como la inducción de apoptosis por vía extrínseca mediante la unión a receptores de muerte ubicados en la superficie de la membrana plasmática como TRAIL-R, y TNF (Cippà & Fehr, 2017). De igual forma, la activación de la muerte celular regulada se puede generar por perturbaciones exógenas, así como en respuesta a la exposición intensa y prolongada a procesos de estrés, entre otros (Lorenzo Galluzzi, Bravo-San Pedro, Kepp, & Kroemer, 2016; Lorenzo Galluzzi et al., 2018).

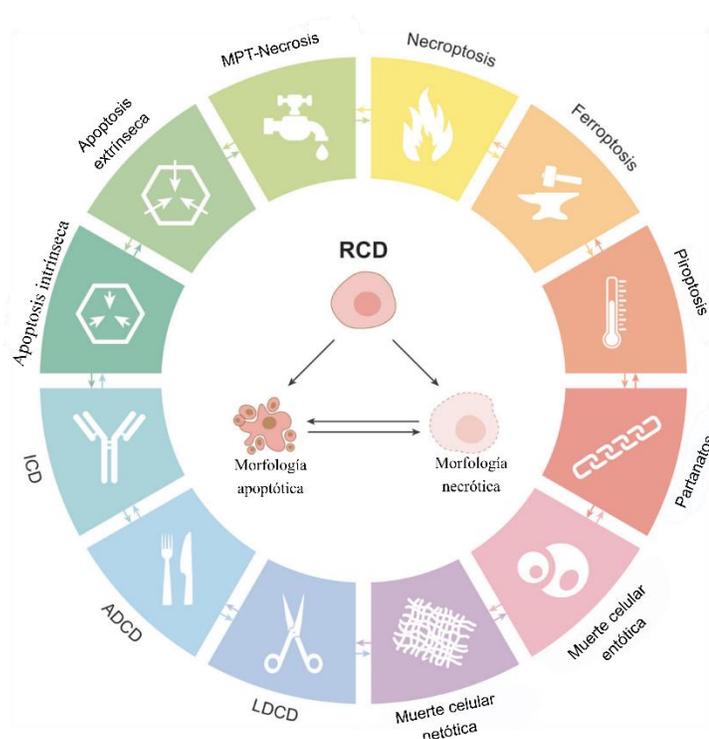
La muerte celular se manifiesta con alteraciones morfológicas macroscópicas que se han empleado para clasificar la muerte celular en 3 formas diferentes: Muerte celular tipo I o apoptosis, que se caracteriza por generar encogimiento citoplasmático (picnosis), fragmentación nuclear (cariorrhexis) y la formación de ampollas en la membrana celular conocidas como cuerpos apoptóticos que pueden ser reconocidos por células vecinas con actividad fagocítica y degradarlas

en los lisosomas; Muerte celular tipo II o autofagia, que se caracteriza por una excesiva vacuolización citoplasmática y que culmina de forma similar con fagocitosis y degradación lisosomal; y el tipo de muerte celular tipo III o necrosis la cual no presenta características morfológicas similares a los anteriores tipos de muerte eliminando las células por procesos distintos a fagocitosis y degradación lisosomal (L. Galluzzi et al., 2007; Schweichel & Merker, 1973).

Cabe destacar que la anterior clasificación aun es ampliamente empleada a pesar de las múltiples limitaciones y advertencias sobre su uso. Es por eso por lo que, a partir del 2005, el comité de nomenclatura en muerte celular (NCCD, por sus siglas en inglés “the nomenclatura committe on cell death”) se reúne de forma regular con el fin de abordar la problemática en la nomenclatura y tipos de muerte celular basados en sus características fisiológicas, bioquímicas y causas farmacológicas involucradas. Galluzzi y colaboradores., 2018 propusieron una nueva clasificación en los procesos de muerte celular (Figura 19), basados en los aspectos moleculares y esenciales dentro del proceso de muerte celular, enfocándose en las señales de transducción involucradas en el inicio del proceso de muerte, la ejecución y la propagación, así como la relevancia histopatológica de cada uno de los tipos de muerte celular regulada (Lorenzo Galluzzi et al., 2018).

Figura 19

Principales vías de muerte celular propuesta por Galluzzi y colaboradores.



Nota: **ADCD**: Muerte celular dependiente de autofagia, **ICD**: Muerte celular inmunogénica, **LDCD**: Muerte celular dependiente de lisosoma, **MPT-Necrosis**: transición de la permeabilidad mitocondrial inducida por necrosis. Tomado y adaptado de (Lorenzo Galluzzi et al., 2018)

Galluzzi y colaboradores., 2018 explican que cada uno de los diferentes tipos de muerte celular propuesto es iniciado y propagado por mecanismos moleculares que exhiben cierto grado de conectividad. Además, que cada tipo de muerte celular puede manifestar un amplio espectro de características morfológicas que van desde el rango de completa apoptosis a completa necrosis y perfiles inmunomoduladores que van desde antiinflamatorios hasta proinflamatorio (Lorenzo

Galluzzi et al., 2018). Es por esto por lo que a continuación se abordarán algunos de los principales tipos de muerte celular.

1.1.3.1. Apoptosis intrínseca. Dentro de los principales tipos de muerte propuestos por Galluzzi y colaboradores., 2018 se encuentra la apoptosis intrínseca, iniciada por una gran variedad de perturbaciones microambientales que incluyen, insuficiencia en factores de crecimiento, daño en el ADN, estrés en el retículo endoplasmático, producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) o defectos mitóticos, entre otros (Pihán, Carreras-Sureda, & Hetz, 2017). Las células apoptóticas mantienen la integridad de su membrana celular y su actividad metabólica hasta cierto grado cuando finaliza su función, lo que *in vivo* significa la degradación por macrófagos u otras células con actividad fagocítica. En procesos *in vitro*, la fase final de la apoptosis es generalmente seguida por una completa ruptura de la membrana celular adquiriendo una morfología necrótica (Brumatti, Salmanidis, & Ekert, 2010; Czabotar, Lessene, Strasser, & Adams, 2014; Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Pihán et al., 2017).

Puntualmente, en la apoptosis intrínseca la mitocondria juega un papel importante regulando la permeabilización de su membrana externa, la cual es controlada por los miembros de la familia de proteínas BCL-2. La familia de proteínas BCL-2 se divide en anti apoptóticas y pro apoptóticas. Dentro de los miembros anti apoptóticos se encuentran proteínas como, Bcl-2 y Bcl-X_L, mientras que en los miembros pro apoptóticos encontramos proteínas como Bax, Bak, Puma, Bid, y Bad (Berridge, 2014).

En respuesta a un estímulo apoptótico, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa es regulada principalmente por Bak y Bax, quien junto con Bok, son los únicos miembros

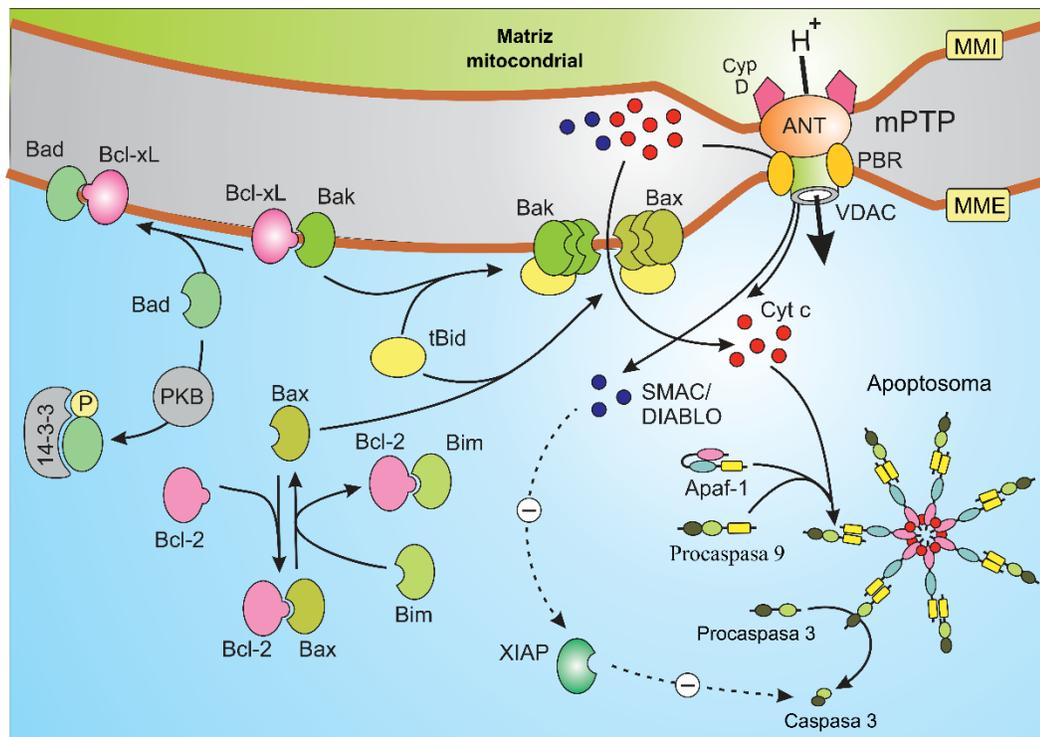
de la familia Bcl-2 con la característica de formar poros en la membrana mitocondrial (Garrido et al., 2006; Webster, 2013). En condiciones fisiológicas Bax se encuentra en un ciclo continuo entre la membrana mitocondrial externa y el citosol, donde se encuentra en su conformación dimérica inactiva. En contraste, Bak reside de forma continua en la membrana mitocondrial aunque cabe destacar que algunos artículos han documentado cierto grado de translocación de Bak hacia el citosol (Todt et al., 2015). Una vez se ha iniciado el estímulo apoptótico la translocación de Bax y Bak cesa y experimentan una activación de forma directa o indirecta por otros miembros de la familia Bcl-2 experimentando perturbaciones en la homeostasis actuando así como transductores de la señal de estrés (Bouillet, Metcalf, & Huang, 1999; Purton et al., 2002). En este caso estos miembros de la familia Bcl-2 (PUMA, BIM, BID, NOXA) comparten la habilidad de interactuar con las proteínas Bak y Bax activándolas mediante una serie de cambios conformacionales (Czabotar et al., 2014). No obstante, la formación del poro mitocondrial puede ser inhibido por los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (donde se incluyen Bcl-2, Bcl-2 like 1, Bcl-X_L), las cuales generalmente se encuentran en la membrana mitocondrial externa o en el retículo endoplasmático (Todt et al., 2015). Estos miembros de la familia Bcl-2 anti-apoptóticos tienen como propósito promover la supervivencia celular mediante la regulación del Ca²⁺ en el retículo endoplasmático, contribuir en el balance redox, entre otras (Czabotar et al., 2014; Edlich et al., 2011; Pihán et al., 2017).

Una vez se ha realizado la oligomerización de Bax y Bak (Figura 20), la permeabilización de la membrana mitocondrial permite la liberación de factores proapoptóticos que generalmente residen en el interior de la mitocondria, dentro de estos factores se encuentran el citocromo c que normalmente actúa como aceptor de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, y la proteína mitocondrial secundaria activadora de caspasas (SMAC, por sus siglas en inglés “second

mitochondria-derived of caspases”) (Kantrow & Piantadosi, 1997; Morin, Pires, Plin, & Tillement, 2004). Posteriormente, el citocromo c en el citosol se une al factor de activación de la peptidasa apoptótica 1 (Apaf1 de sus siglas en inglés “apoptosis protease-activating factor 1”) formando un complejo supramolecular conocido como apoptosoma, responsable de la activación de la pro-caspasa 9 (Berridge, 2014; Lorenzo Galluzzi, Kepp, & Kroemer, 2016; Shamas-Din, Kale, Leber, & Andrews, 2013).

Figura 20

Mecanismo de los miembros de la familia Bcl-2 en la formación del poro de permeabilidad mitocondrial, liberación de citocromo c y formación del apoptosoma



Nota: Tomado y adaptado de (Berridge, 2014)

Acto seguido a la activación de la caspasa 9, ésta puede catalizar la activación proteolítica de las procaspasas 3 y 7 quienes se encargarán de terminar la ejecución del proceso apoptótico por vía intrínseca y extrínseca también, siendo conocidas como las caspasas efectoras (Saxena et al., 2009). Por su parte, el SMAC liberado al citosol también puede generar la activación de la apoptosis mediante la asociación a proteínas incluyendo el inhibidor de apoptosis X-linked (XIAP de sus siglas en inglés “x-linked inhibitor of apoptosis protein”) convergiendo también en la activación de las caspasas efectoras. La activación catalítica de las caspasas efectoras conducen a la célula a la muerte, y están correlacionadas con los cambios morfológicos y cambios bioquímicos durante la apoptosis incluyendo la fragmentación del ADN, exposición de la fosfatidilserina (PS) y formación de cuerpos apoptóticos (Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Nagata, 2005). En resumen, el comité de nomenclatura de muerte celular (NCCD) define la apoptosis por vía intrínseca como un proceso de muerte celular regulada iniciada por perturbaciones en el microambiente intracelular o extracelular, caracterizado principalmente por la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, precipitación y activación de caspasas principalmente la caspasa 3 (Bouillet et al., 1999; Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Shamas-Din et al., 2013).

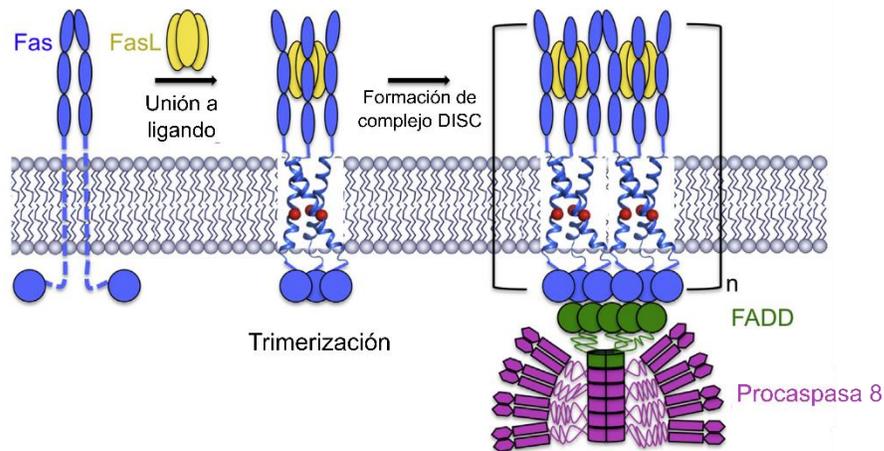
1.1.3.2. Apoptosis extrínseca. La apoptosis extrínseca es un proceso de muerte celular regulado que generalmente se inicia por perturbaciones en el microambiente extracelular. La apoptosis extrínseca se lleva a cabo mediante la acción de 2 tipos de receptores de membrana; (i) receptores de muerte, cuya activación depende de la unión de ligandos específicos; (ii) receptores de dependencia, los cuales son activados cuando se produce una disminución en los niveles de un ligando específico por debajo del umbral permitido (Ashkenazi, 2006; Flusberg & Sorger, 2015; Lorenzo Galluzzi et al., 2018).

Los receptores de muerte incluyen a Fas (también conocido como FAS, CD95 o APO-1), y la superfamilia de receptores de muerte TNF 1A (también conocido como TNFR1), 10a (TRAILR1 o DR4), y 10b (TRAILR2 o DR5) (Fu et al., 2016). En general, la unión del respectivo ligando al receptor de muerte celular permite el ensamblaje en la zona intracelular del receptor de un complejo proteico denominado complejo inductor de muerte (DISC de sus siglas en inglés), el cual opera como plataforma molecular en la activación y regulación de la caspasa 8 (CASP8) (Kischkel et al., 2000). La activación del receptor de muerte genera como resultado el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como el dominio de muerte asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRADD), o el dominio de muerte asociado al Fas (FADD) quienes se unen al dominio de muerte (DD) del receptor tetramérico TNF. Posteriormente, se realiza el reclutamiento de la pro-caspasa 8 dando paso a la formación del complejo DISC mencionado anteriormente (Figura 21) (Boldin et al., 1995; Fu et al., 2016; Kischkel et al., 2000). Una vez activado el complejo DISC, la apoptosis extrínseca puede seguir dos rutas diferentes (Figura 22). En algunos tipos de células como los timocitos y linfocitos maduros, la actividad proteolítica de la caspasa 8 permite la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 impulsando el proceso de muerte celular regulada que no puede ser inhibida incluso por la sobreexpresión de proteínas Bcl-2 anti

apoptóticas (Lenardo et al., 2002). No obstante el complejo de muerte DISC puede ser inhibido por la acción de la proteína inhibidora cFLIP justo antes de la activación de la caspasa 8 (Lorenzo Galluzzi et al., 2018).

Figura 21

Unión de ligando Fas al receptor de muerte y formación del complejo inductor de muerte DISC.



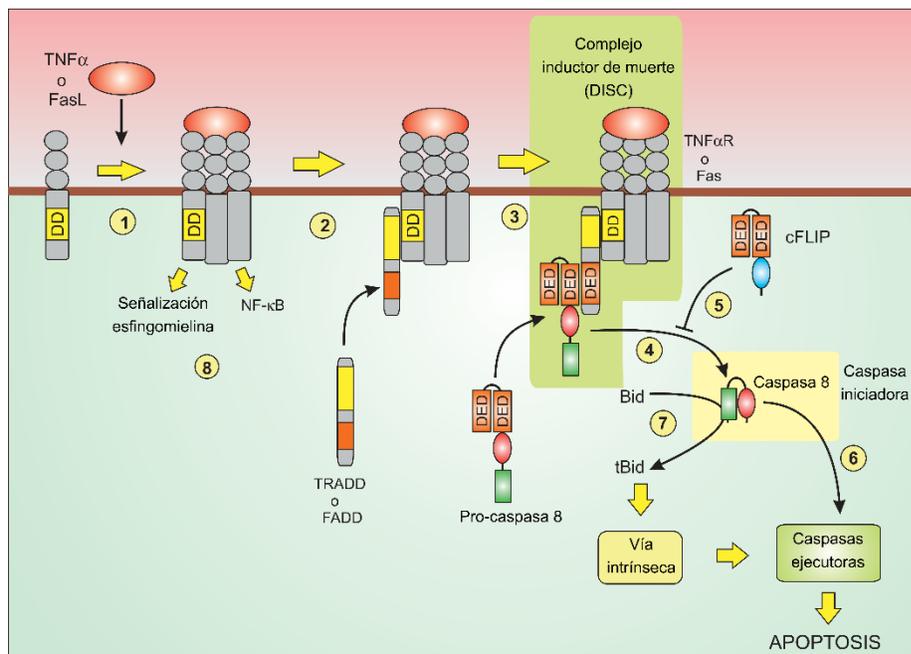
Nota: Tomado y adaptado de (Fu et al., 2016)

Por otra parte, en los hepatocitos, las células pancreáticas β y en la gran mayoría de células cancerígenas, la activación de las caspasas 3 y 7 está restringida por el inhibidor de apoptosis X-linked (XIAP) y la escisión de la proteína Bid por la caspasa 8 (Morin et al., 2004). Esta escisión genera la forma truncada de la proteína Bid (tBid) que se transloca a la membrana externa mitocondrial, una vez allí interactúa con Bax/Bak generando la despolarización de la membrana mitocondrial, la salida de agentes apoptóticos, la activación de la caspasa 9 y finalmente muerte celular (Desagher & Martinou, 2000; Reed, Jurgensmeier, & Matsuyama, 1998). En resumen, se define la muerte celular apoptótica extrínseca como un tipo de muerte celular regulada iniciada por perturbaciones en el microambiente extracelular, principalmente detectada por receptores

acoplados a membrana y el propagador de esta señal es la caspasa 8 (convergiendo con la muerte apoptótica intrínseca) y consecuentemente la activación de la caspasa 3 (Berridge, 2014; Lorenzo Galluzzi et al., 2018).

Figura 22

Mecanismo de activación de la muerte celular apoptótica extrínseca



Nota: Tomado de (Berridge, 2014)

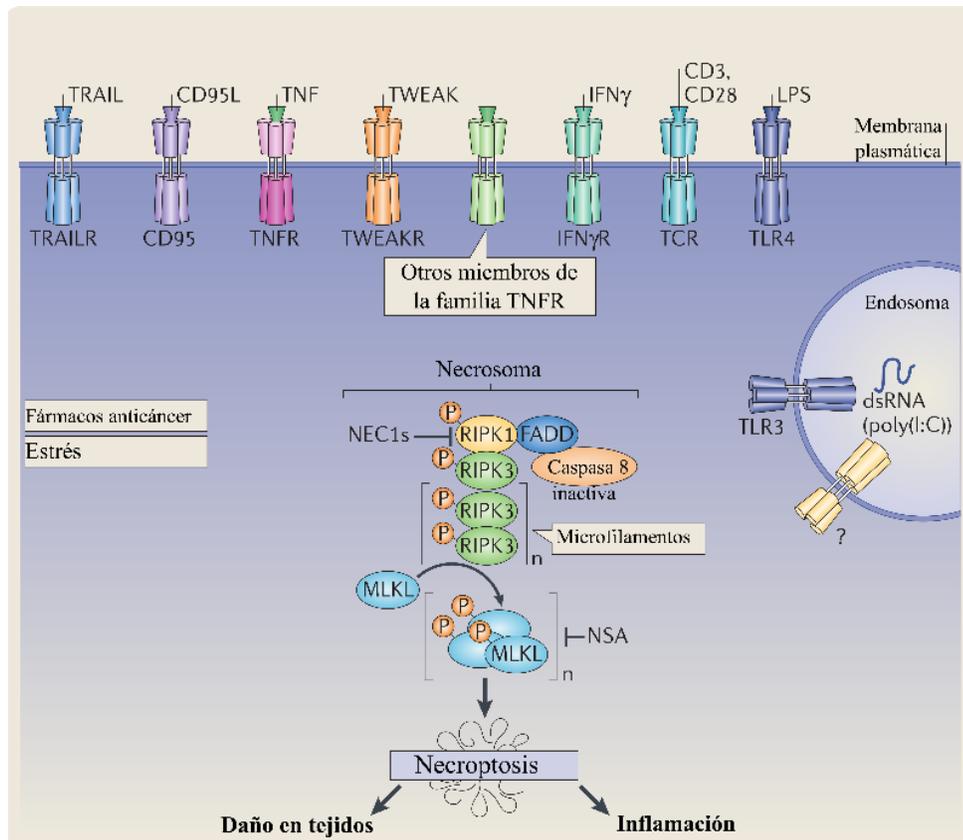
1.1.3.3. MPT-Necrosis inducida por la transición de permeabilidad mitocondrial. La inducción de muerte celular necrótica mediada por la transición de permeabilidad mitocondrial es un tipo de muerte celular regulada, iniciada generalmente por perturbaciones como estrés oxidativo severo y aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol, caracterizada por presentar morfología necrótica (Berghe, Linkermann, Jouan-Lanhouet, Walczak, & Vandenabeele, 2014; Izzo, Bravo-San Pedro, Sica, Kroemer, & Galluzzi, 2016). El término MPT se refiere a la pérdida de la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna a pequeñas moléculas resultando una caída rápida del potencial de membrana $\Delta\psi$, ruptura de ambas membranas y muerte celular (Izzo et al., 2016). En otros términos, la MPT-necrosis se ha propuesto como un mecanismo de muerte generado por la formación de un complejo denominado poro de transición de permeabilidad (PTPC, por sus siglas en inglés “the permeability transition pore complex”), que se encuentra ensamblado entre la membrana mitocondrial interna y externa (Izzo et al., 2016). La composición, regulación y el mecanismo por el cual se forma el PTPC aún se encuentra en estudio y hasta la fecha solo se ha demostrado que la isomerasa peptidilprolil F (más conocida como ciclofilina D, CYPD) es requerida en ensayos *in vivo* para el ensamble del poro (Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Valentina Giorgio, Guo, Bassot, Petronilli, & Bernardi, 2018; Izzo et al., 2016). Además, se ha reportado la falla en la actividad la proteína integral transportador de nucleótidos de adenina (ANT) y la proteína mitocondrial externa (VDAC), encargados de formar el poro de transición de permeabilidad mitocondrial al momento de presentar un elevado estrés oxidativo o un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Báthori, Csordás, Garcia-Perez, Davies, & Hajnóczky, 2006; Cassago et al., 2012). También, se ha demostrado el rol de la ATPasa en la formación del PTPC, constituyendo la unidad de formación del poro mediante una interacción específica entre la CYPD y la cadena lateral de la F1Fo de la ATPasa (V. Giorgio et al., 2013;

Valentina Giorgio et al., 2017). De igual forma, se ha reportado otras estructuras moleculares que interactúan y regulan la MPT-necrosis. Estas estructuras incluyen: (i) miembros pro y anti apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax, Bak, BID, Bcl-2 y Bcl-X_L; (ii) La proteína Drp1 (proteína involucrada en la dinámica y fisión de la membrana mitocondrial), quien parece promover la apertura del PTPC en respuesta a una sobreestimulación de los receptores β -adrenérgicos mediante un mecanismo que se basa en la fosforilación de la Drp1 por la proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (conocida como CAMKII); finalmente (iii) p53, quien participa en la inducción de la MPT-necrosis por medio de interacción con la CYPD, demostrado en la patogénesis de accidentes cerebrovasculares en ratones (V. Giorgio et al., 2013; Karch et al., 2013; Xu et al., 2016). Por otra parte, al aumentar la concentración de Ca²⁺ al interior de la mitocondria el factor de intercambio de nucleótidos de guanina rap 3 (RAPGEF 3 o también conocido como EPAC1) parece desencadenar la apertura del PTPC, mediante la interacción con la proteína VDAC1, miembros de las proteínas de choque térmico Hspa9 y el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1 (Lorenzo Galluzzi et al., 2018). En resumen, se define la MPT-necrosis como un tipo de muerte celular regulada que se desencadena por la perturbación del ambiente intracelular caracterizado por la activación de la CYPD (Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Martin-Sanchez et al., 2018; Z. Wang et al., 2016).

1.1.3.4. Necroptosis. Adicional a la muerte celular por apoptosis y la necrosis mediada por la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, se define la necroptosis como un tipo de muerte celular regulada, desencadenado por la perturbación en el microambiente extracelular o intracelular detectado por receptores de muerte dentro de los cuales se incluyen FAS o TNFR1; también por receptores de reconocimiento a patógenos (PRRs de sus siglas en inglés) como TLR3 y TLR4 (Lorenzo Galluzzi, Kepp, Krautwald, Kroemer, & Linkermann, 2014). El término necroptosis fue inicialmente introducido en 2005 para indicar un proceso de muerte celular que depende de la activación de la proteína RIPK3 y la pseudoquinasa MLKL (Krysko et al., 2017). Tras el inicio del proceso necroptótico por el receptor de muerte TNFR1, y la quinasa RIPK3, activada por medio de la quinasa RIPK1 (manteniendo la caspasa 8 inactiva) y su interacción entre sus respectivos dominios RIP, se forma lo que se conoce como necrosoma (Figura 23) (Li et al., 2012; Vandenabeele, Declercq, Herreweghe, & Berghe, 2010).

Figura 23

Vía de activación de la necroptosis y formación del necrosoma



Nota: Tomado y adaptado de (Berghe et al., 2014)

Además, como se observa en la figura 23 la quinasa RIPK3 puede ser activada de forma alternativa mediante la interacción con el receptor TLR3 contenido en los endosomas o miembros de la familia TLR como TLR4 presente en la membrana celular. Una vez la proteína RIPK3 se encuentra activa, cataliza la fosforilación de la proteína MLKL dando paso a la formación de un oligómero, que se transloca a la membrana plasmática y se une mediante residuos específicos a especies de fosfatidilinositol fosfato generando un aumento en la permeabilidad de la membrana celular (Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Murphy et al., 2013; Rodriguez et al., 2016). Y aunque se

ha demostrado el rol que ejerce la proteína MLKL en la inducción de la necroptosis mediante su inhibición con necrosulfonamida (NSA), el mecanismo por el cual la proteína MLKL ejecuta la necroptosis aún no está del todo claro (Lorenzo Galluzzi et al., 2018). Además, se ha reportado que después de la oligomerización de la proteína MLKL se promueve una entrada de Ca^{2+} probablemente mediada por familia de los receptores TRPM7, y exposición de residuos de fosfatidilserina (PS) mediado por la proteína MLKL, quien después activará las proteasas de la familia ADAM presentes en la membrana celular generando ruptura de esta (Krysko et al., 2017). Adicionalmente, estudios habían reportado la participación de PGAM, miembro de la familia 5 serina/treonina fosfatasa mitocondrial (PGAM5) junto con la proteína DRP1 en la fragmentación de la mitocondria durante la necroptosis, quedando más adelante invalidados demostrando que la necroptosis es un proceso de muerte celular que ocurre independientemente de la mitocondria (Gongo et al., 2017; Murphy et al., 2013; Remijnsen et al., 2014). Por esto, en resumen se define la muerte celular por necroptosis como el proceso iniciado por perturbaciones en el ambiente extracelular o cambios en la homeostasis intracelular que producen la activación de proteínas críticas como MLKL, RIPK3 y RIPK1 (Lorenzo Galluzzi et al., 2018).

1.1.3.5. Relevancia de la necroptosis en cáncer. Al igual que la apoptosis, la necroptosis ha surgido como un aliado en la lucha contra el cáncer dado que se ha encontrado que la inducción de necroptosis favorece la reducción del crecimiento tumoral en ciertos tipos de cáncer como el glioblastoma, donde la proteína RIPK1 se encuentra comúnmente sobre expresada (Martin-Sanchez et al., 2018; Park et al., 2009). Así, la inducción o manipulación de la necroptosis en el tratamiento anticáncer representa un alternativa promisorio, especialmente cuando se presenta resistencia a la inducción de muerte por apoptosis (Gong et al., 2019; Strilic et al., 2016). De esta forma la inhibición de esta vía de muerte celular puede representar una alternativa en el tratamiento del cáncer. Así, Liu y colaboradores., 2016 reportaron que la inhibición de los componentes esenciales para la formación del necrosoma, por medio del silenciamiento de genes como el gen *RIPK3* en algunas líneas de cáncer de mama como MDA-MB-231 genera una mayor sensibilidad a la radio terapia (Geserick et al., 2015; X. Liu et al., 2016).

Adicionalmente, como alternativa al tratamiento en cáncer se postula la inducción de la necroptosis. Por esto, dentro de los compuestos que inducen necroptosis se incluyen algunos productos naturales como la Staurosporina (STS), alcaloide originalmente aislado de la bacteria *Streptomyces staurosporeus* y que se ha reportado induce principalmente apoptosis en células de teratocarcinoma humano (NT2) (Bertrand, Solary, O'connor, Khon, & Pommier, 1994). Además, Dunai y colaboradores., 2012 reportaron la inducción de necroptosis dependiente de RIPK1 y MLKL por Stausporina cuando hay cierto compromiso en la activación de caspasas en células de leucemia U937 (Dunai et al., 2012). Asimismo, el Neoalbacinol (NA), compuesto aislado del hongo *Albatrellus confluens* genera necroptosis al regular el metabolismo energético en células cancerígenas. El NA genera necroptosis mediante la secreción de la proteína TNF α que regula la vía RIPK/NF-k β y activa RIPK3, también acompañado de un aumento en las especies reactivas de

oxígeno (X. Yu et al., 2015). En conclusión, aun no se ha aclarado completamente el rol de la necroptosis en el tratamiento contra el cáncer. Aunque algunos reportes muestran evidencia sobre efectos anticancerígenos al inducir necroptosis, también se ha reportado que promueve la progresión tumoral y metástasis sugiriendo que hay que contextualizar el papel de la necroptosis en tipos específicos de cáncer. En consecuencia, se presenta la necesidad de identificar un biomarcador específico de necroptosis, su mecanismo molecular y roles específicos para desvelar la importancia de este mecanismo de muerte en cáncer y así poder enfocar el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales (Gong et al., 2019; Krysko et al., 2017).

1.1.3.6. Muerte celular dependiente de autofagia. El suministro constante de energía para la célula juega un papel importante en la supervivencia de esta, por tal motivo existe una red metabólica encargada de coordinar este aspecto. Durante periodos de inanición, la célula puede obtener energía mediante el uso de la reserva de glucógeno y ácidos grasos. Sin embargo, cuando estas reservas se agotan la supervivencia de la célula se puede prolongar un poco más mediante el proceso denominado autofagia, donde la célula metaboliza sus componentes citoplasmáticos (Berridge, 2014).

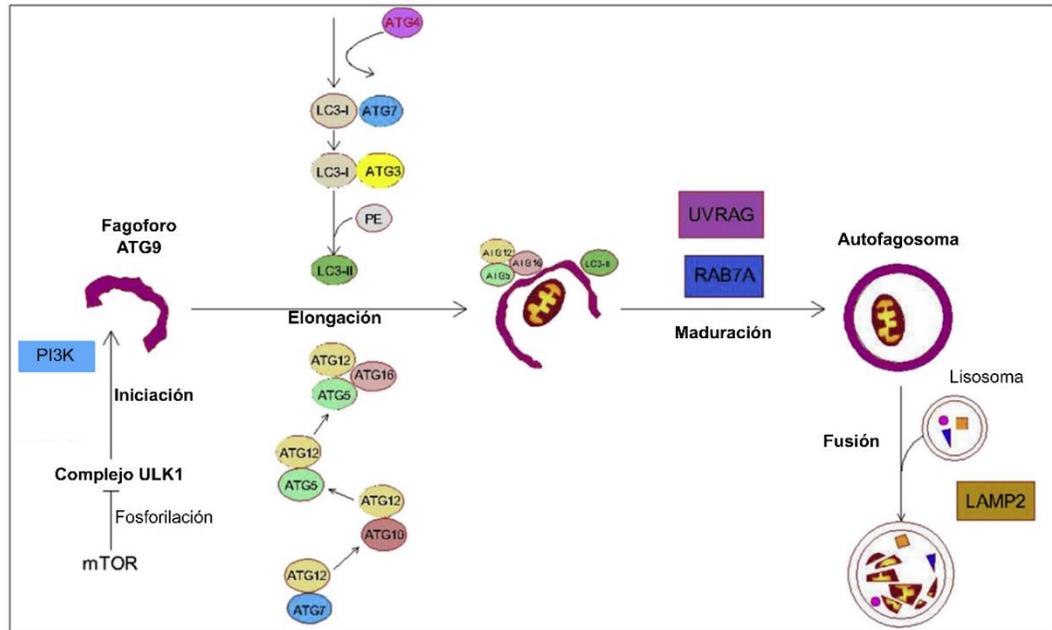
La autofagia se encuentra relacionada con procesos fisiológicos que incluyen la supervivencia, el metabolismo, la infección y el envejecimiento. Suele producirse debido a la escasez de nutrientes, la estimulación por fármacos, envejecimiento, diferenciación y la inmunidad. Por otra parte, alteraciones en esta vía de muerte están asociadas al desarrollo de diferentes patologías entre ellas el cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades neurodegenerativas (Lorenzo Galluzzi et al., 2018).

Actualmente, se han identificado tres distintos mecanismos mediante el cual se lleva a cabo la autofagia; El primero es la macro-autofagia, caracterizado por el daño en las proteínas y organelas celulares. Esta vía ocurre mediante la formación de un autofagosoma; Segundo, la micro-autofagia, esta vía ocurre a través de la invaginación y separación de la membrana lisosomal; y finalmente, la autofagia mediada por chaperonas. En esta vía se permite la translocación mediada por lisosomas de la proteína KFERQ-like (Sever & Demir, 2017).

El mecanismo mediante el cual procede la autofagia se puede resumir en la formación de los siguientes sistemas: Formación del complejo mTor, conformado por los complejos de las quinasas ATG-1, ATG-13, ATG-17; Formación del complejo PI3K, con las proteínas ATG-6, formando un complejo que regula la actividad de la fosfatidilinositol-3-quinasa; la formación de dos sistemas de ubiquitina. La formación de estos complejos se realiza en 4 pasos en el interior de la célula (Figura 24) mediante la nucleación, elongación de la membrana, fusión con el lisosoma y finalmente la degradación de las organelas dentro del autofagosoma (Gonzalez-Polo et al., 2005; Sever & Demir, 2017).

Figura 24

Vía de señalización de la autofagia



Nota: tomado y adaptado de (Sever & Demir, 2017)

Como se observa en la figura 24, el complejo mTOR juega un rol importante en la regulación del inicio de la autofagia. El complejo mTOR es una quinasa que controla el crecimiento y la síntesis de proteínas en la célula, por ende, la supresión de mTOR genera como resultado la activación de la autofagia (Chaabane et al, 2013). El proceso de inanición se encuentra asociado a pérdida en la actividad de mTOR, así como a la desfosforilación de ATG-13, lo que lleva a la unión con ATG-1 generando el inicio de la autofagia mediante la formación del complejo ULK1 y su interacción con el complejo mTOR y la quinasa AMPK (Mulakkal et al., 2014). Adicionalmente, otra vía importante en la proliferación que se encuentra asociada con la regulación de la autofagia es la vía de PI3K, que activa la vía de la proteína Akt/PkB, quien a su vez inhibe el proceso de la autofagia mediante la interacción y posterior activación de mTOR (Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Sever & Demir, 2017). Además, se ha reportado que la autofagia

se puede producir en paralelo con otros tipo de muerte como la apoptosis o necroptosis, por ejemplo en células de sarcoma de Kaposi tratadas con Imatinib (Basciani et al., 2007).

1.1.3.7. Otros tipos de muerte celular regulada. Adicional a los tipos de muerte aquí mencionados, Galluzzi y colaboradores., 2018 definen diferentes tipos de muerte celular regulada para la NCCD donde cada tipo de muerte cuenta con sus características morfológicas propias. Dentro de esos tipos de muerte encontramos la ferroptosis, caracterizada por la producción de especies reactivas de oxígeno dependientes de hierro y la acción de las lipooxigenasas generando las especies oxidadas de fosfatidiletanolamina que impulsan la ejecución de la ferroptosis (Lorenzo Galluzzi et al., 2018). Además, se define la piroptosis como un tipo de muerte celular altamente inflamatorio ocurrido generalmente por la acción de agentes patógenos caracterizado por la activación de las caspasas 1 y 4, así como la producción de las interleuquinas IL-8 e IL-1 β (Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Krysko et al., 2017).

Teniendo en cuenta la información de marco de referencia, en el cual se expuso la realidad en cifras sobre el cáncer, las limitaciones en los tratamientos actuales, así como el interés en el desarrollo de nuevos compuestos promisorios en el tratamiento de esta enfermedad; en este primer capítulo se presenta la evaluación de la actividad anticancerígena de 16 compuesto de la familia de híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina, así como de 16 compuestos de una familia de compuestos de indenoquinolinas análogos al antitumoral TAS-103. Por eso, esta tesis doctoral planteó los siguientes objetivos con el fin de corroborar la hipótesis planteada, que los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/Isoxazolina y los derivados de las Indeno[2,1-c]quinolinas, presentan efectos citotóxicos sobre las líneas celulares tumorales A549, Hep-G2, HeLa, MCF 7 y B16F10. Además, inducen procesos de muerte celular programada, inhibiendo

rutas metabólicas involucradas en la proliferación celular o modulando las funciones de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la potencial actividad anticancerígena de nuevos híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina y una serie de derivados Indeno [2,1-c]quinolina sobre líneas celulares cancerígenas Hep-G2, A549, HeLa, MCF 7 y B16F10

1.2.2. Objetivos específicos

Establecer el efecto de ambas familias de compuestos heterocíclicos objeto de esta investigación, sobre la viabilidad celular en las diferentes líneas tumorales.

Evaluar los efectos causados por los compuestos con actividad citotóxica sobre la morfología celular.

Describir el mecanismo de muerte celular inducido por la acción de los compuestos más promisorios.

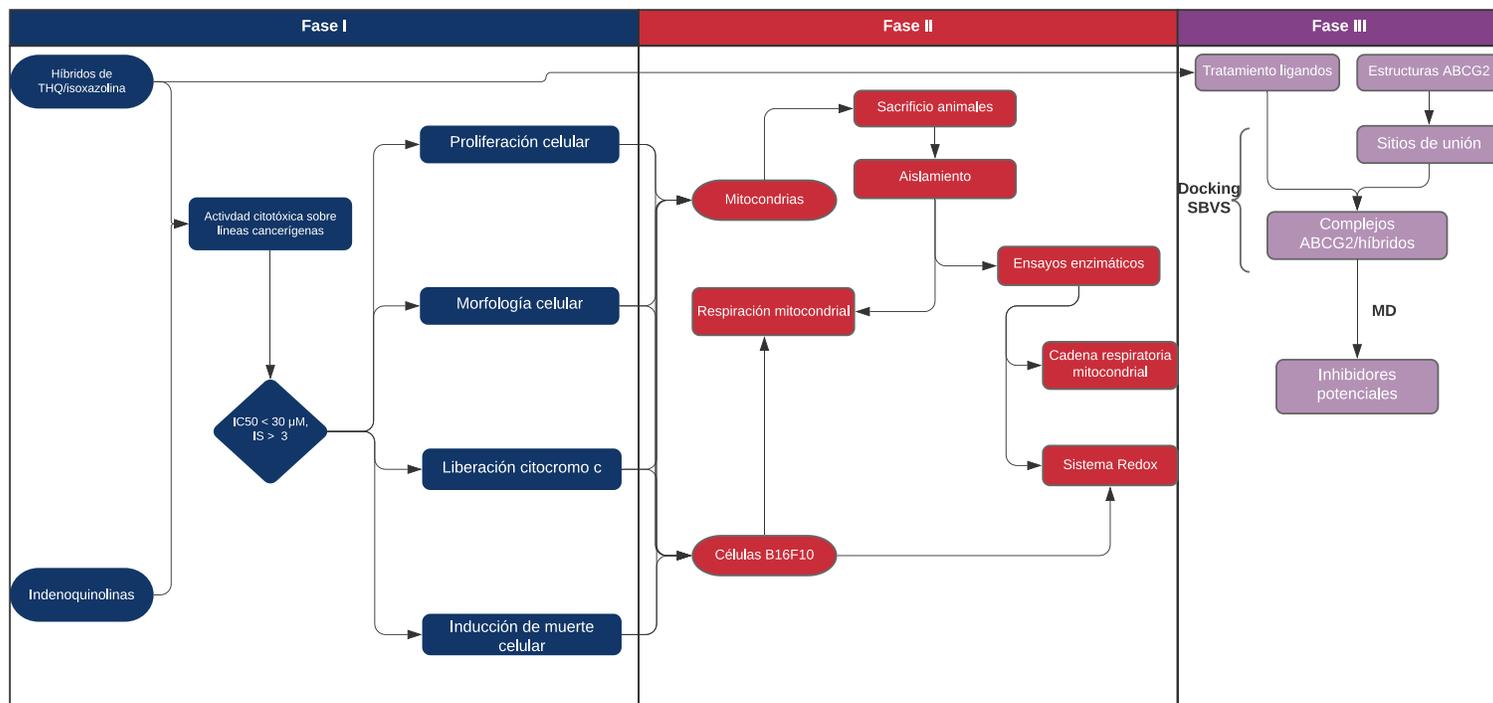
Proponer un mecanismo de acción para los compuestos más citotóxicos sobre el metabolismo celular (fosforilación oxidativa y glucólisis).

1.3. Materiales y métodos

Este estudio experimental se llevó a cabo en tres fases (Figura 25), correspondiendo cada fase a un capítulo dentro del cuerpo de esta tesis. En la fase I, se realizó una evaluación de la actividad citotóxica de las dos familias de compuestos, seleccionando los mejores candidatos de acuerdo a parámetros como el CC_{50} y el índice de selectividad (IS) respecto a la línea no cancerígena empleada (Vero). Posteriormente, a los compuestos promisorios se les evaluó su efecto sobre la morfología celular e inducción de muerte celular, para dar paso a la fase 2, en la cual se evaluó el efecto de los compuestos sobre la mitocondria como diana farmacológica en mitocondrias aisladas de hígado de rata y en la línea de melanoma murino B16F10. Finalmente, en la fase III se realizaron ensayos de modelado molecular para conocer los sitios de unión reportados para el transportador ABCG2, las interacciones de los híbridos moleculares sobre esos sitios de unión, y la estabilidad del complejo híbrido/ligando a lo largo del tiempo.

Figura 25

Diseño metodológico del estudio.



1.3.1. Compuestos heterocíclicos

Los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina e indenoquinolinas fueron inicialmente sintetizados, purificados y completamente caracterizados por el estudiante Cristian Camilo Bernal del Grupo de Investigación de Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (**CODEIM**) de la Universidad Industrial de Santander. Las estructuras moleculares de estos compuestos y el respectivo peso molecular se observan en el **anexo 1 y 2**. Los compuestos evaluados fueron preparados en DMSO y posteriormente disueltos en medio de cultivo o medio de reacción, manteniendo una concentración final máxima 0,1% de DMSO.

1.3.2. Evaluación de la actividad anticancerígena de híbridos moleculares (Fase I)

En esta fase se evaluó el efecto citotóxico de las dos familias de compuestos heterocíclicos sobre las líneas cancerígenas Hep-G2, MCF 7, HeLa, A549, y B16F10, incluyendo la línea no cancerígena Vero. Posteriormente, se seleccionaron los compuestos promisorios con base en la CC_{50} , y se evaluó su efecto en los cambios morfológicos después de tratamiento, la liberación de citocromo c como biomarcador de apoptosis (vía intrínseca) y el tipo de muerte celular inducido por la exposición al híbrido.

1.3.2.1. Células. La actividad citotóxica *in vitro* de las dos familias de compuestos fue evaluada sobre células de adenocarcinoma de hígado humano (Hep-G2), adenocarcinoma de pulmón humano (A549), adenocarcinoma de mama humano (MCF 7), adenocarcinoma de cérvix (HeLa), melanoma murino (B16F10), y células normales de riñón de mono verde africano (Vero). Cabe mencionar que las líneas celulares A549 y Vero fueron donadas por el laboratorio de oxidaciones biológicas de la Universidad Federal de Paraná: las células HeLa fueron donadas por la profesora Patricia Escobar de la Facultad de Salud (UIS), y las células Hep-G2 y MCF 7 fueron donadas por la fundación cardiovascular de Colombia quienes a su vez las obtuvieron comercialmente de la ATCC (del inglés American Type Culture Collection), entidad con más de 85 años de experiencia en el aislamiento, identificación y comercialización de células en cultivo.

Las células empleadas se cultivaron en botellas de plástico con medio EMEM (pH 7,3) suplementado con gentamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado y algunas líneas celulares (HeLa, B16F10, Vero y A549) fueron suplementadas al 7% de SFB. Todas las

células fueron mantenidas a 37 °C, y atmosfera de 5% de CO₂ y los subcultivos se realizaron usando una solución de tripsina-EDTA (pH 7,3).

1.3.2.1.1. Actividad citotóxica de compuestos heterocíclicos (Método 1). La viabilidad celular en la fase I se determinó empleando 2 métodos. El primero, el método colorimétrico de MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil-tiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) descrito por Mosmann (Mosmann, 1983).

Las células Hep-G2, A549, B16F10, HeLa MCF 7 y Vero se plaquearon en placas de 96 pozos (1x10⁴ células/pozo) e incubaron a 37 °C, 5% CO₂, y 95% humedad durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente se realizó un ensayo, empleando una concentración única de 100 µM. Aquellos compuestos que disminuyeron la viabilidad celular por debajo de 50%, se evaluaron nuevamente en concentraciones inferiores (5, 25 y 50 µM). Pasado el tiempo del tratamiento (48 horas) se descartó el sobrenadante de los pozos, y se adicionaron 200 µL de MTT (500 µg/mL en solución salina de Hanks, HBSS) y se incubaron durante 3 horas. Luego, se retiró la solución de MTT y se agregaron 200 µL de DMSO a cada pozo para solubilizar los cristales formados. Mediante este método las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio (amarilla) formando cristales de formazán (violeta) solubles en DMSO que se cuantificaron a 570 nm en un lector de microplacas MultiSkan Go-Thermo.

El porcentaje de viabilidad fue calculado empleando la ecuación (1), y los resultados se expresaron como concentración citotóxica (CC₅₀) a la concentración capaz de disminuir la viabilidad en 50%, después de 48 horas de tratamiento.

$$\%viabilidad = \frac{\text{Absorbancia células tratadas}}{\text{Absorbancia células control}} * 100\% \quad (1)$$

Adicionalmente, Se determinó el índice de selectividad (IS) para estos compuestos como se indica en la ecuación (2), donde el índice de selectividad es el cociente de la medida de la actividad citotóxica en la línea no tumoral, en este caso Vero, sobre la actividad citotóxica sobre la línea celular cancerígena.

$$IS = \frac{CC_{50}Vero}{CC_{50} \text{ línea celular cancerígena}} \quad (2)$$

1.3.2.1.2. *Actividad citotóxica de compuestos heterocíclicos (Método 2).* Con el fin de establecer el efecto citotóxico de los compuestos promisorios hallados mediante el método anterior, se evaluó el efecto de los híbridos 3a, 3i, y 3m a menores concentraciones y en periodos de tratamiento más cortos. Para esto se determinó la viabilidad celular en la línea celular de melanoma murino B16F10 mediante el método del cristal violeta. Las células B16F10 (5×10^3 células/pozo) fueron sembradas en placas de 96 pozos por 24 horas a 37 °C, 5% CO₂. Luego de la incubación, las células se trataron con los híbridos moleculares de THQ/isoxazolina en concentraciones (1, 2.5, 5, y 10 μM) e incubadas por 12, 24, 48, y 72 horas. A continuación, las células fueron lavadas con buffer salino fosfato (tampón PBS, NaCl 680 mM, KCl 13.4 mM y Na₂HPO₄ 40.5 mM), y fijadas con metanol durante 10 minutos y posteriormente incubadas con 50 μL de solución de cristal violeta (0.02% p/v disuelto en etanol al 2% v/v) durante 5 minutos. Después, las células fueron lavadas con PBS hasta garantizar que se retiró el tinte por completo. Finalmente, se solubilizó el contenido de cada pozo en 200 μL de citrato de sodio (0.05 M) y se realizó la lectura de la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas MultiSkan Go-Thermo (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016). Los resultados se expresaron en número de células en función del tiempo en horas.

1.3.2.2. Cambios en la morfología celular como indicio de muerte celular. Las células B16F10 fueron plaqueadas en placas de 12 pozos (2×10^5 células/pozo) empleando laminillas e incubadas a 37°C con atmósfera de CO_2 (5%) durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente, las células fueron tratadas con los compuestos híbridos 3a, 3i y 3m ($10 \mu\text{M}$). Tras cumplir 24 horas de tratamiento, las células se lavaron dos veces con solución tampón de fosfato (PBS) y se fijaron con etanol al 70% ($30 \mu\text{L}$ /pozo). A continuación, se retiró el etanol y las células fueron teñidas con GIEMSA (solución de hematoxilina y eosina, SIGMA). La morfología celular se observó a través de un microscopio óptico de luz y las imágenes respectivas se adquirieron mediante una cámara fotográfica Leica, empleando el software Leica Air Lab.

1.3.2.3. Liberación de citocromo c como biomarcador de apoptosis (vía intrínseca). Las células B16F10 (5×10^5 células) fueron sembradas e incubadas durante 24 horas en cajas de Petri de 60mm. Posteriormente, las células fueron tratadas con los híbridos 3a, 3i y 3m ($10 \mu\text{M}$) por 24 horas. Después del tiempo de tratamiento, las células fueron soltadas y permeabilizadas con digitonina ($10 \mu\text{M}$) durante 30 minutos a 4°C en una solución Tris-HCl 10 mg/mL (pH 7.2), EGTA (7.89 mM), sacarosa (0.146 mM) e inhibidor de proteasas PMSF (0.2 mM). Mas tarde, las células fueron centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 minutos y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro $0.2 \mu\text{m}$.

Los resultados se expresaron en nmoles de citocromo c liberado por miligramos de proteína, empleando la ley de Beer-Lambert (coeficiente de extinción molar, $100 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). El citocromo c fue cuantificado de acuerdo con Appaix y colaboradores a 414 nm empleando un lector de microplacas MultiSkan Go-thermo (Appaix et al., 2000).

1.3.2.4. Identificación de muerte celular. La línea celular B16F10 fue cultivada en medio de cultivo bajo las condiciones mencionadas en el apartado 3.2.1 y sembradas en placas de cultivo de 12 pozos (1×10^5 células/pozo) durante 24 horas a 37°C y 5% CO_2 . Luego, se trataron con los híbridos 3a, 3i y 3m en concentración de $10\ \mu\text{M}$ durante 24 horas, empleándose camptotecina ($5\ \mu\text{M}$) como control positivo. Después del tiempo de tratamiento, se realizó la tinción con Annexin v/ 7AAD siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, $100\ \mu\text{L}$ de la solución MuseTM Annexin V & Dead cell (que contiene los fluorocromos anexina V y 7AAD) fueron adicionados a las muestras y posteriormente fueron incubadas por 20 minutos en ambiente oscuro. El side y forward scatter fueron tomados en una población de 10.000 eventos y posteriormente se analizó el porcentaje de células viable, muertas y en apoptosis temprana y tardía empleando un citómetro de flujo Muse[®] Cell analyzer, los datos fueron analizados empleando Muse 1.5 analysis Flow Cytometer (Millipore 1, Billerica, MA) y los resultados fueron graficados empleando el software GraphPad Prisma 8 y representados como porcentajes de células viable, apoptosis temprana, tardía y células muertas de tres ensayos independientes por triplicado.

1.3.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos están representados por la media \pm desviación estándar (DE) de tres ensayos independientes, por triplicado cada uno. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el software GraphPad Prism 8 mediante un análisis de varianza (ANOVA) en una vía, seguido por el test de Tukey para la comparación de las medias. Los resultados con un valor $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos respecto al control.

1.4. Resultados

1.4.1. Actividad citotóxica de compuestos heterocíclicos (Método 1)

Se evaluó el efecto citotóxico de 16 compuestos híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina (Anexo 1) sobre el panel de líneas celulares cancerígenas (A549, Hep-G2, MCF 7, HeLa, y B16F10) y un control de células no cancerígenas (Vero) a una concentración máxima de 100 μM durante 48 horas, usando el método de MTT. Luego, aquellos compuestos que disminuyeron el porcentaje de viabilidad celular por debajo del 50%, se evaluaron nuevamente en concentraciones menores (5, 25, y 50 μM), para determinar su potencial anticancerígeno. Con este método las deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente viables pueden reducir la sal de tetrazolio en formazán el cual se cuantificó a 550 nm.

En la Tabla 1, se observan los valores de las concentraciones citotóxicas CC_{50} para los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina. Al evaluar los híbridos moleculares sobre la línea de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa), 9 de estos híbridos (**3e**, **3i**, **3b**, **3c**, **3k**, **3o**, **3h**, **3l**, y **3p**) presentaron un CC_{50} menor a la máxima concentración evaluada (100 μM). No obstante, se decidió no profundizar en su mecanismo de acción debido a que presentaron efecto citotóxico en la línea no cancerígena Vero, en algunos casos con CC_{50} menores a las evaluadas en HeLa. Por otra parte, el híbrido **3h** representa una buena alternativa como tratamiento al cáncer de cuello uterino, ya que su CC_{50} de 10,21 μM es menor al CC_{50} hallado para el fármaco de referencia empleado en este ensayo (Oxaliplatino) de 14,3 μM . Asimismo, la concentración citotóxica en Vero 41,80 μM para el híbrido **3h** podría ser un indicio de un buen índice terapéutico y de su citotoxicidad selectiva frente a la línea HeLa.

Tabla 1*Actividad citotóxica de híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina.*

Compuesto	Actividad citotóxica (CC ₅₀) μM a 48 horas (n=9)					
	Vero	HeLa	B16F10	A549	Hep G2	MCF 7
3a	58,24±3,02	>100	11,37±0,27	>100	>100	>100
3e	>100	74,87±4,98	53,67±8,76	>100	>100	>100
3i	>100	73,85±8,38	21,95±2,13	>100	98,72±3,65	>100
3m	>100	>100	25,59±7,67	>100	58,36±2,43	61,49±7,87
3b	48,40±10,5	58,88±1,92	19,33±2,78	>100	56,29±0,13	40,75±4,94
3f	>100	>100	>100	>100	75,78±8,023	78,15±8,09
3j	>100	>100	>100	>100	67,38±2,40	>100
3n	75,12±4,15	>100	58,67±4,75	>100	>100	48,33±1,65
3c	48,05±2,33	30,27±4,27	26,06±7,19	80,24±6,34	42,60±4,25	84,45±4,83
3g	>100	>100	>100	>100	>100	>100
3k	86,83±5,45	66,43±9,92	>100	>100	>100	>100
3o	32,88±0,78	24,04±0,92	28,51±7,00	>100	63,89±6,11	>100
3d	>100	>100	>100	>100	>100	>100
3h	41,80±9,96	10,21±0,92	23,33±2,43	>100	71,70±0,40	>100
3l	>100	69,44±9,97	>100	>100	91,69±3,29	>100
3p	72,78±5,53	41,61±9,73	>100	>100	54,40±0,83	>100
Oxaliplatin	51,5 ± 2,2	14,3 ± 2,8	4,9 ± 1,2	31,2 ± 1,7	22,4 ± 1,1	n.d

Al igual que en HeLa, el híbrido **3c** (CC₅₀ = 80,24 μM) presenta efecto citotóxico sobre la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 (Tabla 1), siendo una concentración citotóxica muy alta respecto al oxaliplatino (CC₅₀ = 31,2 μM), fármaco de referencia empleado para este ensayo. Por otra parte, en la línea celular cancerígena de adenocarcinoma de hígado Hep G2, los híbridos **3i**, **3m**, **3b**, **3f**, **3j**, **3c**, **3o**, **3h**, **3l**, y **3p** afectan la viabilidad celular en concentraciones citotóxicas entre 42 – 98 μM. Sin embargo, estos híbridos no fueron seleccionados para la evaluación de su mecanismo de acción en esta línea debido a su CC₅₀ elevado, siendo el híbrido **3c** el más citotóxico (CC₅₀ = 42,60 μM). Respecto a la línea de adenocarcinoma de mama (MCF 7), los híbridos **3m**, **3b**, **3f**, **3n**, y **3c** disminuyen la viabilidad celular en el rango de concentraciones de 48 – 84 μM, siendo el híbrido **3b** el más citotóxico en esta línea (CC₅₀ = 40,75 μM).

Finalmente, en la línea de melanoma murino B16F10, los híbridos **3a**, **3e**, **3i**, **3m**, **3b**, **3n**, **3c**, **3o**, y **3b** disminuyeron la viabilidad celular por debajo del 50% en un rango de concentraciones entre 11 – 58 μM , siendo los compuestos **3a**, **3i** y **3m** los más citotóxicos frente a esta línea con un CC_{50} de 11,37 μM , 21,95 μM y 25,59 μM , respectivamente.

De igual forma que en la primera familia de híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina, 16 derivados indenoquilínicos (Anexo 2) análogos al agente anticancerígeno TAS-103 se evaluaron por el método del MTT. En la tabla 2 se muestran los resultados de la concentración citotóxica CC_{50} para la familia de derivados de indenoquinolinas. En la línea de adenocarcinoma de cérvix HeLa, 3 compuestos indenoquinolínicos (**CB79**, **CB89**, y **CB72**) disminuyeron la viabilidad celular en concentraciones entre 38 – 73 μM . El mejor efecto citotóxico presentado por los derivados de indenoquinolina fue presentado por el derivado **CB72**, con sus respectivos CC_{50} de 38,36 μM (HeLa), 65,36 μM (B16F10), 25,67 μM (Hep G2), 67,24 μM (A549), y 31,96 μM (MCF 7). A pesar de que el compuesto **CB72** presentó un CC_{50} cerca de 20 μM para la línea de hepatocarcinoma humano ($\text{CC}_{50}= 25,67 \mu\text{M}$), también fue citotóxico para la línea no cancerígena Vero ($\text{CC}_{50}= 41,62 \mu\text{M}$) por lo que presenta un índice de selectividad de $\text{IS}= 1,6$. Los CC_{50} hallados para los derivados indenoquinolínicos, indican una baja actividad anticancerígena (Actividad citotóxica presentada frente a las líneas cancerígenas evaluadas) de los compuestos en estas líneas evaluadas, por lo que no fueron considerados para continuar el estudio del conocimiento de su mecanismo de acción sobre la mitocondria.

Tabla 2*Actividad citotóxica de derivados indenoquinolínicos*

Compuesto	Actividad citotóxica (CC ₅₀) μ M, 48 horas (n=9)					
	Vero	HeLa	B16F10	Hep G2	A549	MCF 7
CB140	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB138	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB126	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB123	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB71	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB70	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB122	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB72	41,62 \pm 9,72	38,36 \pm 6,90	65,36 \pm 4,92	25,67 \pm 5,54	67,24 \pm 4,97	31,96 \pm 3,97
CB127	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB73	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB116	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB89	>100	73,27 \pm 6,41	>100	>100	>100	>100
CB93	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB79	>100	72,62 \pm 1,92	>100	>100	>100	>100
CB87	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB94	>100	>100	>100	>100	>100	>100

1.4.2. Actividad citotóxica de compuestos heterocíclicos (Método 2)

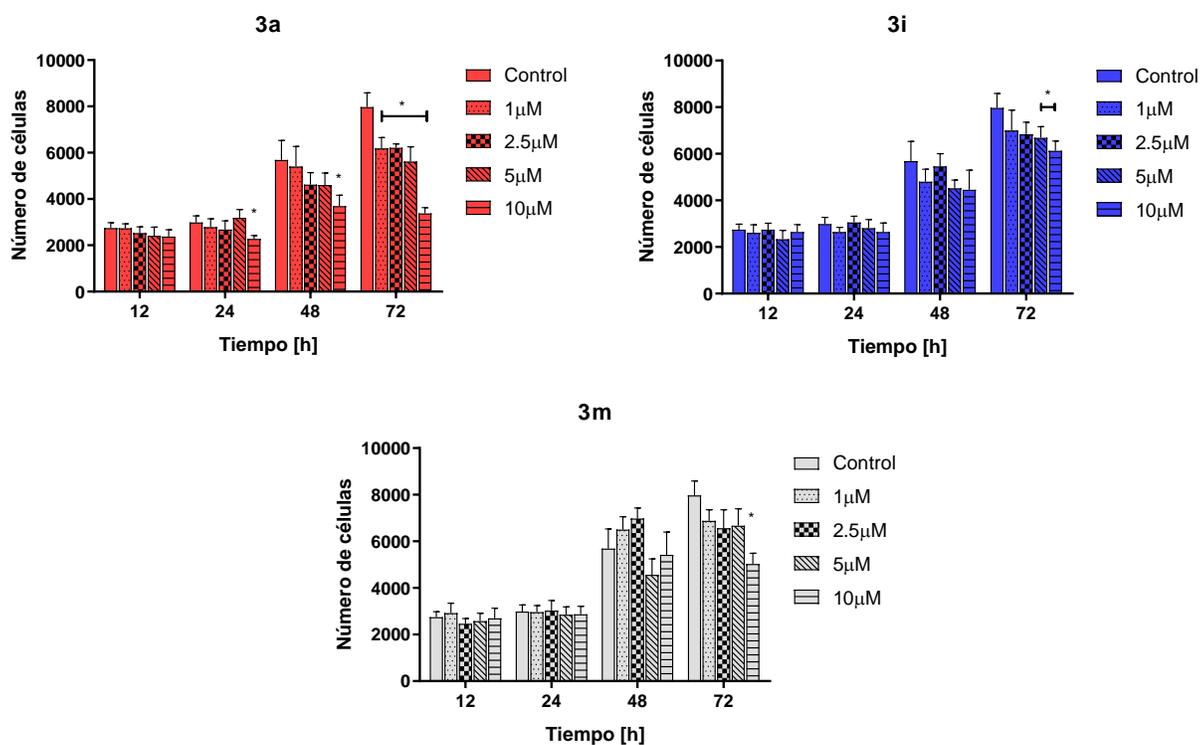
Los híbridos **3a**, **3i** y **3m**, seleccionados por su efecto citotóxico sobre la línea de melanoma murino B16F10, fueron evaluados en concentraciones menores al CC₅₀ obtenido por el método del MTT y en tiempos de incubación diferentes con el fin de encontrar efectos citotóxicos significativos a menores tiempos de tratamiento. Mediante este método, las células son teñidas por el colorante interactuando con su contenido proteico y el ADN, donde aquellas células que han perdido su viabilidad y pierden su capacidad de adherencia a la placa de 96 pozos y no podrá ser teñidas.

En la figura 26, se observan los resultados de viabilidad obtenidos por el método de cristal violeta para los híbridos **3a**, **3i** y **3m** en la línea B16F10 después de 12, 24, 48 y 72 horas de

tratamiento. Los resultados indican una disminución en el número de células viables cuando son tratadas con el híbrido **3a** en 10 μM a partir de 24 horas de tratamiento. Mientras que a 72 horas se observa un efecto estadísticamente significativo a partir de la menor concentración evaluada (1 μM). Por otra parte, el efecto citotóxico presentado por los híbridos **3i** y **3m**, solo fue estadísticamente significativo a las 72 horas de tratamiento a partir de la concentración de 5 μM para **3i** y de 10 μM para **3m**.

Figura 26

Efecto citotóxico de los híbridos 3a, 3i y 3m mediante el método de cristal violeta



Nota: Los resultados fueron expresados en la media \pm DE de tres resultados independientes. * denota un valor estadísticamente significativo al control para un valor de $p < 0.05$.

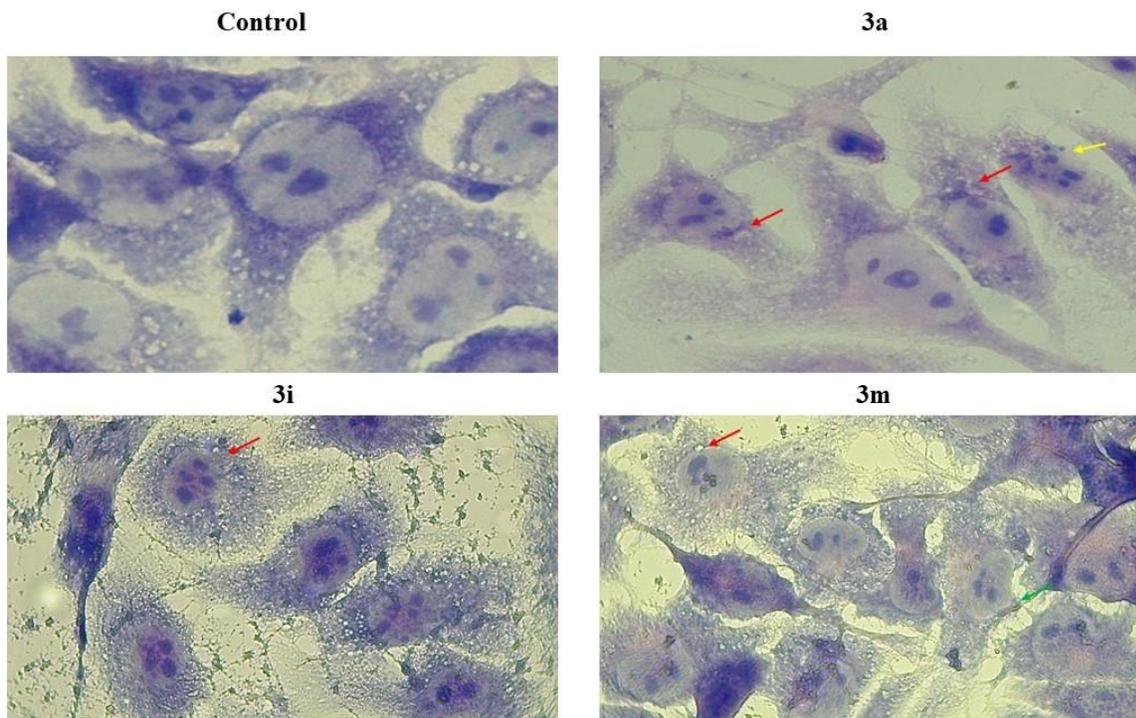
1.4.3. Cambios en la morfología celular como indicio de muerte celular

Con el fin de identificar el posible mecanismo de acción que podría estar relacionado con la disminución de la viabilidad celular después del tratamiento con los híbridos **3a**, **3i** y **3m** en la línea de melanoma murino B16F10, se evaluó su efecto sobre la morfología celular.

En la figura 27 se observa que las células de melanoma murino B16F10 tratadas con los híbridos moleculares, a 10 μ M durante 24 horas presentan las siguientes características: Pérdida de la integridad de la membrana plasmática, sin afectar la delimitación del núcleo, aumento en la condensación de la cromatina y específicamente para las células tratadas con el híbrido **3a**, se observa un aparente aumento en la vacuolización del citoplasma.

Figura 27

*Cambios morfológicos observados en B16F10 después de 24 horas de tratamiento con los híbridos **3a**, **3i** y **3m** en concentración de 10 μ M.*



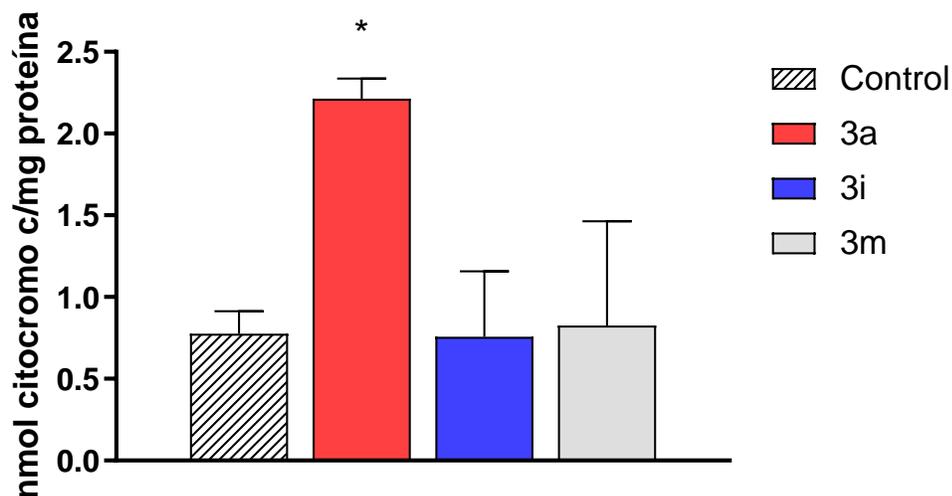
Nota: Las imágenes fueron capturadas en un microscopio (100x) óptico con un sistema Leica y las imágenes tomadas empleando el software Leica Air Lab. Los colores de las flechas indican: vacuolización de membrana celular (rojo), formación de ampollas o blebs (verde), pérdida de la integridad de membrana (amarillo).

1.4.4. Liberación de citocromo c como biomarcador de apoptosis (vía intrínseca)

Con el fin de comprender mejor el posible mecanismo de acción de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el proceso de inducción de muerte celular, se evaluaron los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** (10 μ M) durante 24 horas de tratamiento en la línea celular B16F10. En respuesta a varios estímulos de inducción de muerte celular, el citocromo c es liberado al citoplasma donde una vez allí se une a Apaf-1 en un proceso ATP dependiente, dando paso a la formación del apoptosoma y la activación de la procaspasa-9 desencadenando muerte celular apoptótica (M. Zhou et al., 2015). En la figura 28 se observa que después del tiempo de tratamiento (24 horas), el híbrido **3a** genera una liberación de citocromo c cerca de 2,2 nanomoles por mg de proteína generando un aumento estadísticamente significativo, comparado con el grupo de células sin tratamiento alguno (control) 0,9 nanomoles de citocromo c por mg de proteína. Por otra parte, los híbridos **3i** y **3m** no generaron un aumento significativo en la liberación de citocromo c.

Figura 28

Liberación de citocromo c generada por efecto de los híbridos moleculares 3a, 3i y 3m (10 μ M) durante 24 horas de tratamiento sobre la línea B16F10



Nota: Los resultados fueron expresados en la media \pm DE de tres resultados independientes. * denota un valor estadísticamente significativo al control para un valor de $p < 0.05$.

1.4.5. Identificación de muerte celular

Con el propósito de conocer el tipo de muerte inducido por la acción de los híbridos **3a**, **3i** y **3m** (10 μ M) durante 24 horas de tratamiento, las células B16F10 fueron teñidas con el kit Muse™ Annexin V & Dead cell. Este kit contiene el fluorocromo Annexina V y el fluorocromo 7-amino actinomicina D (7AAD). La Annexina V es ampliamente conocida por su afinidad hacia los residuos de fosfatidil serina expresados en la membrana plasmática de una célula en proceso de muerte por apoptosis (Schutte, Nuydens, Geerts, & Ramaekers, 1998; van Genderen, Kenis,

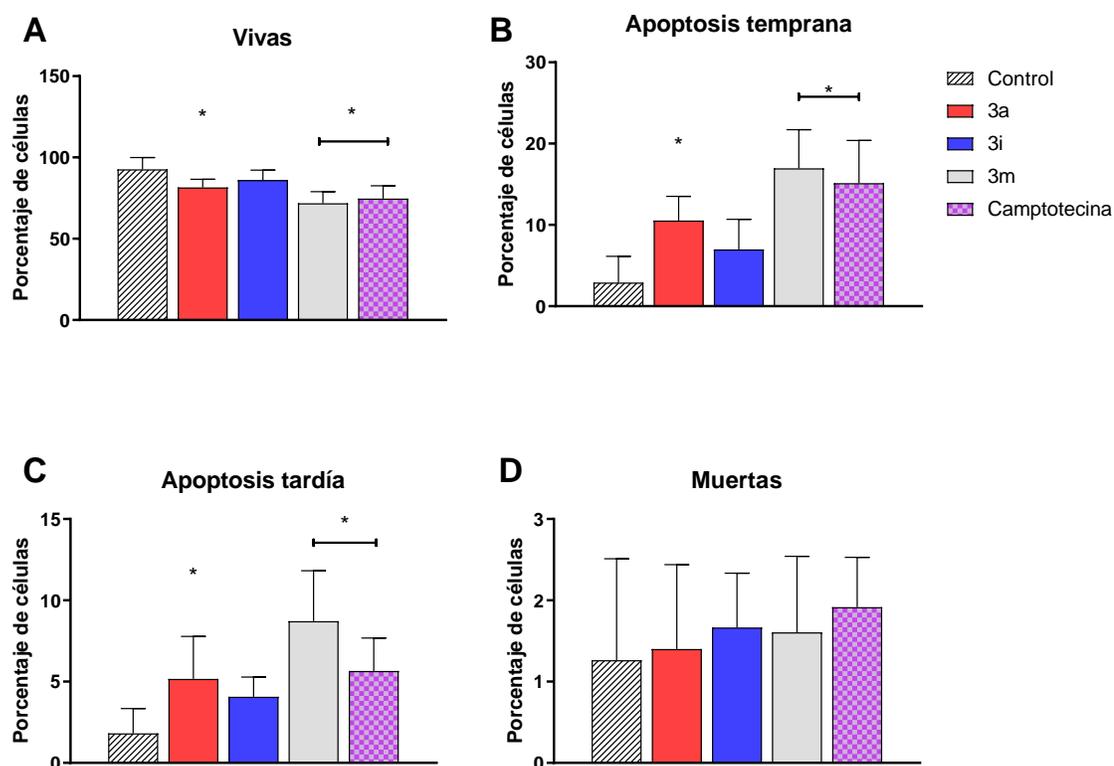
Hofstra, Narula, & Reutelingsperger, 2008); mientras que, el fluorocromo 7-amino actinomicina D (7AAD) es un tinte impermeable a membranas que permite excluir aquellas células que se encuentran viables de aquellas que tienen comprometida la integridad de su membrana. El 7AAD, presenta un gran afinidad por las dobles hebras del ADN intercalándose en aquellos sitios ricos en G-C (Philpott et al., 1996). Con esto, se pueden diferenciar poblaciones de células que se encuentran en apoptosis, apoptosis tardía, muertas y vivas. Como se observa en la figura 29, el híbrido **3a** presenta ~80% de células viables, ~10% en apoptosis temprana, y una población de células en apoptosis tardía de ~5%. Este híbrido disminuye el número de células viables, aumentando significativamente la población de células en apoptosis temprana y tardía. Por su parte, el híbrido **3m** presenta una población celular viable de ~62%, un aumento de la población en apoptosis temprana de ~17% y una población en apoptosis tardía de ~8.7%, todas ellas con diferencias estadísticas respecto al control.

En relación con el híbrido **3i**, no se observaron cambios estadísticos respecto al control en el aumento de la población de células en apoptosis temprana, tardía o muertas a 24 horas de tratamiento. Sin embargo, este compuesto presenta un efecto citotóxico con un CC_{50} de 21,95 μM a 48 horas de tratamiento. Es importante resaltar, que este ensayo se realizó a una concentración menor al CC_{50} y con un menor tiempo de tratamiento (24 horas). Lo anterior con el fin de determinar la posible inducción de procesos de muerte celular en etapas tempranas y a concentraciones menores al CC_{50} . Para este ensayo se empleó como control positivo Camptotecina 5 μM , compuesto reportado en la literatura por inducir apoptosis en diversas líneas celulares de melanoma entre ellas B16F10 (Lin, Al-Suwayeh, Hung, Chen, & Fang, 2014; X. P. Liu et al., 2010). El tratamiento con Camptotecina disminuyó el porcentaje de células viables en ~26%,

aumentó la población de células en apoptosis temprana cerca de ~15% así como la población de apoptosis tardía en ~5%, todas con diferencias significativas respecto al control.

Figura 29

Efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina en la inducción de apoptosis, tinción anexina V/ 7AAD en células de melanoma murino B16F10. Híbridos 3a, 3i, 3m fueron evaluados a 10 μ M durante 24 horas.



Nota: Los resultados fueron expresados en la media \pm DE de tres resultados independientes. * denota un valor estadísticamente significativo al control para un valor de $p < 0.05$.

1.5. Discusión de resultados

Cada año, el cáncer es el responsable de muchas muerte alrededor del mundo y, a pesar de que se ha logrado avanzar en el campo médico del tratamiento de esta neoplasia, todavía hay problemas que deben abordarse para mejorar los tratamientos actualmente aplicados (Pucci, Martinelli, & Ciofani, 2019). Por esta razón, el desarrollo de nuevos fármacos que puedan aliviar o evitar los efectos secundarios de los tratamientos convencionales sigue siendo una necesidad. Dentro de las opciones empleadas para suplir la necesidad de estos nuevos fármacos, se encuentra el diseño, síntesis, y evaluación de nuevas pequeñas moléculas que puedan actuar como inhibidores específicos, modular diferentes vías de señalización, y desencadenar procesos de muerte celular en las células cancerígenas (Ding, Song, Shen, Chen, & Zhang, 2020). Por otra parte, estos nuevos fármacos o pequeñas moléculas, y la mayoría de los productos farmacéuticos actualmente comercializados, presentan dentro de su estructura química, heterociclos que le confieren propiedades fisicoquímicas únicas, posicionándolos como uno de los pilares en la química medicinal (Martins et al., 2015).

En este trabajo se evaluaron 2 familias de compuestos heterocíclicos: la primera familia, híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina; y la segunda familia, derivados indenoquinolínicos análogos al antitumoral TAS-103. Encontramos que los híbridos moleculares presentaron mayor efecto citotóxico en las líneas celulares cancerígenas de adenocarcinoma de cérvix (HeLa), y en la línea celular de melanoma murino (B16F10). En la línea celular HeLa, la actividad citotóxica del híbrido **3h** en términos de CC_{50} fue de $10,21 \pm 0,92 \mu\text{M}$, con un (IS) de 4,1 frente a la línea celular no cancerígena Vero, y 1,4 veces más citotóxico que el fármaco de referencia empleado para este ensayo, el oxaliplatino, fármaco de amplio espectro usado en el tratamiento del cáncer de colon (HT29, HT29-5-FU, Caco-2), cáncer de mama (MCF 7, MDA-

MB-231), leucemia (L1210), sarcoma (M5076) (Raymond, Faivre, Woynarowski, & Chaney, 1998). De esta forma, el efecto citotóxico del híbrido **3h** lo posicionan como una alternativa al tratamiento del cáncer de cuello uterino y, genera interés en el conocimiento de su modo de acción en esta línea celular.

Respecto a la línea celular de melanoma murino (B16F10), los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** presentaron el mayor efecto citotóxico en esta línea con CC_{50} de $11,37 \pm 0,27$, $21,95 \pm 2,13$, y $25,59 \pm 7,67$ μM , respectivamente. Adicionalmente, el índice de selectividad (IS) de estos compuestos en la línea B16F10 respecto a la línea no cancerígena Vero fue de 5,12 (**3a**), 4,55 (**3i**) y finalmente 3,9 (**3m**). Cabe resaltar que, entre más alto sea el valor del IS, más efectivo y seguro podrá ser el compuesto para las posibles siguientes etapas (Badisa et al., 2009; Wardihan et al., 2013).

Adicionalmente, los resultados sugieren que la presencia del átomo de hidrógeno en el C-6 del anillo tetrahydroquinolínico genera una mejor respuesta en la actividad citotóxica de los compuestos en la línea B16F10 mientras que la adición del grupo metoxilo en el anillo aromático del núcleo isoxazolina parece disminuir el efecto citotóxico en la misma línea celular. Además, la adición de grupos electronegativos al C-6 en el anillo THQ parece disminuir su potencial citotóxico, pasando de un CC_{50} de $11,37$ μM con H en el carbono C-6 de la tetrahydroquinolina (**3a**) a $21,95$ μM y $25,59$ μM con el grupo metoxilo (**3i**) y cloro (**3m**) en el mismo átomo del anillo tetrahydroquinolínico, respectivamente. No obstante, las concentraciones citotóxicas CC_{50} son menores con la presencia del grupo metoxilo y los átomos de cloro e hidrógeno, comparados con la concentración CC_{50} cuando se encuentra el anillo tetrahydroquinolínico sustituido por un grupo metilo cuyo CC_{50} aumenta a $53,67$ μM (**3e**). De este modo, se concluye que la presencia del átomo de hidrógeno (compuesto **3a**) en C-6 del anillo tetrahydroquinolínico genera el compuesto más

citotóxico para la línea celular B16F10, seguido de los compuestos con metoxilo (**3i**) y cloro (**3m**) en la misma posición.

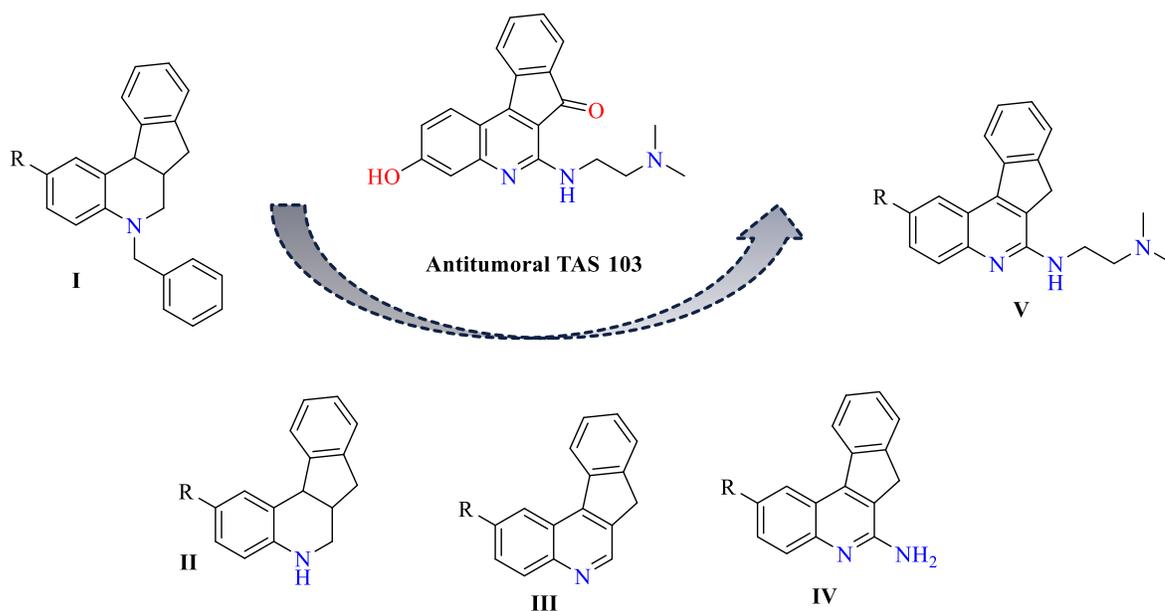
Por otra parte, como se observa en la tabla 1, el híbrido **3b** ($CC_{50}=19,33 \mu\text{M}$) también presenta efecto citotóxico frente a la línea B16F10, este híbrido al igual que el **3a** presenta un protón (H) en el C-6 del anillo de tetrahydroquinolina, y cuenta con un grupo metoxilo en el fragmento arilo del núcleo isoxazolina, soportando la idea que la adición de grupos metoxilo en al farmacóforo isoxazolina disminuye el efecto citotóxico en B16F10. Sin embargo, este híbrido no fue seleccionado para continuar con el estudio de su mecanismo de acción debido a su toxicidad en Vero, donde su IS es 2,5.

En los resultados obtenidos al evaluar la familia de derivados indenoquinolínicos, el derivado **CB72** presentó el mejor efecto citotóxico en el panel de líneas evaluadas, con sus respectivos CC_{50} de $38,36 \mu\text{M}$ (HeLa), $65,36 \mu\text{M}$ (B16F10), $25,67 \mu\text{M}$ (Hep G2), $67,24 \mu\text{M}$ (A549), y $31,96 \mu\text{M}$ (MCF 7). A pesar del efecto citotóxico presentado por el derivado **CB72** en la línea de hepatocarcinoma humano ($CC_{50}=25,67 \pm 5,54 \mu\text{M}$), también fue citotóxico para la línea no cancerígena Vero ($CC_{50}= 41,62 \pm 9,72$) por lo que presenta un índice de selectividad de $IS= 1,6$. Con base en los anteriores resultados obtenidos en las pruebas de MTT de los derivados indenoquinolínicos, se decidió no continuar con los ensayos de mecanismo de acción. Una explicación de la poca o nula actividad citotóxica de dichos compuestos puede deberse a que, si bien conservan la planaridad requerida para intercalarse en el ADN al igual que el TAS-103 (Fortune et al., 1999), las formas sintetizadas y evaluadas (Figura 30, I-III) no cuentan con una cadena lateral de naturaleza básica al extremo (grupo amino terciario) presente en el TAS-103 y algunos de sus análogos activos (Figura 30 IV-V). La anterior afirmación encuentra sustento en algunos estudios que señalan que la presencia de dicha cadena lateral en los compuestos

indenoquinolínico juega un papel importante en la interacción con la topoisomerasa (Staker et al., 2005). Adicionalmente, en un estudio de Cincinelli y colaboradores., 2018 encontraron que en la serie de compuestos evaluados por ellos frente a la topoisomerasa I, aquellos que tenían la presencia de la cadena lateral lograban generar un puente de hidrógeno entre el NH del grupo hidroxámico de la cadena lateral con el residuo Gly154 del sitio activo de la enzima, encontrando también que aquellos compuestos con una longitud de su cadena lateral entre 5-6 carbonos lograban generar un complejo proteína-ligando más estable y por ende presentar una mayor inhibición enzimática (Cincinelli et al., 2018).

Figura 30

Esquema de derivados de indenoquinolina. **I-III** derivados evaluados en este trabajo, **IV-V** siguiente generación de derivados con cadena lateral básica necesaria para inhibición de topoisomerasas (a evaluar en próximos proyectos).



Por otro lado, usando el método del cristal violeta se encontró que el híbrido **3a** presenta efectos citotóxicos en la línea de melanoma murino B16F10 a partir de las 24 horas de tratamiento a 10 μM . Mientras, los híbridos 3i y 3m disminuyen la viabilidad celular a partir de las 72 horas en concentraciones de 5 y 10 μM . Cabe resaltar que la concentración y tiempos empleados en el método del cristal violeta fue menor al CC50 hallado en el método del MTT. Además, el método propuesto por Mossman (MTT) se basa en la capacidad que tiene la célula de reducir la sal de tetrazolio a formazán por medio de las deshidrogenasas, principalmente aquellas deshidrogenasas presentes en la mitocondria (Vistica, Monks, Pittman, & Boyd, 1991), y el cristal violeta es un método independiente del metabolismo celular donde las células con membrana citoplasmática íntegra son teñidas por el colorante (Feoktistova et al., 2016; Vistica et al., 1991; P. Wang, Henning, & Heber, 2010). Por ejemplo, Sliwka y colaboradores., 2016 encontraron que el Selol exhibe efecto citotóxico después de 72 horas de tratamiento en la línea de cáncer de colon (HT-29) con un CC₅₀ de 33,8 μM por el método del MTT y 90 μM por cristal violeta, concluyendo que la diferencia en los resultados obtenidos mediante los dos métodos es debido a que aquellos compuestos que alteran la función mitocondrial o elevan los niveles de especies reactivas de oxígeno, disminuyen la velocidad de reducción de la sal de tetrazolio a formazán (Śliwka et al., 2016). Nuestros resultados apuntan que, el mayor efecto citotóxico para los híbridos moleculares cuando se evalúa por el método del MTT comparado con la tinción con cristal violeta, es debido a un posible efecto de los compuestos sobre el metabolismo celular, principalmente en el metabolismo energético mitocondrial.

La disminución de la viabilidad celular en la línea B16F10 por acción de los híbridos moleculares, se puede relacionar con los cambios morfológicos observados especialmente para el híbrido **3a**. Donde, después de 24 horas de exposición a 10 μM , se observa pérdida de la integridad

de la membrana plasmática, sin afectar la delimitación del núcleo, aumento en la condensación de la cromatina y un aparente aumento en la vacuolización del citoplasma. El aumento en la vacuolización en su citoplasma y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, se encuentra asociado con diferentes procesos de muerte celular donde se podría incluir la necroptosis, así como otros mecanismos de muerte celular necrótica regulada (Lorenzo Galluzzi et al., 2014). Donde la generación de vacuolas podría sugerir una caída en la generación de ATP en la célula acompañados de producción de especies reactivas de oxígeno (D. Chen, Yu, & Zhang, 2016; Petrie, Czabotar, & Murphy, 2019). Por otra parte, la formación de vacuolas en la membrana celular como resultado de la exposición al compuesto **3a** podría estar relacionado con otros procesos como endocitosis o muerte por autofagia (mediante la formación del autofagosoma), procesos que no pueden ser diferenciados mediante microscopia óptica (Aki, Nara, & Uemura, 2012; Gonzalez-Polo et al., 2005; Shubin, Demidyuk, Komissarov, Rafieva, & Kostrov, 2016).

Finalmente, los cambios morfológicos observados en la línea celular B16F10 luego del tratamiento con los híbridos **3a**, **3i** y **3m** pueden estar correlacionados con los datos presentados en la viabilidad celular (Tabla 1) y su disminución en la reducción a formazán, siendo esto consecuencia de pérdida de la actividad metabólica, probablemente relacionada con las vías metabólicas que le permiten a la célula conseguir su energía como la vía glucolítica o el metabolismo energético mitocondrial (Śliwka et al., 2016). Lo cual podría permitir el desarrollo de otros tipos de muerte celular como la ferroptosis, tipo de muerte celular regulada caracterizado por el aumento en el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica dependiente de hierro, formación del complejo ULK (Figura 24) y activación de las quinasas ATG-12, ATG-3, facilitando la formación del autofagosoma y la autofagia (B. Zhou et al., 2019); o la ferroxitosis, tipo de muerte celular dependiente de hierro y caracterizado por el aumento en las especies reactivas de oxígeno,

así como de la modulación de la fosforilación oxidativa (Djulbegovic & Uversky, 2019; Lakhter et al., 2014).

En lo que respecta a la liberación de citocromo c, se ha asociado en muchos casos a la traslocación de Bax hacia la membrana mitocondrial lo cual genera cambios estructurales en la membrana resultando en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la salida de compuestos proapoptóticos como el citocromo c (Garrido et al., 2006). Una vez liberado, el citocromo c interactúa con Apaf-1 favoreciendo la formación del apoptosoma, activación de las caspasas iniciadoras y posteriormente la muerte celular por apoptosis (Figura 20) (Ward et al., 2008; Yivgi-Ohana et al., 2011). Por esto, el citocromo c ha sido empleado como biomarcador durante la disfunción mitocondrial en muerte celular apoptótica inducida en líneas celulares de melanoma (Albano et al., 2013; Eleftheriadis, Pissas, Liakopoulos, & Stefanidis, 2016; Satchell et al., 2005). En un estudio realizado por Albano y colaboradores., 2013, hallaron que la exposición a diclofenaco en la línea de melanoma humano A2058 podía inducir muerte celular por apoptosis, generando además la liberación de citocromo c como biomarcador de disfunción mitocondrial, elevación en los niveles de especies reactivas de oxígeno, incremento en la actividad de la caspasa 9 y disminución en la actividad de la superóxidos dismutasa (SOD) mitocondrial (Albano et al., 2013).

Dado los resultados obtenidos después del tratamiento con los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina, se propone al híbrido **3a** como un inductor de apoptosis. Lo anterior, basado en la liberación del citocromo c, empleado en la amplificación de la apoptosis en diversas líneas celulares y en este caso puntual en melanoma (Charles & Rehm, 2014).

Además, esta liberación de citocromo c puede ser generada por alteraciones en la membrana mitocondrial. Alteraciones que se pueden presentar cuando proteínas miembros de la

familia BCL-2 forman complejos proteicos dando paso a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Garrido et al., 2006; Reed et al., 1998). Adicionalmente, alteraciones en el estado REDOX de la célula, generados a partir de la inhibición del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, pueden desencadenar en el aumento de especies reactivas de oxígeno, oxidación de la cardiolipina y eventualmente favorecer el ensamble del poro de permeabilidad mitocondrial (Garrido et al., 2006; Kagan et al., 2004; Nakagawa, 2004). Así, el hecho de que los híbridos **3m** y **3i** no generen liberación de citocromo c podría implicar la inducción de muerte celular independiente de este proceso.

Adicionalmente, empleando citometría de flujo se observó que los híbridos moleculares generan un aumento de la población de células en apoptosis después de 24 horas de exposición a 10 μM al igual que la camptotecina (5 μM). Es importante notar que el efecto presentado por la camptotecina en la inducción de muerte celular es muy similar a la obtenida por la exposición al híbrido **3a**. Los tratamientos con camptotecina y el híbrido **3a** presentan una población de células viables de $\sim 74\%$ y $\sim 80\%$, respectivamente. De igual forma, la población en apoptosis temprana es similar en ambos tratamientos, siendo $\sim 15\%$ para el tratamiento con camptotecina y del $\sim 10\%$ para el tratamiento con el híbrido **3a**.

Derivados que incluyen el núcleo tetrahydroquinolina, como los presentados en el estudio de Zablotskaya y colaboradores., 2007 demostraron efectos citotóxicos sobre las líneas celulares HT-1080, MG-22A, SHSY5Y, B16 y NIH 3T3, exhibiendo el efecto citotóxico más fuerte sobre la línea de melanoma murino B16 con CC_{50} de 21 μM (cristal violeta) y 15 μM (MTT) después de 72 horas de tratamiento. Adicionalmente, un estudio previo realizado en nuestro laboratorio por Bueno y colaboradores., 2018 demostró que híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazol presentan efecto citotóxico en la línea celular HeLa con CC_{50} de 19,7 μM e inducen la liberación de

citocromo c como biomarcador de apoptosis por vía intrínseca a 25 μ M después de 24 horas de tratamiento.

Los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en el journal of Medicinal Chemistry Research (Anexo 3)

1.6. Conclusiones del capítulo

La actividad citotóxica de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en la línea B16F10 es mayor para aquellos híbridos con -H en el C-6 de la tetrahydroquinolina. No obstante, la actividad citotóxica disminuye a medida que incrementa el número de grupos metoxilo en el arilo de la isoxazolina.

Los sustituyentes metoxilo (**3i**) y cloro (**3m**) en el anillo de la tetrahydroquinolina generan un mayor efecto citotóxico en la línea B16F10 respecto al grupo metilo en el mismo núcleo (**3h**).

El híbrido molecular **3a** induce procesos de muerte celular apoptótica por vía intrínseca, relacionados con liberación de citocromo c, mientras que el híbrido **3m** induce muerte apoptótica independiente de la liberación del citocromo c.

Los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad para los análogos al antitumoral TAS 103, evidencian que estos análogos no presentaron efectos citotóxicos prometedores sobre las líneas celulares A549, B16F10, Hep G2, HeLa y MCF 7. Lo anterior, puede deberse a la ausencia de la cadena alifática presente en el antitumoral TAS 103, encargada de interactuar con la topoisomerasa.

2. Los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina modulan la bioenergética mitocondrial y el sistema redox células de melanoma murino.

El melanoma avanzado generalmente es un tipo de cáncer resistente a la quimioterapia convencionalmente empleada (Schadendorf et al., 2018). Adicionalmente, se carece de opciones de tratamiento altamente efectivas. La falta de buenos tratamientos para el melanoma ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas en las últimas décadas, lo que ha llevado a tener distintos enfoques en su tratamiento, dentro de los cuales se destacan: inhibidores de la proteína BRAF y su acción sobre el metabolismo celular; los agentes que se dirigen al receptor de muerte programada-1 (PD-1) y su ligando (PD-L1). Teniendo en cuenta la necesidad de buscar nuevas alternativas en el tratamiento del melanoma y los resultados presentados en el capítulo anterior, en donde se evidenció que los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina presentaros bajas CC_{50} en células de melanoma murino con alto índice de selectividad, con este capítulo se busca profundizar en el modo de acción de los híbridos, analizando su efecto sobre la mitocondria, enzimas de la vía glucolítica y el sistema redox de la línea celular B16F10.

De esta forma, en este capítulo se exponen las características metabólicas del melanoma, y cómo la vía glucolítica, la fosforilación oxidativa, y el sistema redox se encuentran relacionadas en los procesos de inicio y desarrollo de la enfermedad. Posteriormente se presentan los resultados del efecto de los 3 híbridos (**3a**, **3i**, y **3m**) más citotóxicos en melanoma murino, sobre la bioenergética mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata, así como en la respiración celular en la línea B16F10.

2.1. Marco de referencia y de antecedentes

2.1.1. *Vías metabólicas en melanoma: proliferación, invasión y metástasis*

Debido a que el melanoma es el cáncer de piel más agresivo y con mayor mortalidad, generando cerca del 80% de las muertes en cuanto a cáncer de piel se refiere (Ferlay et al., 2019; Tracey & Vij, 2019) surge la necesidad de conocer las distintas mutaciones presentes en el melanoma, y entender cómo la reprogramación metabólica contribuye en la patogénesis de la enfermedad así como en su heterogeneidad (Bray et al., 2018; Schadendorf et al., 2018; Siegel et al., 2017). En algunas líneas de melanoma (Figura 31), el metabolismo de las moléculas de carbono (1) y metabolismo de moléculas de un solo carbono (2) (vía metabólica que se centra en el metabolismo del ácido fólico) juegan un papel importante en la biología del cáncer. Por una parte, la glucólisis produce la energía (ATP) para la célula y los intermediarios que alimentan la vía de las pentosas fosfato (3). La vía de la serina-glicina y el metabolismo del folato proporcionan el NADPH necesario para mantener el estado redox de la célula y para las reacciones anabólicas. El ciclo de Krebs (4) emplea el acetil-CoA derivado del piruvato o de la β -oxidación de ácidos grasos para producir NADH y a su vez proporcionar los electrones que viajarán a través de la cadena transportadora de electrones para producir ATP (Mullarky, Mattaini, Vander Heiden, Cantley, & Locasale, 2011; Yang & Vousden, 2016). También, el ciclo de Krebs puede ser empleado por las células de melanoma, así como otras células tumorales para la oxidación de la glutamina que ingresa al ciclo como α -cetoglutarato y así producir diversos precursores biosintéticos importantes para la proliferación celular. Adicionalmente, las vías de señalización (Figura 31) juegan un papel importante en la determinación de que vía metabólica es favorecida por el melanoma. Por un lado,

Teniendo presente la importancia de las vías metabólicas para la proliferación celular, se presentará en el siguiente apartado información de las principales vías metabólicas y cómo las células del melanoma las reprograman para obtener así la mayor cantidad de nutrientes y precursores biosintéticos necesarios para su continua proliferación. A su vez, se explicará el rol que juega la mitocondria en el desarrollo del melanoma, así como las enzimas antioxidantes en el mantenimiento del estado redox de la célula.

2.1.1.1. Glucólisis como principal fuente de energía y precursores metabólicos.

En el melanoma como en muchos tipos de cáncer la rápida proliferación es debida a la constante oxidación de glucosa a lactato independiente de los niveles oxígeno, proceso conocido como glucólisis anaeróbica o efecto Warburg en honor a Otto Warburg, quien describió la necesidad de la célula cancerígena para emplear la vía glucolítica (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009; Warburg, 1956). Cuando se emplea esta vía para la proliferación celular se obtiene de forma rápida el ATP necesario para su supervivencia, así como precursores biosintéticos. Estudios han demostrado que bajo condiciones normóxicas en melanoma, solo el 25% del piruvato producido entra en la mitocondria donde es convertido a acetil-CoA por acción de la piruvato deshidrogenasa, exhibiendo claramente el efecto Warburg (DeBerardinis et al., 2007). Una vez dentro del ciclo de Krebs, en vez de seguir su ciclo de forma completa el citrato es transportado al citosol donde la ATP citrato liasa realiza su acción rompiéndolo en acetil-CoA y oxaloacetato (Figura 31), donde el acetil-CoA puede entrar a participar en la síntesis de ácidos grasos jugando un papel importante en la proliferación celular o participando en la acetilación de histonas. Por otro lado, el oxaloacetato producido es convertido a malato y posteriormente a piruvato por la enzima málica y más tarde es convertido en lactato por acción de la lactato deshidrogenasa (DeBerardinis & Chandel, 2016; Ratnikov, Scott, Osterman, Smith, & Ronai, 2017; Scott et al., 2011). Además, por medio de la acción de la enzima málica que sirve como fuente de reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) se genera la detoxificación de especies reactivas de oxígeno en melanoma, y la lactato deshidrogenasa disminuye el exceso de NADH generado por la elevada tasa de uso de la vía glucolítica (DeBerardinis et al., 2007). Es por esto, que estudios han demostrado que la inhibición de enzimas como la ATP citrato liasa por medio de una combinación

de ácido alfa lipoico (8 μM) junto a hidroxicitrato (300 μM) generan un efecto antiproliferativo en la línea de melanoma B16F10 (Paolo E. Porporato et al., 2014; Schawartz et al., 2010).

Asimismo, en el melanoma la vía glucolítica genera metabolitos intermediarios de la vía de las pentosas fosfato y la vía de la síntesis de glicina/serina. Cuando la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) oxida la glucosa 6-fosfato genera un intermediario clave en la regulación de la vía de las pentosas fosfato, donde después de varios pasos a través de esta vía se van a generar intermediarios necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos, así como la reducción del NADPH empleado en las reacciones de oxido reducción de enzimas como la glutatona reductasa con el fin de mitigar los altos niveles de especies reactivas de oxígeno generados (Locasale et al., 2013). Es por esto, que la inhibición de la G6PD (la cual se encuentra altamente sobre expresada en el melanoma) genera una inhibición del ciclo celular en la línea de melanoma A375 generado por el desbalance en las especies reactivas de oxígeno y activación de factores de transcripción (Cai et al., 2015).

La alta dependencia de la glucólisis en el melanoma generando efecto Warburg es debido en especial a la activación de la vía de la MAPK quinasa (Figura 31). La activación de esta vía a su vez genera la transcripción del factor inductor de hipoxia ($\text{HIF1}\alpha$), así como la activación del oncogén (*MYC*) y el aumento en la transcripción de enzimas como la lactato deshidrogenasa, aldolasa y enolasa (Kim, Tchernyshyov, Semenza, & Dang, 2006). Además, el factor inductor de hipoxia ($\text{HIF1}\alpha$) genera la activación de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), quien a su vez inhibe la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) evitando así la entrada del piruvato vía ciclo de Krebs y su posterior uso en la fosforilación oxidativa (S. M. Kumar et al., 2007). Por su

parte, el oncogén *MYC* genera una sobre expresión de las enzimas lactato deshidrogenasa, hexoquinasa, el transportador de glucosa 1 (GLUT1) quienes aumentan la velocidad de captación de glucosa en la célula y su aprovechamiento mediante la vía glucolítica (Kim et al., 2006; S. M. Kumar et al., 2007; Parmenter et al., 2014; Stine, Walton, Altman, Hsieh, & Dang, 2015). También, en el melanoma se encuentran activadas las vías PI3K/AKT/mTOR aumentando el uso de la vía glucolítica, donde la fosforilación y activación de la proteína quinasa AKT conduce a la activación de la proteína mTOR quien a su vez aumenta la transcripción y actividad del factor de hipoxia HIF1 α que genera la activación de las enzimas mencionadas anteriormente (Land & Tee, 2007).

2.1.1.2. Metabolismo del lactato como mayor contribuyente de la metástasis en melanoma. El lactato es producido al final de la glucólisis con el fin de mantener los niveles de NAD⁺, donde posteriormente es expulsado al microambiente tumoral mediante transportadores monocarboxylato. Se ha identificado que en algunos tipos de melanoma la sobre expresión del transportador GLUT1, así como el transportador MCT4 encargado de la expulsión del lactato está estrechamente ligado a la progresión primaria del tumor hacía la metástasis (Pinheiro et al., 2016). Una vez expulsado el lactato al microambiente tumoral, puede facilitar la angiogénesis, promover la metástasis y suprimir el sistema inmune, mediante la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células beta activadas (NFκB), HIF1 α , y la vía de señalización de la interleucina-8 (IL-8), que a su vez genera como resultado la activación de vías de señalización como la del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR2), y el factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF) (Payen, Porporato, Baselet, & Sonveaux, 2016; Romero-Garcia, Moreno-Altamirano, Prado-Garcia, & Sánchez-García, 2016; Ullah, Davies, & Halestrap, 2006). Estudios como el de Payen y colaboradores., 2016 han demostrado que con el aumento en la acidez del microambiente tumoral se favorece la metástasis en diversas formas, una de ellas se debe a que una disminución de pH extracelular promueve la interacción del colágeno con las integrinas en el melanoma permitiendo que se formen complejos de adhesión celular y aumente la migración de células, lo cual se ve reflejado en los resultados de estudios que muestran que las células de melanoma que fueron cultivadas en un ambiente ácido fueron significativamente más metastásicas que aquellas que crecieron en un ambiente a pH normal (Fischer et al., 2018; Payen et al., 2016).

2.1.1.3. Fosforilación oxidativa y ciclo de Krebs como motor de crecimiento tumoral en ciertos tipos de melanoma. Si bien las células de melanoma se caracterizan por presentar el efecto Warburg, es decir emplear la glucólisis como medio para producir ATP, siendo la fosforilación oxidativa significativamente más eficiente a la hora de producir energía, también se ha reportado que entre el 30-50% de los tipos de melanoma tienen una alta utilización de la fosforilación para suplir sus demandas energéticas (Barbi de Moura et al., 2012). Se ha reportado que algunos pacientes con melanoma presentan la mutación del gen BRAF^{V600E} y no responden de forma adecuada al tratamiento debido a la mutación en múltiples genes, generando una alta expresión de la histona metilasa JARID1B generando que se adquiera el ATP de forma predominante por vía fosforilación oxidativa y presentando resistencia a los tratamientos empleados con target a la mutación en BRAF^{V600} (Brafford et al., 2016). Por otra parte, otro conjunto de líneas de melanoma con una alta expresión del coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisoma 1- α (PGC1 α) presenta una mayor tasa de utilización de la fosforilación oxidativa, empleando menos la vía glucolítica y presentando resistencia a los fármacos convencionales para el melanoma que tiene como target la vía de la MAPK quinasa (como el vurafenib), no obstante se ha encontrado que esta resistencia se puede tratar mediante fármacos que inhiban mTORC1/2 (Haq et al., 2013). Además, en las líneas de melanoma con una alta tasa de expresión de PGC1 α se encuentra sobre expresado los niveles de factores nucleares de respiración, factores de transcripción mitocondrial, factores de replicación del ADN mitocondrial y mediadores de fisión y fusión mitocondrial. (Brafford et al., 2016; Gopal et al., 2014; Haq & Et al., 2013). Igualmente, la sobre expresión de la proteína PGC1 α se encuentra relacionada con una disminución en la tasa de supervivencia al melanoma, en parte debido a que el aumento de PGC1 α se encuentra relacionado con la invasión y metástasis en melanoma, así como adaptación al estrés

oxidativo en la célula, mediante la inducción de la superóxido dismutasa 2 (SOD2), catalasa y glutatona peroxidasa (Fischer et al., 2018). Un estudio de Valerie y colaboradores., 2014 demostró que la inhibición de la expresión de la proteína PGC1 α en la línea de melanoma murino B16F10 disminuye el efecto metastásico de la línea celular, regula la biogénesis mitocondrial, y regula la fosforilación oxidativa en la célula (Valerie S. LeBleu et al., 2014). Es importante resaltar que el conjunto de células de melanoma con una alta tasa de uso de la fosforilación oxidativa es debido a que la proteína mTORC promueve la traslocación nuclear del factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF) quien a su vez regula la expresión del coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisoma 1- α (PGC1 α) y consecuentemente la expresión de genes involucrados en la fosforilación oxidativa (Gopal et al., 2014; McQuade & Vashisht Gopal, 2015).

Una vez sobre expresadas las enzimas necesarias para aumentar el flujo de sustratos para su posterior oxidación en la mitocondria mediante fosforilación oxidativa, es importante recordar que la mitocondria sirve no solo como la mayor fuente de energía si no también como el orgánulo que proporciona intermediarios biosintéticos críticos para el crecimiento y proliferación en el melanoma (Wallace, 2012). Además de producir el citrato (vía ciclo de Krebs) necesario para la síntesis de novo de ácidos grasos (Figura 31), también se produce aspartato a través de una reacción de transaminación de involucra glutamato y oxaloacetato (Rabinovich et al., 2015). Una vez producido el aspartato es transportado al citosol donde contribuye a la síntesis de ácidos nucleicos, aumentando los niveles de aspartato en el citoplasma (DeBerardinis & Chandel, 2016). Adicionalmente, se ha reportado que el aspartato contribuye a la progresión en el melanoma debido a que el aumento de niveles de este aminoácido en el citoplasma está relacionado con la activación

de la carbonil fosfato sintetasa II (CAD), enzima clave en la síntesis de pirimidinas y proliferación celular en melanoma, asimismo con la inhibición de la enzima argininosuccinato sintetasa I (ASS1) que emplea el succinato en la producción de arginina en el ciclo de la urea (Rabinovich et al., 2015).

Para continuar con el uso del citrato y oxaloacetato como precursores biosintéticos, el melanoma emplea un proceso llamado anaplerosis para suplir de intermediarios del ciclo de Krebs. Mientras que en algunos tipos de células cancerígenas reponen el oxaloacetato vía piruvato por acción de la piruvato carboxilasa, en aquellas células de melanoma que presentan un fenotipo Warburg ésta contribución es mínima y emplean en cambio la glutamina como principal fuente de carbono para el ciclo de Krebs (Ratnikov et al., 2017; Scott et al., 2011).

2.1.2. Estrés oxidativo y su rol en el desarrollo, avance y tratamiento del melanoma

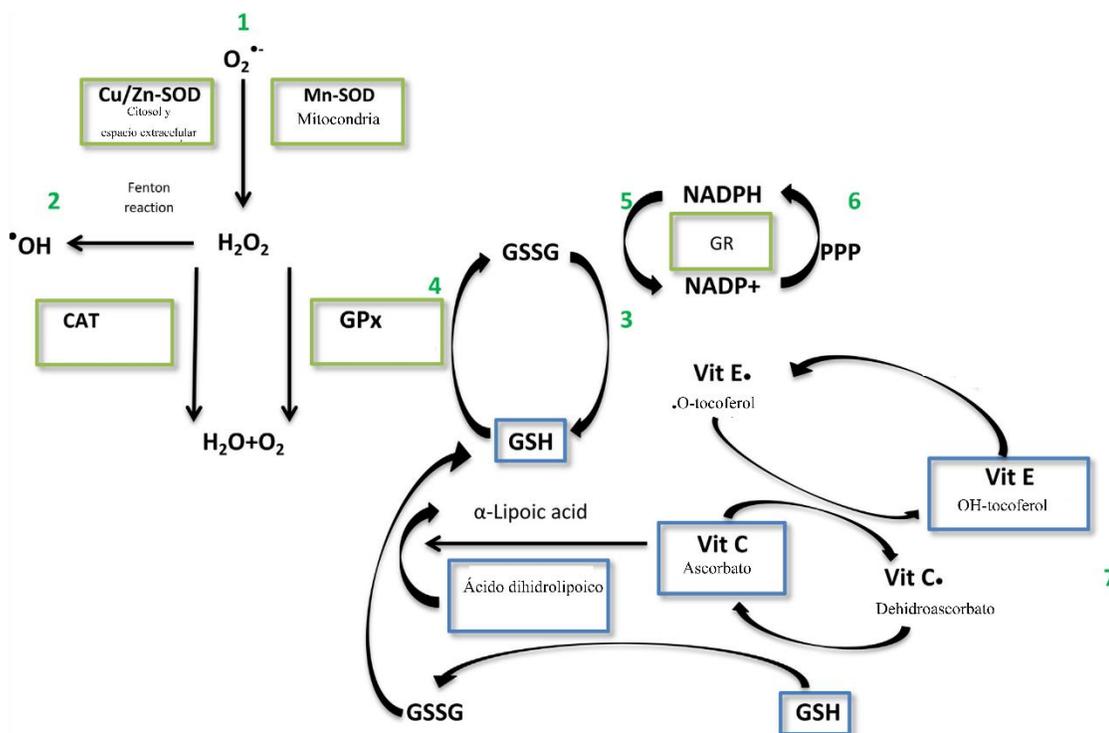
Las especies reactivas de oxígeno, son el resultado de la reducción parcial de moléculas de oxígeno (Circu & Aw, 2010). Dentro del metabolismo normal en la célula, estas especies son conocidas por jugar un papel dual dentro de las diferentes sistemas biológicos. Generalmente, a bajas o moderadas concentraciones están envueltas en procesos de señalización y regulación de la expresión génica (Circu & Aw, 2010; Federico et al., 2012). No obstante, a concentraciones elevadas puede generar efectos nocivos conocido como estrés oxidativo provocando daños en lípidos, proteínas y ADN (Hoffmann & Griffiths, 2018). El equilibrio entre los efectos nocivos y benignos de las especies reactivas de oxígeno es un factor importante en los organismos vivos y se encuentra controlado por un proceso conocido como regulación redox, protegiendo así a la célula del estrés oxidativo y manteniendo la homeostasis de éstas especies (Hoffmann & Griffiths,

2018). La homeostasis de las especies reactivas de oxígeno es determinado por el balance entre la producción de las especies reactivas y la velocidad de detoxificación de las mismas por varios sistemas antioxidantes (Circu & Aw, 2010; Madungwe, Zilberstein, Feng, & Bopassa, 2016). Dentro de la célula encontramos sistemas de defensa enzimáticas ante las especies reactivas de oxígeno donde se incluye la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (Gred) y catalasa (CAT). Además, la célula cuenta con sistemas de protección no enzimáticos representados por el ácido ascórbico, carotenoides, flavonoides, glutatión (GSH) y tiorredoxinas, entre otras (Colak, Ignjatovic, Radosavljevic, & Zoric, 2017).

Por su parte la SOD y sus 3 isoformas (Cu,Zn-SOD-1 presente en el citoplasma, Mn-SOD-2 presente en la mitocondria y Cu,Zn-SOD-3 presente en el espacio extra celular), catalizan la conversión del radical $O_2^{\cdot-}$ en una especie menos reactiva H_2O_2 (Zelko, Mariani, & Folz, 2002). Luego, el H_2O_2 formado puede ser descompuesto en H_2O y O_2 en una reacción catalizada por la catalasa o bien puede ser empleado por la glutatión peroxidasa que cataliza la reducción del H_2O_2 en H_2O oxidando el glutatión (Figura 32) (Circu & Aw, 2010; Mironczuk-Chodakowska, Witkowska, & Zujko, 2018; Zelko et al., 2002). Desde esta perspectiva, el glutatión es la molécula antioxidante más abundante en las células mamarias, donde se encuentra en su forma reducida (GSH) y en su forma oxidada (GSSG), siendo la forma reducida la especie más abundante en el interior de la célula, lo que convierte a la relación GSH/GSSG en un indicador del nivel de estrés oxidativo (Hoffmann & Griffiths, 2018). Es por esto que un aumento en el nivel de las especies reactivas de oxígeno se traduce en un aumento en la concentración de GSSG, el cual luego es reducido a GSH en reacciones catalizadas por la glutatión reductasa, enzima dependiente de NADPH (Pastore, Federici, Bertini, & Piemonte, 2003).

Figura 32

Mecanismo de defensa antioxidante presente en la célula



Nota: Tomado y adaptado de (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018)

Actualmente, se ha reportado que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la regulación de procesos de señalización en la célula que incluye la diferenciación, proliferación, muerte celular, y expresión génica, entre otros (Circu & Aw, 2010). Además, las especies reactivas de oxígeno pueden modular vías de transducción de señales mediante la estimulación de receptores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (H. Liu, Colavitti, Rovira, & Finkel, 2005). Es por esto, que el aumento de las especies reactivas de oxígeno se encuentra relacionado con la disfunción de vías encargadas de los procesos proliferativos, migración y diferenciación, entre

otros, los cuales a su vez se encuentran estrechamente ligados al desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer (Moloney & Cotter, 2018).

Debido a la relación entre la desregulación del equilibrio redox y el desarrollo del cáncer a continuación se describe cómo ocurre esta interacción, específicamente en melanoma.

2.1.2.1. Especies reactivas de oxígeno en el desarrollo del cáncer. Como ya se mencionó anteriormente, las especies reactivas de oxígeno se encuentran involucradas en procesos de señalización, lo cual permite pensar que participen en el desarrollo de numerosas patologías entre ellas el cáncer (Cannavò et al., 2019). Al regular las vías de transducción de señales, las especies reactivas de oxígeno se encuentran envueltas en la adquisición de los “hallmarks” del cáncer que incluye la autosuficiencia de factores de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibidores del crecimiento, evasión de muerte celular, angiogénesis, inflamación y metástasis entre otras (Meyskens et al., 2001). Donde la acumulación de especies reactivas de oxígeno se ha reportado en el desarrollo de diversos tipos de cáncer incluyendo cáncer gástrico, próstata, mama y melanoma entre otros (Handa, Naito, & Yoshikawa, 2010; B. Kumar, Koul, Khandrika, Meacham, & Koul, 2008; Meyskens et al., 2001).

Una de las vías de señalización reguladas por las especies reactivas de oxígeno y que se encuentran involucradas en la transformación maligna de una célula, es la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que consta principalmente de cuatro quinasas importantes; ERK, JNK, la proteína quinasa 38 (p38) y la proteína quinasa 1 (Paluncic et al., 2016). Elevados niveles de especies reactivas de oxígeno activan la proteína quinasa 1 reguladora

de la señal de apoptosis (ASK1) quien a su vez regula a la proteína p38, donde p38 una vez activada regula de forma negativa la transformación maligna inducida por el oncogén *RAS*, producido por la inactivación de la quinasa ERK (Vurusaner, Poli, & Basaga, 2012). Por otro lado, la vía de las quinasas MAPK puede ser activada también por las especies reactivas de oxígeno pero esta vez mediante la inactivación de la proteína quinasa fosfatasa 3 MPK-3 quien a su vez regula de forma negativa a la quinasa ERK, produciendo la acumulación de especies reactivas tales como el peróxido de hidrógeno (Chan et al., 2008).

En cuanto a melanoma, se ha reportado que el aumento en las especies reactivas de oxígeno se puede efectuar mediante varios mecanismos (Cuezva et al., 2007; Meyskens, Van Chau, Tohidian, & Buckmeier, 1997). Un mecanismo es debido a la poca capacidad detoxificante en melanoma, gracias a la baja actividad enzimática de la catalasa, glutatona s-transferasa y Mn-SOD (Cuezva et al., 2007; Meyskens et al., 1997). Además, se ha evidenciado que en el melanoma se presenta un aumento del ion superóxido y una disminución del peróxido de hidrógeno, lo cual genera un ambiente prooxidante que conlleva a la activación de factores de transcripción que son sensible a estas especies confiriéndole la agresividad, alta proliferación y resistencia a fármacos (Pervaiz & Clement, 2007). Se ha demostrado que la mitocondria juega un papel importante en la generación de especies reactivas de oxígeno, así como en la regulación de estas (Cannavò et al., 2019). Como se mencionó anteriormente en algunos tipos melanoma, así como en algunos de los diferentes estadios de la enfermedad se ha identificado que la tasa de utilización de la vía glucolítica es menor que la fosforilación oxidativa, lo cual genera como consecuencia que las células de melanoma generen altos niveles de especies reactivas de oxígeno (Haq et al., 2013). Estas características hacen de la mitocondria una diana importante para el desarrollo de nuevos

fármacos en el tratamiento del melanoma, tal y como lo demostró Barbi y colaboradores., 2012 con el uso del Elesclomol. Este compuesto es empleado frente a la línea de melanoma metastásico WM1158, donde altera el balance redox de la célula induciendo estrés oxidativo mediante la inhibición de la fosforilación oxidativa y finalmente conduciendo a la célula a muerte celular por apoptosis. Adicionalmente, en este mismo estudio se encontró que líneas celulares de melanoma con una alta expresión de la lactato deshidrogenasa (LDH), y por consecuencia un mayor empleo de la glucólisis presentan resistencia al uso del Elesclomol (Barbi de Moura et al., 2012; Hersey, Watts, Xu, & Hackett, 2009).

2.1.3. Terapia antioxidante en el melanoma

Muchos tipos de cáncer presentan un desbalance del sistema redox comparado con las líneas celulares de la que son originarias debido a cambios en los niveles de antioxidantes no enzimáticos y de enzimas antioxidantes (Cannavò et al., 2019). Puntualmente en el melanoma, para algunas líneas se han reportado diversas alteraciones en el gen que codifica la expresión de MnSOD que confieren baja actividad para esta enzima (Borrello, De Leo, & Galeotti, 1993). No obstante, hay reportes también en líneas de melanoma donde se presentan una elevada actividad de enzimas como la catalasa (CAT), y en líneas de melanoma con alta resistencia al estrés oxidativo se presenta una elevada actividad de la CAT, SOD y GPx (Cannavò et al., 2019; Wozniak, Drewa, Wozniak, & Schachtschabel, 2004). Así, el desequilibrio en el sistema redox se presenta como método de adaptación a los niveles de estrés presentados en el melanoma.

Este desequilibrio en el sistema redox encontrado en el melanoma, se encuentra implicado en los procesos de carcinogénesis, como la proliferación anormal en las células, la evasión de

procesos de muerte celular, y la metástasis (Pani, Galeotti, & Chiarugi, 2010). Es por eso que basados en el papel que presentan las especies reactivas de oxígeno en el desarrollo y avance del cáncer, se propone la terapia antioxidante como una alternativa para el tratamiento del melanoma (Cannavò et al., 2019). La N-acetilcisteína (NAC), uno de los fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) empleados para tratar la fibrosis pulmonar se ha empleado en estudio en ratones para demostrar que la administración oral de NAC puede proteger los melanocitos del estrés oxidativo y del daño inducido por la radiación UV. Además, se observó que su uso tópico puede prevenir el agotamiento del glutatión (GSH) y la producción de peróxido en piel humana producida por la radiación UV (Cotter et al., 2007; Goodson et al., 2009; Kang et al., 2003).

Con base en la información anterior, se puede resaltar que durante los últimos años se han propuesto dos tipos de estrategias en cuanto al tratamiento del melanoma. La primera se basa en el uso de agentes químicos que generen un incremento en las especies reactivas de oxígeno, conduciendo a la célula a muerte celular por estrés oxidativo. Mientras que la segunda opción se basa en emplear fármacos que supriman los niveles de dichas especies previniendo así la proliferación celular (Cotter et al., 2007). Como ejemplo del segundo caso se puede presentar el caso de la N-acetilcisteína (NAC) mencionado anteriormente, donde la administración de este compuesto previene la formación de especies reactivas de oxígeno (Cotter et al., 2007; Goodson et al., 2009; Kang et al., 2003). Por otra parte, en el primer grupo de estrategias que se basan en la inducción de muerte celular mediante un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno podemos mencionar la L-butionina-S-sulfoximina, la cual incrementa las especies reactivas de oxígeno en dos líneas de melanoma humano (M14 y ZAZ). El aumento del estrés

oxidativo luego del tratamiento con la L-butionina-S-sulfoximina es debido a su capacidad de disminuir los niveles de glutatión (GSH) en la células, además de disminuir la actividad de la enzima glutatión s transferasa (GST) (Fruehauf et al., 1998). Por otra parte, continuando con este mismo enfoque en la producción de especies reactivas de oxígeno, cabe mencionar algunos de los fármacos más conocidos y empleados en el tratamiento del cáncer como el cisplatino, doxorubicina y también la radio terapia, donde se ha encontrado que la inducción de la muerte celular producida por estos tratamientos es debido en parte al aumento en la especies reactivas de oxígeno (Moloney & Cotter, 2018).

Debido a la importancia de las especies reactivas de oxígeno en el desarrollo, avance y metástasis del cáncer y que la mayor producción de estas especies se presenta en la mitocondria, surge la necesidad de estudiar esta importante organela, conocida no solo como principal productor de energía en la célula, si no como diana terapéutica en la inducción de muerte celular en células cancerígenas.

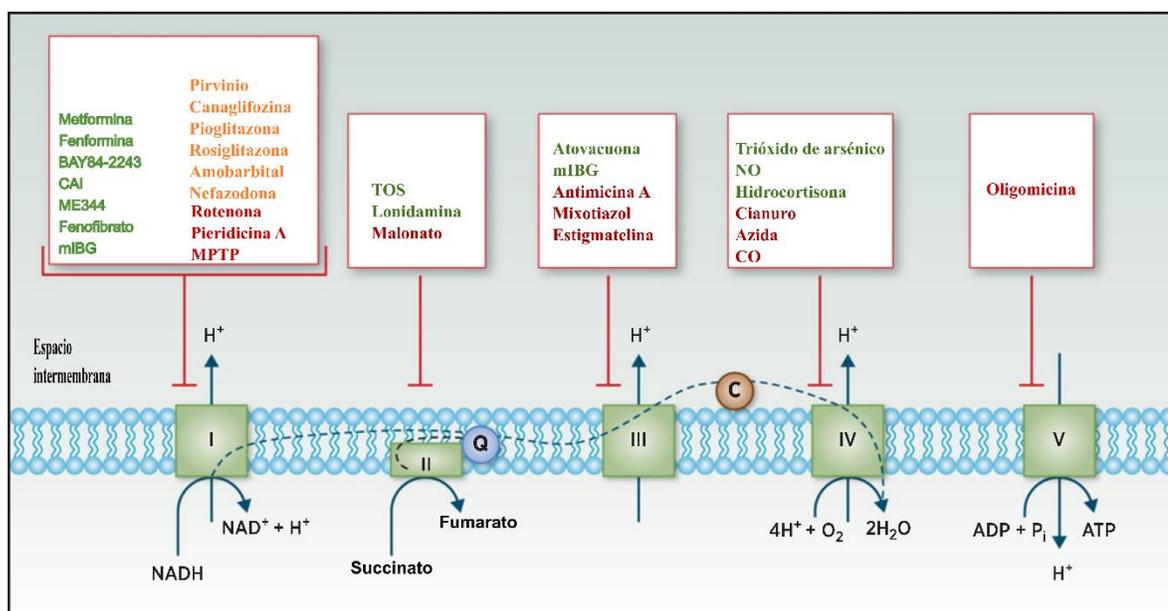
2.1.4. Mitocondria y fosforilación oxidativa como diana emergente en el tratamiento del cáncer

La fosforilación oxidativa es la vía metabólica que produce ATP mediante el transporte de electrones a través de una serie de complejos transmembrana conocidos como la cadena transportadora de electrones (Figura 33). El NADH, FADH₂, y el succinato se emplean como los sustratos donadores de electrones, que pasarán a través de los complejos mitocondriales en los cuales se bombean protones al espacio intermembrana generando un potencial que eventualmente

será empleado por el complejo V de la cadena para la producción del ATP (Moloney & Cotter, 2018).

Figura 33

Fosforilación oxidativa, vía metabólica generadora de ATP a través del transporte electrones a través de los complejos mitocondriales



Nota: En verde se muestran aquellos compuestos con actividad inhibitoria de la cadena mitocondrial de uso clínico, en naranja se encuentran aquellos inhibidores con actividad in vitro, y en rojo los inhibidores clásicos de la cadena mitocondrial. Tomado de (Ashton, Gillies McKenna, Kunz-Schughart, & Higgins, 2018).

En los últimos años se ha venido incrementando el número de compuestos anticancerígenos con actividad inhibitoria de la fosforilación oxidativa, especialmente para aquellos tipos de cáncer en los cuales se encuentra aumentada esta vía. El principal enfoque de estos compuestos consiste en disminuir la hipoxia tumoral y mejorar así los resultados obtenidos con los tratamientos

convencionales. Además, esta alternativa de emplear compuestos con actividad inhibitoria en la cadena respiratoria mitocondrial para aliviar la hipoxia tumoral también es aplicada en aquellos tipos de cáncer en los cuales no se encuentra sobre expresada la actividad de la fosforilación oxidativa. Despertando así un interés en el metabolismo mitocondrial como diana emergente en el tratamiento del cáncer (W. Wang, Karamanlidis, & Tian, 2016; S. E. Weinberg & Chandel, 2015). Ejemplo de lo anterior, la Metformina, fármaco empleado para el tratamiento de los pacientes diabéticos, donde se ha encontrado que al administrar este fármaco a pacientes con cáncer se disminuye la hipoxia tumoral gracias a su efecto inhibitorio del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 33), mejorando así la respuesta al tratamiento con radioterapia (Koritzinsky, 2015).

Como es sabido, en algunos tipos de cáncer la fosforilación oxidativa se encuentra de cierta forma inhibida o su tasa de utilización es mucho menor respecto a la glucólisis (Hersey et al., 2009; M. Yu, 2011). En estos tipos de cáncer esta inhibición de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) puede estar relacionada con mutaciones en el ADN mitocondrial, o reducción del contenido del mismo, ya que el ADN mitocondrial codifica para 13 subunidades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (M. Yu, 2011). Sin embargo, se ha reportado que la actividad de la mitocondria es esencial y juega un papel importante en la adaptación de la célula hacia la resistencia al tratamiento empleado, así como la producción de especies reactivas de oxígeno en dicha organela es necesaria para el crecimiento tumoral dado que un ambiente prooxidativo permite la activación de la proteína K-Ras (F. Weinberg et al., 2010). Se ha reportado que en los tipos de cáncer en los cuales se presentan mutaciones en el ADN mitocondrial, estas mutaciones se encuentran relacionadas con la expresión o actividad de los complejos de la cadena respiratoria

mitocondrial (Ashton et al., 2018; Barbi de Moura et al., 2012). Así mismo, se reportó que aquellos tipos de cáncer que presentan algún tipo de mutación en los genes que codifican para proteínas del complejo I de la cadena respiratoria, son más susceptibles a los inhibidores que aquellos tipos de cáncer en los cuales no se presenta esta mutación (Ashton et al., 2018). Como ejemplo de lo anterior se encuentra el efecto presentado por las biguanidinas Metformina y fenformina, fármacos empleados para la diabetes, que además de controlar los niveles de glucosa en sangre han demostrado excelentes resultados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (mama, próstata, colon y páncreas) mediante la inhibición de algunas vías metabólicas en el cáncer, y en especial por la fuerte inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Bost, Decoux-Poullot, Tanti, & Clavel, 2016).

Dentro de los tipos de cáncer reportados con mutaciones en el ADN mitocondrial encontramos la leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma clásico de Hodking, algunos tipos de cáncer de mama, adenocarcinoma de pulmón, gliomas, tumores sólidos hipóxicos de pulmón, cerebro, próstata, páncreas y especialmente en melanoma, donde se ha reportado una alta expresión de la fosforilación oxidativa gracias a la activación de la proteína PGC1 α , así como también a subtipos de melanoma donde se presenta una mutación en el gen *BRAF* luego del uso de fármacos inhibidores de esta vía (Haq et al., 2013; McQuade & Vashisht Gopal, 2015). Lo anterior, convierte a la fosforilación oxidativa en una diana importante para el tratamiento de varios tipos de cáncer en especial del melanoma, permitiendo mejorar la respuesta a los fármacos empleando compuestos inhibidores de las proteínas de la vía RAS-RAF-MAPK, junto con tratamientos inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (Ashton et al., 2018; Haq et al., 2013; Valerie S. LeBleu et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, la importancia de los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial también radica en la disminución de la hipoxia tumoral, observada principalmente en aquellos tipos de tumores sólidos donde se presenta un desbalance entre la demanda de oxígeno y el bajo abastecimiento del mismo debido a la vasculatura anormal (Dhani, Fyles, Hedley, & Milosevic, 2015). La disminución de la hipoxia tumoral ha demostrado que mejora la respuesta a los tratamientos anticancerígenos, debido a que estas células son al menos tres veces más resistentes a los tratamientos de radioterapia que una célula en condición normóxica (Higgins, O’Cathail, Muschel, & McKenna, 2015). Los esfuerzos por disminuir la hipoxia tumoral se han visto limitados debido a factores donde se incluyen la poca tolerancia a los fármacos, la ausencia de biomarcadores específicos y, la dificultad de la administración del fármaco en la regiones hipóxicas que generalmente se encuentran poco vascularizadas, requiriendo así una mayor dosis del fármaco (Koritzinsky, 2015). Dentro de los tratamientos convencionalmente empleados con el fin de aumentar el suplemento de oxígeno tenemos los nitroimidazoles, inhalación de oxígeno hiperbárico y el carbógeno (Diepart et al., 2012; Jordan & Sonveaux, 2012). De forma alternativa, la inhibición de la fosforilación oxidativa surge como un nuevo enfoque con el fin de disminuir el consumo de oxígeno en la célula y así mantener la retención del oxígeno en el tumor y posteriormente disminuir la hipoxia tumoral (Koritzinsky, 2015).

La disminución de la hipoxia tumoral mediante la inhibición de la fosforilación oxidativa llama la atención como método terapéutico debido a que: (1) las bajas concentraciones de oxígeno en las zonas tumorales no son un limitante para realizar la fosforilación oxidativa, y (2) la fosforilación oxidativa (OXPHOS) puede generar ATP aun en concentraciones muy bajas de

oxígeno (S. E. Weinberg & Chandel, 2015). Así, la inhibición de la fosforilación oxidativa resulta ser una alternativa interesante ya que al disminuir el consumo de oxígeno se podría tener como consecuencia un aumento de la disponibilidad del oxígeno en el tejido, el cual podría difundirse a las regiones inicialmente hipóxicas (Ballot et al., 2010; S. E. Weinberg & Chandel, 2015). Además, esta estrategia podría aplicarse tanto para aquellos tipos de cáncer en los que la fosforilación oxidativa se encuentra regulada al alza o inhibida (Rumsey et al., 1990; F. Weinberg et al., 2010).

Son varios los beneficios presentados al inhibir la fosforilación oxidativa frente a los tratamientos convencionales empleados con el fin de disminuir la hipoxia. Primero, el enfoque inhibitorio de la OXPHOS, como se mencionó anteriormente aplica para una gran variedad de tipos de cáncer, independientemente de si la actividad de la cadena mitocondrial se encuentra elevada o no, ampliando así la aplicabilidad de este enfoque, dado que para este tratamiento no es necesario que el inhibidor llegue a la zona hipóxica, ya que actuaría inicialmente en zonas normóxicas disminuyendo el consumo de oxígeno por esas células, y aumentando así la concentración de oxígeno el cual se puede difundir hasta llegar a las zonas hipóxicas. Enfoque contrario con los fármacos empleados anteriormente como los nitroimidazoles, los cuales deben actuar específicamente en las zonas hipóxicas (Ashton et al., 2016; Chowdhury et al., 2016; Diepart et al., 2012; Koritzinsky, 2015).

2.1.5. Inhibidores de la OXPHOS con potencial actividad terapéutica

Son varias las condiciones que deben cumplir estos compuestos con promisorio actividad terapéutica antes de ser aprobados por la FDA. En este momento hay varios compuestos que potencialmente podrían cumplir las condiciones necesarias para ser aprobados por la FDA. Sin embargo, aún se encuentran en etapas de estudios *in vitro* e *in vivo* (Tabla 3).

Tabla 3

Inhibidores de la fosforilación oxidativa evaluados in vitro, in vivo o fase clínica para terapia anticancerígena

COMPUESTO	USO CLÍNICO PRIMARIO	COMPLEJO TARGET	RESULTADOS <i>in vitro</i> O <i>in vivo</i>
METFORMINA	Diabetes	I	Reducción del crecimiento tumoral, aliviando la hipoxia tumoral.
LONIDAMINA	Experimental	II	Inhibición del crecimiento tumoral en la línea U87MG de glioblastoma
A-TOS	Análogo de Vitamina E	II	Inhibe complejo II en tumores de fibroblastos de hámster
ATOVAQUONE	Malaria	III	Alivia la hipoxia y mejora la respuesta a la radio terapia en tumor de faringe
HIDROCORTIZONA	Eczema	IV	Alivia la hipoxia en tumores FSall y mejora la respuesta a radioterapia
SIMVASTIN	Hipolipemiente	II	IC ₅₀ de 30 μM en mitocondrias aisladas
PAROXETINA	Antidepresivo	V	IC ₅₀ de 1.6 μM en mitocondrias aisladas

Nota: adaptado de (Ashton et al., 2018)

Para mencionar algunos de los compuestos que actualmente están bajo estudios encontramos la metformina, donde estudios epidemiológicos han demostrado que hay una menor tasa de incidencia en cáncer así como una mejor respuesta a los tratamientos anticancerígenos en

pacientes diabéticos medicados con este fármacos respecto a pacientes diabéticos con medicamentos alternativos e incluso con pacientes no diabéticos (Koritzinsky, 2015; Pernicova & Korbonits, 2014). En cuanto a sus resultados *in vitro* se ha demostrado que la metformina inhibe el consumo de oxígeno en varias líneas celulares como la línea celular de cáncer de colon HCT116 (Ashton et al., 2018; Wheaton et al., 2014). Por otra parte, en ensayos *in vivo* se ha demostrado que la metformina inhibe el crecimiento tumoral, reduciendo a su vez la hipoxia en tumores xenogénicos con mejora en la respuesta a la radioterapia (Ashton et al., 2016). Resultados como los anteriores han generado que la metformina se encuentre actualmente bajo ensayos clínicos que medirán su eficacia en el tratamiento contra el cáncer (Koritzinsky, 2015; Pernicova & Korbonits, 2014; Scotland et al., 2013). Dentro del principal mecanismo de acción de la metformina se encuentra la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, provocando una disminución en la síntesis de ATP, activación de la AMPK e inhibición del complejo mTORC tal y como se explica en el modelo de tumor xenogénico en HCT116 (Chowdhury et al., 2016; Scotland et al., 2013; Wheaton et al., 2014). De igual forma otro de los compuestos empleados para la diabetes, la fenformina, ha demostrado presentar inhibición del crecimiento tumoral basado en la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, sin embargo, su uso es limitado a un posible aumento de la acidosis láctica (Bost et al., 2016).

Otro fármaco aprobado por la FDA es el Atovaquone, este medicamento ha sido empleado hace más de 30 años para el tratamiento de la malaria y actúa mediante la inhibición del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial del parásito *Plasmodium falciparum* (Nixon et al., 2013). Se ha demostrado que actúa inhibiendo el mismo complejo de la cadena respiratoria mitocondrial

en diversas líneas de cáncer, así como en tumores xenográficos de mieloma disminuyendo el consumo de oxígeno y aliviando la hipoxia (Ashton et al., 2016; Birth, Kao, & Hunte, 2014).

En resumen, el estudio de las biguanidinas como la metformina y la fenformina o de análogos de la ubiquinona como el Atovaquone y demás moduladores de la cadena respiratoria mitocondrial es un área emergente atractiva en el tratamiento del cáncer que requiere especial cuidado ya que se requiere determinar sus propiedades farmacocinéticas, así como también descartar posibles efectos citotóxicos no deseados (Ashton et al., 2018; Birth et al., 2014; Tiwari, Pandey, Abidi, & Rizvi, 2013).

La información del marco de referencia anterior resalta la importancia de las vías metabólicas alteradas en el melanoma, la importancia de la especies reactivas de oxígeno en el desarrollo, propagación, y metástasis del cáncer, así como el surgimiento de terapias basada en el sistema antioxidante de la célula y el uso de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial con el fin de disminuir el consumo de oxígeno y aliviar la hipoxia tumoral mejorando la respuesta a tratamientos convencionales. Por lo anterior, en este capítulo se evaluó el efecto de los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** sobre la actividad de algunas enzimas de la vía glucolítica en la línea B16F10, así como su efecto sobre parámetros de la bioenergética mitocondrial en la línea de melanoma murino B16F10 y en mitocondrias aisladas de hígado de rata, empleando la siguiente metodología.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Consideraciones generales

De acuerdo con el diseño metodológico de este estudio (Figura 25), los ensayos y resultados descritos a lo largo del capítulo dos, corresponden a la Fase II de dicho diseño. En esta fase, se evaluó el efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre la

bioenergética mitocondrial. Cabe mencionar que en los siguientes ensayos para la determinación del mecanismo de acción de los híbridos moleculares de Tetrahydroquinolina/isoxazolina, solo se emplearon los híbridos **3a**, **3i** y **3m** (Figura 34) sobre la línea celular de melanoma murino B16F10 debido a que fueron los híbridos con mejores efectos citotóxicos presentados en la Fase I.

2.2.2. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre la vía glucolítica como fuente de energía en el cáncer.

Los híbridos moleculares de Tetrahydroquinolina/Isoxazolina (**3a**, **3i**, y **3m**) se evaluaron sobre las enzimas hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa, enzima limitantes de la vía glucolítica.

El análisis de la actividad de estas enzimas se realizó por medio de un acople con enzimas dependientes de NAD^+ o NADP^+ . Acompañando la reducción de NAD^+ a NADH y NADP^+ a NADPH a una longitud de onda de 340nm (B, Bond, Burnett, Keech, & Bowers, 1976).

2.2.2.1. Hexoquinasa. La hexoquinasa es la enzima que cataliza el primer paso en la vía glucolítica. la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato, proceso dependiente de ATP. Con base en la importancia de esta enzima en la reprogramación del metabolismo de una célula cancerígena para su supervivencia, se midió la actividad de la hexoquinasa al proveer glucosa como sustrato en el sistema de reacción, donde la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa facilitará la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-fosfoglucolactona en una reacción dependiente de NADP^+ (W. Yi et al., 2012).

Para esta medición las células de melanoma murino B16F10 fueron tratadas con los híbridos **3a**, **3i** y **3m** en una concentración de 10 μM durante 24 horas. Posteriormente al tiempo

de tratamiento las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS pH 7.4; se preparó una alícuota para la cuantificación de proteína. Después, las células se incubaron en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton 1%, DTT 1 mM, y coctel inhibidor de proteasas) por 30 minutos hasta lisis celular.

Después de la lisis se adicionó el contenido proteico a la buffer de reacción compuesta por (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ATP 0,6 mM, glucosa 100 mM, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.25 U/mL). La reacción se inició una vez se agregó NADP⁺ 0,2 mM y se monitoreó su reducción a 340 nm empleando un lector de microplacas MultiSkan Go-thermo (W. Yi et al., 2012).

Los resultados se expresaron como nmoles de NADPH formado por min por mg de proteína, empleando la ley de Beer y el coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

2.2.2.2. Fosfofructoquinasa. La fosfofructoquinasa (PFK) es la principal reguladora de la vía glucolítica, en ella la glucosa-6-fosfato puede entrar en la vía de las pentosas fosfatos incrementando los niveles de precursores biosintéticos, así como los niveles de glutatión (GSH), permitiendo a la célula tumoral proliferar. Adicionalmente, la glucosa-6-fosfato también puede seguir a través de la vía glucolítica (W. Yi et al., 2012).

Debido a su capacidad reguladora en la vía glucolítica, se evaluó el efecto de los compuestos más promisorios sobre la actividad de la PFK, la actividad de esta enzima depende de la concentración de AMP, ADP y ATP, presenta una activación alostérica por AMP y fructosa-2,6-bifosfato y una inhibición por ATP y citrato (O'Neil, Wu, & Mullani, 2005).

Este protocolo se llevó a cabo como descrito por Yi et al., 2012 (W. Yi et al., 2012). Para esta medición las células tratadas con los híbridos moleculares durante 24 horas en una concentración de 10 μM , fueron tripsinizadas y posteriormente lavadas con PBS pH 7.4 e incubadas en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Tritón 1 %, DTT 1 mM, Coctel inhibidor de proteasas) por 30 minutos hasta lisis celular.

Después de la lisis celular se agregó el contenido a la buffer de reacción compuesta por (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl_2 5 mM, ATP 1.5 mM, KCl 100 mM, Na_2HPO_4 5 mM, AMP 0,01 mM, fructosa-6-fosfato 5 mM, triosa fosfato isomerasa 5 U, aldolasa 1 U y, α -gliceraldehido fosfato deshidrogenasa 1U). Donde la reacción se inició luego de adicionar NAD^+ 0,2 mM y se monitoreó la velocidad de reducción midiendo la absorbancia a 340 nm (W. Yi et al., 2012).

Los resultados se expresaron en nmoles de NADH producido por min por mg de proteína, empleando la ley de Beer y coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

2.2.2.3. Piruvato quinasa. La piruvato quinasa (PK) es una de las enzimas reguladoras de la vía glucolítica, la PK cataliza el paso final de la glucólisis por la conversión del fosfoenol piruvato y ADP a piruvato y ATP. El producto final de la PK, el piruvato, puede ser convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa, la cual es dependiente de NADH, por ende el acople con esta enzima puede determinarse por la pérdida en la absorbancia del NADH a 340nm (O'Neil et al., 2005).

Para esta medición las células B16F10 luego de ser tratadas durante 24 horas por los híbridos **3a**, **3i** y **3m** a 10 μM fueron tripsinizadas y lavadas con PBS pH 7.4. Posteriormente, fueron incubadas en buffer de lisis (Tris-HCl 50mM, pH 7,5, EDTA 1mM, NaCl 150mM, Triton

1%, DTT 1mM, Coctel inhibidor de proteasas) por 30 minutos hasta lisis celular (W. Yi et al., 2012).

El contenido lisado fue agregado a la buffer de reacción compuesta por (Tris-HCl 50mM, pH 7,5, MgCl₂ 5mM, ADP 0,6mM, KCl 100mM, Na₂HPO₄ 5 mM, PEP 0,5mM y fructosa-1,6-bifosfato 10μM y, lactato deshidrogenasa 10U). Donde se inició la reacción al adicionar NADH 0,18mM y posteriormente fue monitoreada midiendo la absorbancia a 340nm (W. Yi et al., 2012).

Los resultados se expresaron como nmoles de NAD⁺ oxidado por min por mg de proteína, empleando la ley de Beer y como como coeficiente de extinción molar ($\epsilon= 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

2.2.3. Efecto de los híbridos moleculares sobre la respiración celular en la línea B16F10

Con el fin de elucidar el mecanismo de acción de los híbridos moleculares **3a**, **3i** y **3m** se evaluó su efecto sobre el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial en cultivo celular. Para esto las células B16F10 fueron tratadas con los compuestos 10 μM de los compuestos por un periodo de 24 horas. Después, las células fueron aisladas con 1 mL de tripsina, y resuspendidas en medio de cultivo EMEM. El consumo de oxígeno fue determinado mediante un equipo Oxygraph-2k (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria) dotado con dos cámaras de oxígeno a 37°C bajo agitación constante, y se determinó el efecto de los híbridos en tres estados denominados: basal, respiración en ausencia de inhibidores y/o desacopladores; leak, respiración en presencia de oligomicina (2 μg/mL); y desacoplado, el consumo de oxígeno en presencia del desacoplador FCCP (0,5 μM). El flujo de oxígeno en los estados descritos anteriormente fue corregido con el descuento de la respiración no mitocondrial, que se obtuvo con

la adición de rotenona (0,5 μM) y antimicina (3 $\mu\text{g/mL}$) (Meira, Heinrich, Maria, Correia, & Martinez, 2017). Los resultados son expresados como la media del porcentaje del flujo de oxígeno por número de células ($\text{pmol}/(\text{seg} * 1 \times 10^6 \text{ células}) \pm \text{DS}$).

2.2.4. Efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el potencial de membrana

Las células B16F10 fueron tratadas con los híbridos **3a**, **3i** y **3m** (10 μM) durante 24 horas. Después del tiempo de tratamiento fueron colectadas empleando una solución de tripsina. La despolarización de la membrana mitocondrial fue medida mediante citometría de flujo. Para esto, las células fueron lavadas con PBS frío y colectadas por centrifugación. Luego, se adicionó una solución de Rhodamina 123 (5 μM) y se incubaron por 15 minutos, y posterior al periodo de incubación las células fueron lavadas dos veces con PBS frío. La fluorescencia de las células fue medida empleando un citómetro de flujo Guava5 easyCyte 12HT Benchtop (Mullipore1, Billerica, MA) y los resultados fueron analizados con el software GraphPad Prism 5. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de potencial de membrana mitocondrial respecto al control (Cury-Boaventura, Pompéia, & Curi, 2005).

2.2.5. Efecto de los híbridos moleculares sobre la bioenergética mitocondrial

Es importante resaltar que ensayos realizados en mitocondrias aisladas de hígado de rata se hicieron en conjunto con la estudiante de pregrado Ana Milena Pérez. A su vez, los animales empleados para realizar ensayos sobre la bioenergética mitocondrial correspondieron a ratas Wistar suministradas y manipuladas por el bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad

Industrial de Santander, bajo la ley 84 de 1989 (Cap. IV, Art. 23-26) y la resolución 8430 de 1993 (Título IV, artículos 83-93) que regulan la investigación con animales en Colombia

2.2.5.1. Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata. Las mitocondrias fueron aisladas del hígado de rata Wistar macho (aproximadamente 160 g de peso, en ayuno por doce horas) de acuerdo con el protocolo descrito por Voss y colaboradores (Voss, Cowles, & Bacila, 1963). Para esto, la rata se sacrificó por decapitación y se retiró inmediatamente el hígado que fue inmerso en medio de aislamiento (D-Manitol 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y BSA 0,1% p/v, pH 7,4) a 4°C. El tejido se lavó con medio de aislamiento frío (para eliminar el exceso de sangre), se cortó y homogeneizó en un homogeneizador van Potter Elvehjem. La suspensión obtenida se centrifugó a 600xg y 4°C durante cinco minutos con el fin de separar células intactas, membranas y núcleos. El sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 7000xg y 4°C por diez minutos. El nuevo pellet correspondiente a las mitocondrias intactas se resuspendió en medio de aislamiento frío y se centrifugó a 6000xg y 4°C durante diez minutos.

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

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

Las mitocondrias íntegras aisladas (1 mg/mL) se dispusieron en el oxígrafo en un medio de incubación compuesto por: manitol 125 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES 10 mM y KCl 65 mM, pH 7,4, a 28°C con agitación constante. Este sistema se suplementó con glutamato de sodio 5 mM, KH₂PO₄ (Pi) 1,6 mM y ADP 0,6 mM para medir el consumo de oxígeno vía complejo I de la cadena respiratoria. Por otra parte, las mitocondrias (1 mg/mL) se suplementaron con rotenona 1 µM (inhibidor del complejo I), succinato de sodio 3 mM, KH₂PO₄ (Pi) 1,6 mM y ADP 0,6 mM para medir la respiración vía complejo II (Voss, Campello, & Bacila, 1961).

Con el fin de evaluar su efecto en el transporte electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, los compuestos de tetrahydroquinolina/isoxazolina (en concentraciones de 1, 5, 12.5, y 25 µM) se incubaron con las mitocondrias durante dos minutos, antes de inducir la respiración mitocondrial por adición de los sustratos del complejo I o el complejo II.

Los resultados se expresaron en nanomoles de oxígeno consumido por minuto por miligramos de proteína respecto al control.

2.2.5.3. Efecto sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. Las mitocondrias aisladas se utilizaron como fuente de enzimas tras ser lisadas por ciclos de congelamiento y descongelamiento a $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las proteínas extraídas se cuantificaron por el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

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

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

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

La oxidación de NADH por la NADH deshidrogenasa se monitoreó a 420 nm por la reducción del ferricianuro de potasio que actuó como receptor artificial de electrones en presencia de rotenona. La concentración del ferricianuro de potasio reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar 1,04 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 420 nm (Arif, Samin, van Leeuwen, Oppentocht, & Janssen, 2012) aplicando la Ley de Beer. Se expresaron los resultados en μ moles de ferricianuro de potasio reducido por minuto por miligramo de proteína.

2.2.5.3.3. NADH citocromo c reductasa. La actividad de la enzima NADH citocromo c reductasa se evaluó mediante el protocolo descrito por Somlo, registrando la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm (Somlo, 1965). Para ello se utilizó un sistema de reacción compuesto por: Solución tampón fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, KCN 1 mM y NADH 50 μ M incubado a 28°C durante diez minutos. La reacción se inició por la adición de citocromo c (oxidado) 40 μ M. La concentración del citocromo c reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar redox (ϵ_{redox}) 19,8 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm aplicando la Ley de Beer, y los resultados fueron expresados en μ moles de citocromo c reducido por minuto por miligramo de proteína.

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

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

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

La reacción se inició por la adición de citocromo c 40 μ M. La concentración del citocromo c reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar (ϵ redox) 19,8 mM⁻¹.cm⁻¹ a 550 nm (Appleby & Morton, 1959) aplicando la Ley de Beer, y los resultados se expresaron en μ moles de citocromo c reducido por minuto por miligramo de proteína.

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

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

2.2.5.3.8. ATPasa en mitocondrias integra y fragmentadas. La actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas se determinó mediante la cuantificación del fosfato resultante de la hidrólisis del ATP de acuerdo con el método de Pullman y colaboradores (Pullman M. E, Hervey S, 1960). El sistema de reacción compuesto por: solución tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgSO_4 3 mM, 1 mg de proteína mitocondrial, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 mM y 10 unidades (U) de piruvato quinasa (1 U de piruvato quinasa convierte 1 μ mol de PEP a piruvato por minuto), se incubó a 28°C durante diez minutos. La reacción se inició por la adición de ATP 4 mM y se interrumpió diez minutos después de agregar ácido tricloroacético (TCA) al 5% (v/v).

A continuación, el sistema de reacción se centrifugó a 10000xg por un minuto y se tomó el sobrenadante para cuantificar el fosfato liberado en el medio. La concentración de fosfato en las muestras se determinó colorimétricamente por la formación de un complejo de fosfomolibdato

reducido con ácido ascórbico, que produjo una coloración azul cuya absorbancia se midió a 820 nm (P. Chen, Toribara, & Warner, 1971). Para esto, se realizó previamente una curva de calibración con patrones conocidos de KH_2PO_4 en un rango de concentraciones de 1,0-300 μM .

2.2.6. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre el sistema redox

2.2.6.1. Superóxido dismutasa (SOD). La determinación de la actividad de la superóxido dismutasa fue llevada a cabo por el método desarrollado por NISHIKIMI et al. 1972. En esta reacción el radical superóxido generado en presencia de PMS y NADH, es reducido a peróxido de hidrógeno en presencia de la SOD. El sistema de reacción fue compuesto por tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7.8), NADH 340 μM , NBT 72 μM y PMS 30 μM . Adicionalmente, se agregó 0.1 mg de proteína mitocondrial y 300 $\mu\text{g/mL}$ de proteína celular. La reacción fue iniciada por la adición de NADH y se acompañó la oxidación de este a 560 nm. Los resultados fueron expresados en porcentaje con relación al control (Nishikimi, Appaji Rao, & Yagi, 1972)

2.2.6.2. Catalasa (CAT). La actividad de la catalasa fue medida acompañando la disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno en un sistema de reacción compuesto por un tampón fosfato 50 mM (pH 7.0), H_2O_2 10 mM, 0.1 mg de proteína mitocondrial y 200 $\mu\text{g/mL}$ de proteína celular. El ensayo fue iniciado al agregar el peróxido de hidrógeno y acompañando la reacción a 240 nm. Los resultados fueron expresados con relación al control y calculados tomando el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 ($3.94 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Aebi, 1984).

2.2.6.3. Glutaciona peroxidasa (Gpx). La actividad de la glutaciona peroxidasa fue realizada de acuerdo con el protocolo propuesto por Flohé & Gunzler (1984). En este ensayo la glutaciona peroxidasa cataliza la reducción del peróxido en presencia de glutatión (GSH) generando glutatión oxidado (GSSG), luego glutatión oxidado en presencia de NADPH y glutaciona reductasa es reducido a glutatión. La actividad de la glutatión peroxidasa fue acompañada por la reducción de la absorbancia del NADPH a 340 nm en un sistema de reacción compuesto por tampón fosfato 100 mM (pH 7.0), EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0.15 mM, glutaciona reductasa 0.2 U, t-butil hidroperóxido 0.5 mM, 0.1 mg de proteína mitocondrial o 200 µg/mL de proteína celular. La reacción fue iniciada al agregar el t-butil hidroperóxido y los resultados fueron expresados en porcentaje con relación al control, considerando como coeficiente de extinción molar del NADPH ($6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Flohé & Günzler, 1984).

2.2.6.4. Glutaciona reductasa. La actividad de la glutaciona reductasa fue evaluada por el protocolo propuesto por Sies et al. (1979). En este ensayo la glutaciona reductasa cataliza la reducción del glutatión oxidado en presencia de NADPH en un sistema de reacción constituido por tampón fosfato 100 mM (pH 7.0), GSSG 0.6 mM, NADPH 0.075 mM, 0.1 mg de proteína mitocondrial y 200 µg/mL de proteína celular. La reacción fue iniciada al agregar el GSSG y se acompañó la reacción a 340 nm. Los resultados fueron expresados en porcentaje con relación al control considerando el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Sies, Koch, Martino, & Boveris, 1979).

2.2.7. Análisis estadístico

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

2.2.8. Consideraciones éticas

2.2.8.1. Disposición adecuada de los residuos o desechos químicos. Los residuos biológicos y/o químicos generados en el desarrollo de este proyecto fueron manipulados de acuerdo con el Manual de Gestión Integral de Residuos-2010 del Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia y los lineamientos del Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR) de la Universidad Industrial de Santander, órgano institucional que se encarga de velar por la aplicación de estrategias preventivas y cumpliendo con las normas legales ambientales para el manejo adecuado de los residuos peligrosos.

Los híbridos moleculares de Tetrahydroquinolina/Isoxazolina y la familia de Indenoquinolinas, los solventes y los colorantes usados en esta investigación fueron clasificados como residuos químicos peligrosos debido a que pueden ser citotóxicos y causar daño a la salud humana y/o el medio ambiente. Así mismo se consideraron peligrosos los envases, empaques o embalajes que estuvieron en contacto con ellos. Por tal razón, teniendo en cuenta el código de colores para el almacenamiento de estas sustancias, los residuos se dispusieron en bolsa de color

rojo etiquetada con el rótulo “Riesgo Químico” y fueron entregados en la ruta de recolección y almacenamiento de residuos peligrosos organizada por el PGIR en el Parque Tecnológico Guatiguará, diligenciando el formato FGA.06 para su disposición final a la empresa contratada para su neutralización e incineración.

Por su parte, los residuos biosanitarios (p. ej. botellas de cultivo, microplacas), anatomopatológicos (p. ej. fragmentos de órganos) y animales de experimentación están clasificados como residuos infecciosos o de riesgo biológico de acuerdo con el Manual de Gestión Integral de Residuos, por esta razón fueron dispuestos en bolsa de color rojo con el rótulo “Riesgo biológico”.

2.2.8.2. Ensayos con células. De acuerdo con los principios establecidos en las normas de Buenas Prácticas Clínicas (BPC) (INVIMA, 2009), esta investigación corresponde a estudio no clínico y siguió las orientaciones del numeral 7.3.5 de las normas BPC, aquí se realizaron ensayos dosis respuesta en células cultivadas *in vitro*. Adicionalmente, en la resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia, esta investigación se considera de no riesgo de acuerdo con el artículo 11 de esta última resolución (INVIMA, 1993).

2.3. Resultados

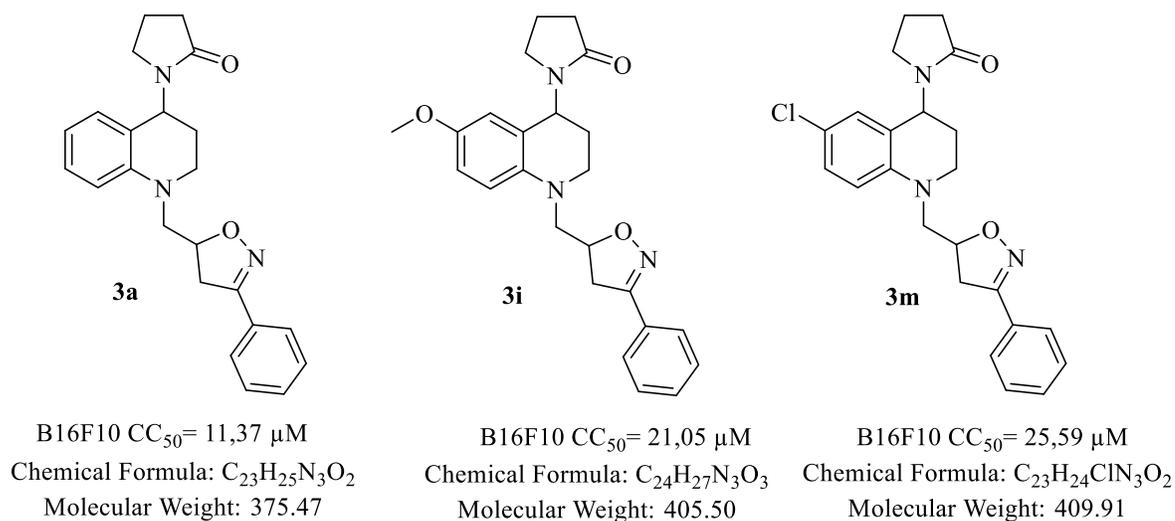
A continuación, se describen los resultados obtenidos al evaluar los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina (**3a**, **3i** y **3m**) sobre la vía glucolítica y el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial en la línea B16F10. Además, se exponen los

resultados obtenidos sobre las enzimas encargadas de la reducción de las especies reactivas de oxígeno.

En la figura 34 se observa la estructura química de los híbridos **3a**, **3i** y **3m** quienes presentaron mejor efecto citotóxico sobre la línea de melanoma murino B16F10. Estos híbridos están compuestos por los farmacóforos tetrahydroquinolina e isoxazolina, donde el híbrido **3a** presenta un hidrógeno en el C-6 del anillo tetrahydroquinolínico mientras que los híbridos **3i** y **3m** presentan un grupo metoxilo y cloro, respectivamente.

Figura 34

Estructura química de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina 3a, 3i y 3m



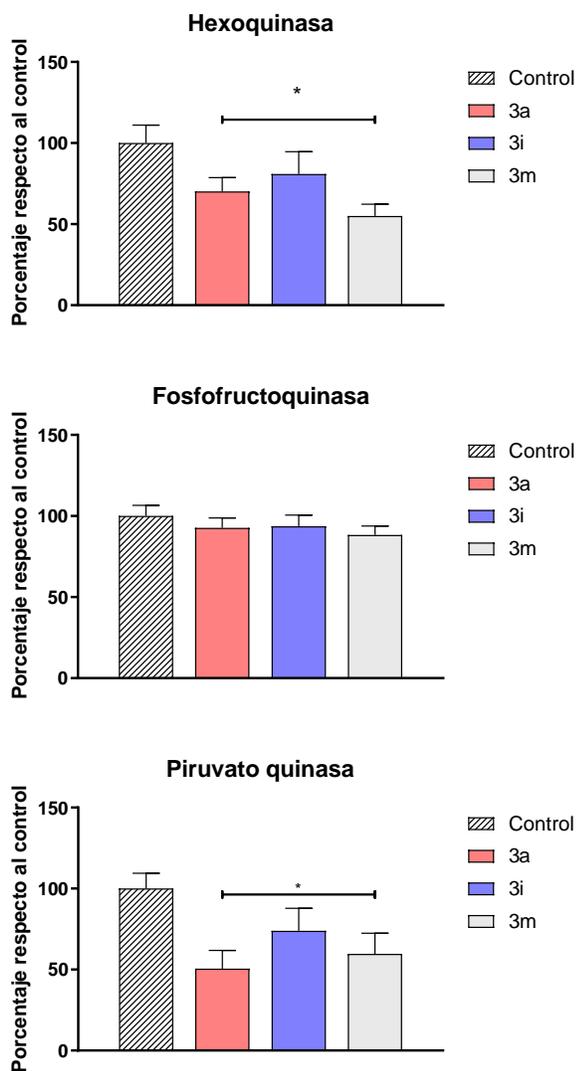
2.3.1. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre la vía glucolítica como fuente de energía en el cáncer.

El deterioro e inhibición de la vía glucolítica por acción de los híbridos moleculares puede alterar la producción de lactato, piruvato y otros metabolitos generados en esta vía metabólica (Filipp et al., 2012). Por esta razón, se decidió evaluar el efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina **3a**, **3i**, y **3m** sobre algunas de las enzimas claves en la regulación de la vía glucolítica.

Así, los resultados obtenidos evidencian inhibición sobre la hexoquinasa (Figura 35) en cerca del ~30%, ~20% y ~45% en presencia de **3a**, **3i**, y **3m**, respectivamente, luego de ser tratados durante 24 horas a 10 μ M. Efecto similar fue observado para la enzima piruvato quinasa, enzima encargada de catalizar la transferencia de un grupo fosfato al fosfoenolpiruvato generando piruvato. Aquí, los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina generaron un efecto inhibitorio sobre esta enzima de cerca del ~50%, ~26% y ~40% para los compuestos **3a**, **3i**, y **3m**, respectivamente. Por otra parte, no se encontró cambio alguno sobre la actividad de la enzima fosfofructoquinasa por acción de los híbridos. De esta forma, el efecto inhibitorio de los híbridos moleculares sobre las enzimas hexoquinasa y piruvato quinasa, nos podrían dar indicios de la dificultad presentada por la célula para conseguir energía por medio de la vía glucolítica en presencia de los híbridos **3a**, **3i**, y **3m**.

Figura 35

Efecto de los híbridos moleculares de tetrahidroquinolina/isoxazolina sobre las enzimas de la vía glucolítica en la línea B16F10.



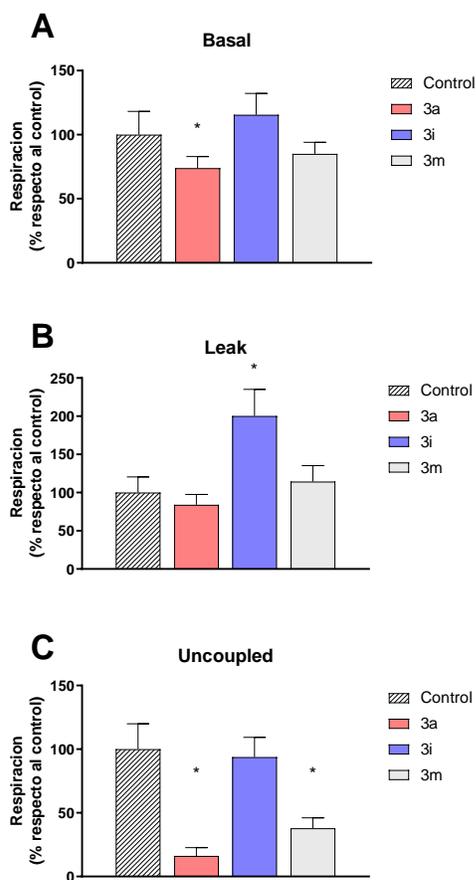
Nota: Las condiciones experimentales se encuentran descritas en la sección 8.2. Los valores del control corresponden a 100% de actividad siendo **Hexoquinasa:** 24.02 ± 4.23 nmol de NADPH formado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína; **Fosfofructoquinasa:** 10.48 ± 1.04 nmol NADH producido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína; **Piruvato quinasa:** 48.20 ± 6.98 nmoles NADH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Los resultados son expresados como la media \pm DE de tres experimentos independientes. * denota valores estadísticamente significativos respecto al control con valores de $p < 0.05$.

2.3.2. Efecto de los híbridos moleculares sobre la respiración celular en la línea B16F10

Con el objetivo de evaluar el efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre la respiración celular se trató la línea B16F10 con los híbridos **3a**, **3i** y **3m** durante 24 horas a una concentración de 10 μM y se evaluaron los efectos sobre el estado basal, leak y desacoplado.

Figura 36

Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en la respiración de celular en la línea B16F10.



Nota: El consumo de oxígeno fue determinado en un Oroboros 2-K se midió la respiración celular en ausencia de inhibidores o desacopladores (Estado basal), en presencia de oligomicina (estado leak) y en presencia de FCCP (Estado desacoplado). Los resultados fueron expresados en porcentaje respecto al control donde: 100% Basal= 35.19 ± 6.40 ; 100% Leak= 18.01 ± 0.73 ; 100% Desacoplado= 45.85 ± 9.14 pmolO₂/s*10⁶ Células respectivamente. Valores presentados como la media \pm DE de tres experimentos independientes. * denota valores estadísticamente significativos respecto al control con un valor de $p < 0.05$

En estos resultados se observó que el híbrido **3a** genera una inhibición de la respiración basal de ~26%, respecto al control (Figura 36A). En relación al estado leak, un estado de máximo potencial de membrana debido a la presencia de la oligomicina, un inhibidor del complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial (Penefsky, 1985), no se observaron cambios significativos para los híbridos **3a** y **3m**, no obstante para el híbrido **3i** se observó un aumento del consumo de oxígeno en el estado leak de ~100%, respecto al control (Figura 36B). Por otra parte, en el estado de menor potencial de membrana (Figura 36C), el estado desacoplado, el híbrido **3m** al igual que el híbrido **3a** generaron una disminución del consumo de oxígeno de ~72% y ~80%, respectivamente. Así, los resultados obtenidos indicarían un posible efecto desacoplador del híbrido **3i** debido al aumento en el consumo de oxígeno en estado leak, mientras la disminución del consumo de oxígeno en estado basal y desacoplado generado por los híbridos **3a** y **3m**, podría estar relacionada con una inhibición del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial.

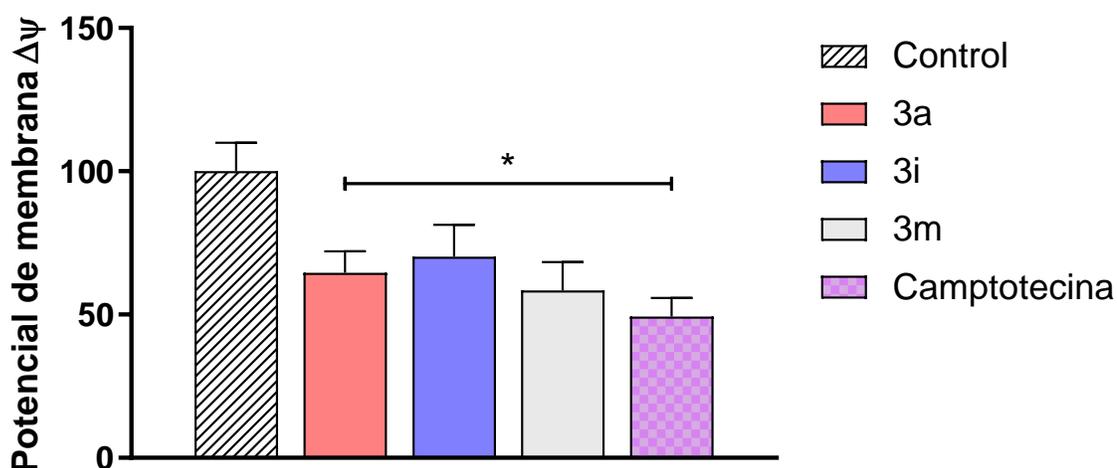
2.3.3. Efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el potencial de membrana

Para determinar si los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina presentan efecto alguno sobre el potencial de membrana mitocondrial, se evaluó su efecto en células tratadas con 10 μ M de cada híbrido por 24 horas empleando rodamina-123 y citometría de flujo. Los resultados observados en la figura 37 indican que los híbridos **3a**, **3i** y **3m** generan una disminución

en el potencial de membrana cerca de ~36%, ~30% y ~42%, respectivamente, al igual que el fármaco empleado como referencia camptotecina (5 μ M) quien generó una disminución del potencial de membrana en B16F10 de ~50%.

Figura 37

Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el potencial en la línea B16F10.



Nota: Los resultados obtenidos fueron determinados por citometría de flujo después de 24 horas de tratamiento, se usó camptotecina 5,0 μ M como control positivo. Los resultados son expresados como la media \pm DE de tres experimentos independientes. * denota valores estadísticamente significativos respecto al control con valores de $p < 0.05$.

2.3.4. Efecto de los híbridos moleculares sobre la bioenergética mitocondrial

La mitocondria no solo es la fuente de energía de la célula, sino que además relaciona con diferentes procesos de señalización que incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno, e inducción de procesos de muerte celular, entre otros (Armstrong, 2007). Teniendo en cuenta lo

anterior, se evaluó el efecto de los híbridos moleculares sobre mitocondrias aisladas de hígados de rata Wistar. Los resultados presentados en la figura 38, indican que el híbrido **3a** genera una disminución del consumo de oxígeno en el estado 3 (en presencia de ADP) de forma dosis dependiente, siendo estadísticamente significativo a partir de la concentración de 1 μM (porcentaje de inhibición que va desde un $\sim 42\%$ a $\sim 67\%$). Adicionalmente, el híbrido **3a** genera una disminución del consumo de oxígeno en estado 4 (consumo de oxígeno una vez consumido el ADP) en presencia de glutamato (Figura 38B), con una inhibición que va desde $\sim 59\%$ a $\sim 77\%$ siendo estadísticamente significativa respecto al control a partir de la concentración de 1 μM .

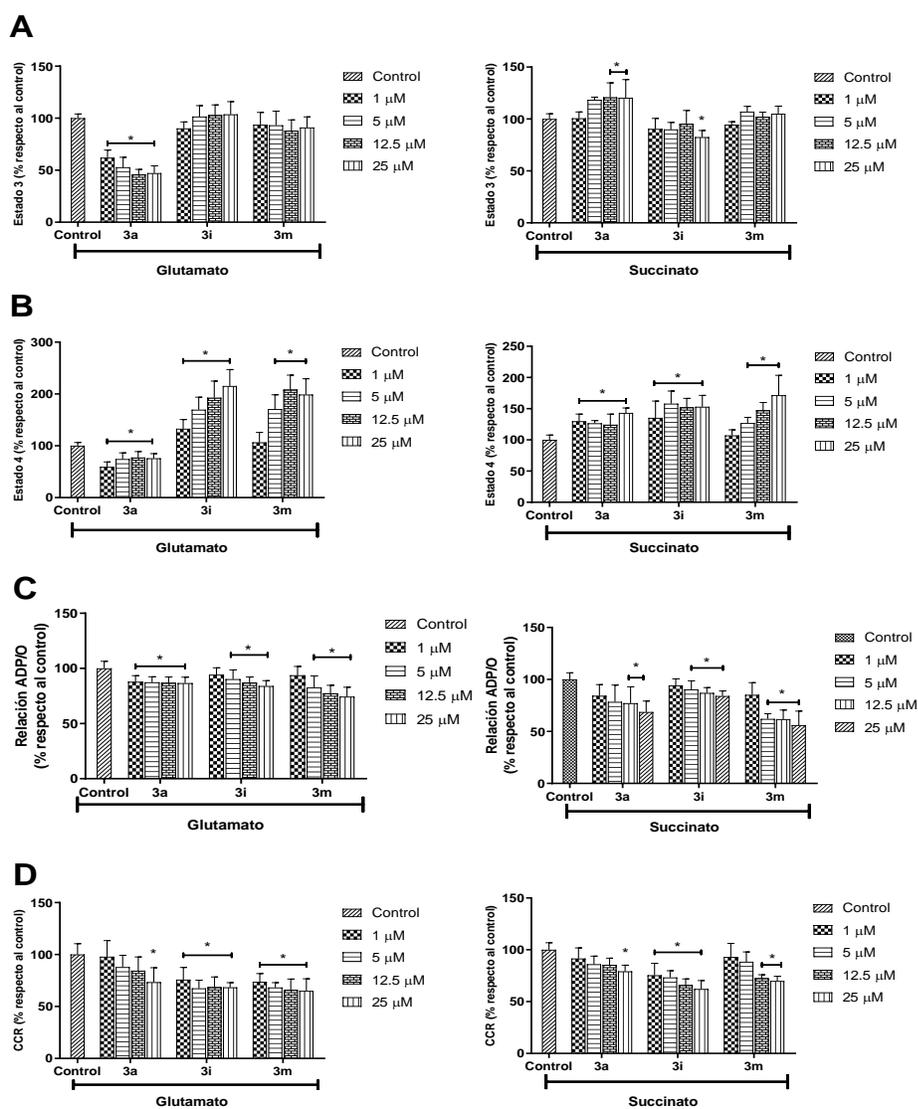
Por otra parte, cuando se analiza el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial vía complejo II, empleando succinato como sustrato oxidable el híbrido **3a** genera un ligero aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 (respiración en presencia de ADP), siendo este aumento significativo respecto al control a partir de la concentración de 12.5 μM (Figura 38A). En cuanto a velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (estado 4), el híbrido **3a** ocasiona un aumento de esta velocidad de forma significativa a partir de la concentración de 1 μM (Figura 38B), lo cual sugiere un posible desacople de la fosforilación oxidativa por acción de este compuesto. Esta velocidad de consumo de oxígeno, es entre un 30% a 43% mayor respecto al control, lo cual podría ser una respuesta de la mitocondria al tratar de aumentar el potencial de membrana disminuido por la inhibición en el transporte de electrones a través del complejo I.

Finalmente, al evaluar el efecto del híbrido **3a** en la relación ADP/O y el Coeficiente de control respiratorio (CCR), se evidencia una disminución de la relación ADP/O estadísticamente significativa a partir de la concentración de 1 μM cuando se emplea glutamato como sustrato oxidable, así como una disminución significativa a partir de la concentración de 12.5 μM con

succinato. De igual forma el híbrido **3a** disminuye el CCR en ambos casos con (glutamato y succinato) siendo estadísticamente significativo en la concentración de 25 μM .

Figura 38

Efecto de los híbridos 3a, 3i y 3m sobre la bioenergética mitocondrial.



Nota: Las condiciones experimentales se encuentran descritas en la sección 8.5.2. **(A)** Velocidad de consumo de oxígeno en estado 3: 100% actividad corresponde a 81.8 ± 5.7 nmol O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial con glutamato de sodio y 168.7 ± 5.5 nmol O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial con succinato de sodio. **(B)** Consumo de oxígeno en estado 4: 100% actividad corresponde a 17.1 ± 13.5 nmol O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial con glutamato de sodio y 16.7 ± 2.6 nmol O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial con succinato de sodio **(C)** P:O relación (ADP/O): 100% actividad corresponde a los valores de 3.2 ± 0.2 con glutamato de sodio y 1.9 ± 0.2 con succinato de sodio. **(D)** coeficiente de control respiratorio (RCC): 100% actividad corresponde a los valores de 3.3 ± 0.3 con glutamato de sodio y 3.9 ± 0.4 con succinato de sodio. Los resultados fueron expresados en la media \pm DE de tres resultados independientes. * denota un valor estadísticamente significativo al control para un valor de $p < 0.05$.

En cuanto a los híbridos **3i** y **3m**, no se presentó inhibición alguna o aumento de la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3, con glutamato como sustrato oxidable (Figura 38A). No obstante, ambos híbridos presentaron un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4 en presencia de glutamato, siendo para el híbrido **3i** estadísticamente significativo a partir de la concentración de 1 μ M, con un aumento desde $\sim 32\%$ hasta un $\sim 125\%$ para la mayor concentración evaluada (25 μ M) (Figura 38B). En lo que se refiere al híbrido **3m**, este presentó un aumento estadísticamente significativo respecto al control a partir de la concentración de 5 μ M ($\sim 50\%$) hasta llegar a un $\sim 108\%$ para la concentración de 25 μ M (Figura 38B). Adicionalmente, cuando se evaluó el transporte electrones vía complejo II, se observó una leve inhibición ($\sim 20\%$) en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 generada por el híbrido **3i** (Figura 38A) a 25 μ M, mientras que el híbrido **3m** no generó efecto alguno en este estado. En contraste, ambos híbridos generaron un aumento del consumo de oxígeno en estado 4 de manera dosis dependiente, siendo estadísticamente significativo para el híbrido **3i** a partir de la concentración de 1 μ M y de 5 μ M para el híbrido **3m** (figura 38B).

Consecuentemente, debido al aumento generado por ambos híbridos **3i** y **3m** en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4 (empleando ambos sustratos oxidables glutamato y

succinato), se espera una desarticulación del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial y la síntesis de ATP, lo que conlleva a la disminución observada en la relación ADP/O y el CCR (Figura 38C-D).

2.3.4.1. Efecto sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. Con el fin de determinar si las alteraciones observadas en el consumo de oxígeno están relacionadas con inhibiciones en algunas de las enzimas de la cadena respiratoria, se evaluó el efecto de los híbridos **3a**, **3i** y **3m** en la concentración 1 μ M, sobre ocho enzimas correspondientes a los cuatro complejos de la cadena respiratoria y la ATPasa (Tabla 4).

Empleando NADH como sustrato oxidable para evaluar el efecto de los híbridos sobre el complejo I, se observó que el híbrido **3a** genera una disminución en la actividad de la NADH oxidasa de cerca de ~44%. Además, se observó que el híbrido **3a** causa una disminución en la actividad de la NADH citocromo c reductasa (~20%) lo cual nos podría dar indicios que el bloqueo de los electrones se encuentra en algún punto entre la entrega de los electrones a la ubiquinona y del complejo III al citocromo c. Por otra parte, el híbrido **3a** genera una disminución en la actividad de la succinato citocromo c reductasa de cerca del ~24%.

Adicionalmente, los híbridos **3i** y **3m** no presentaron alguna inhibición o aumento de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial con excepción de la succinato oxidasa la cual presentó una inhibición de ~40% y ~43% para los híbridos **3i** y **3m**, respectivamente.

Tabla 4.

Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina 3a, 3i y 3m sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.

Enzima	Actividad % (Control)		
	3a	3i	3m
NADH oxidasa	66.05± 6.3*	92.27±9.2	101.76±11.7
NADH dehidrogenasa	102.21±12.0	111.02±11.9	104.2±10.1
NADH citocromo c reductasa	80.60±4.9*	89.14±12.6	89.89±10.8
Succinato oxidasa	73.43±14.6*	61.35±9.9*	57.89±10.6*
Succinato deshidrogenasa	109.38±15.8	118.25±7.8	94.88±22.1
Succ citocromo c reductasa	76.15±4.4*	107.64±5.9	98.60±7.3
Citocromo c oxidasa	96.68±13.6	94.51±14.8	93.21±11.1
ATPasa fragmentada	96.30±4.7	103.69±4.9	103.96±3.2
ATPasa íntegra	156.27±20.3*	181.15±16.9*	184.14±14.7*

Nota: Los valores del control (100%) corresponden a: **NADH oxidasa:** 72.91±14.7 nmol O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial; **NADH deshidrogenasa:** 1.72±0.62 μmol de ferricianuro de potasio reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial; **NADH citocromo c reductasa:** 0.17±0.01 μmol de citocromo c reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial; **Succinato oxidasa:** 10.46±1.61 nmol O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial; **Succinato deshidrogenasa:** 0.013±0.002 pmol de DCPIP reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial; **Succinato citocromo c reductasa:** 20.42±0.22 nmol de citocromo c reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial; **Citocromo c oxidasa:** 7.38±1.28 nmol de citocromo c oxidado min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial. **ATPasa (mitocondria fragmentada):** 7.29±0.24 μmol de fosfato hidrolizado min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial y **ATPasa (mitocondria íntegra):** 41.43±5.49 μmol de fosfato hidrolizado min⁻¹ mg⁻¹ proteína mitocondrial. Resultados presentados (media ± D.E de tres experimentos independientes, por triplicado) fueron expresados como % de actividad con relación al control (100%). * denota diferencias estadísticamente significativas respecto al control con un valor de p<0.05.

Finalmente, con el fin de evaluar si los compuestos **3a**, **3i**, y **3m** presentaban efecto alguno sobre la actividad ATPasa en la mitocondria, se desarrollaron ensayos empleando mitocondrias fragmentadas (con el propósito de determinar si existía un efecto directo sobre la enzima) y mitocondrias íntegras (con un CCR>3.5) para evaluar si los compuestos tenían efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial y afectan la actividad ATPasa como consecuencia. Los resultados en mitocondrias fragmentadas demostraron que ninguno de los tres híbridos evaluados presenta efecto inhibitor o estimulante sobre la actividad ATPasa. Sin embargo, los resultados obtenidos en mitocondrias íntegras muestran un aumento del ~56%, ~81% y ~84% para los híbridos **3a**, **3i** y **3m** respectivamente en la actividad ATPasa (Tabla 4). De esta forma, las inhibiciones observadas en la actividad de las enzimas NADH oxidasa y NADH citocromo c reductasa, estarían relacionadas con la inhibición en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial y la disminución en el consumo de oxígeno en presencia de glutamato. Asimismo, el aumento en la actividad de la actividad ATPasa indicaría el efecto desacoplador presentado por los híbridos moleculares.

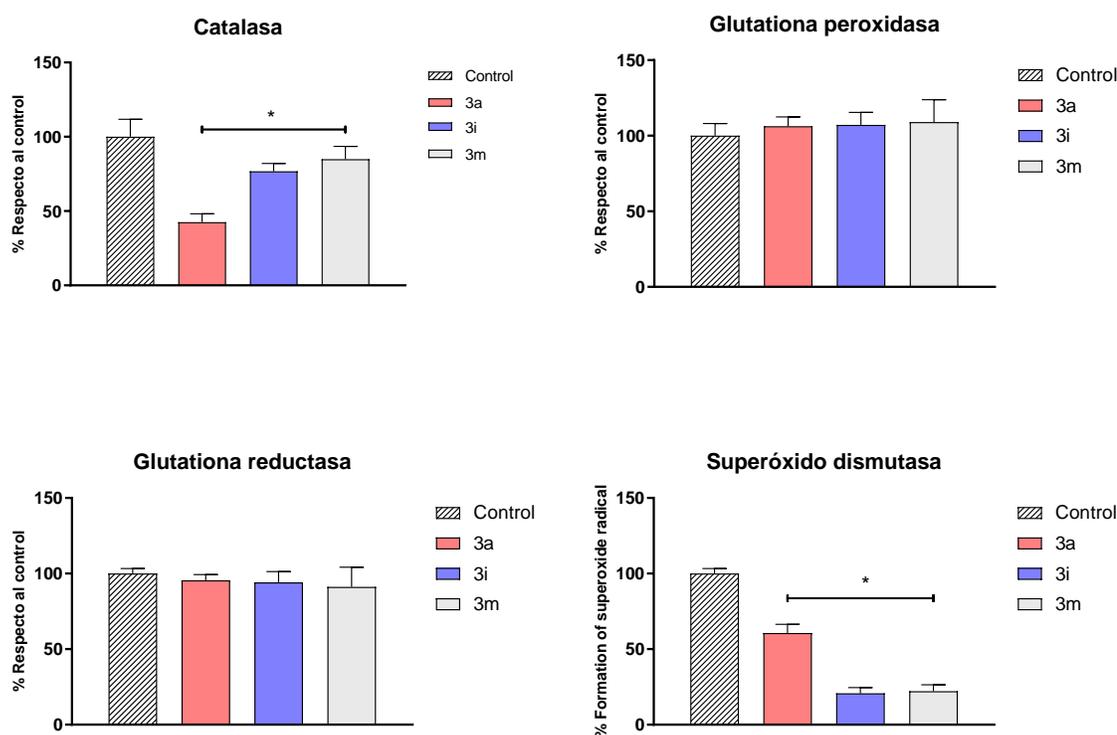
2.3.5. Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre el sistema redox

Con el objetivo de evaluar el efecto de los híbridos moleculares sobre la actividad de las principales enzimas encargadas de regular la defensa contra las especies reactivas de oxígeno, se evaluaron los híbridos **3a**, **3i** y **3m** sobre la catalasa, superóxido dismutasa, glutatona peroxidasa y glutatona reductasa. Para esto se emplearon mitocondrias aisladas de hígado de rata fragmentadas por ciclos de congelación y descongelación e igualmente la línea de melanoma murino B16F10.

Los resultados obtenidos muestran que los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** generan una inhibición en la actividad de la catalasa en mitocondrias aisladas de hígado de rata de cerca del ~58%, ~23% y ~15%, respectivamente (Figura 39), cuando fueron tratadas con 1 μM para cada híbrido. Al evaluar el efecto de los híbridos sobre la catalasa en la línea B16F10, después de ser tratados durante 24 horas a 10 μM se observó que, los híbridos **3a** y **3m** generaron una inhibición de la actividad de la enzima en ~52% y ~68%, respectivamente (Figura 40).

Figura 39

Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre las enzimas antioxidantes en mitocondrias aisladas.



Nota: Valores del control, 100% corresponde a **catalasa**: 39.7 ± 5.03 pmol de H_2O_2 reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial; **Glutaciona peroxidasa**: 11.9 ± 2.84 pmol de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína mitocondrial; **Glutaciona reductasa**: 18.6 ± 0.62 pmol de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial; **Superoxido Dismutasa**: donde 100% corresponde a 5.06 ± 0.24

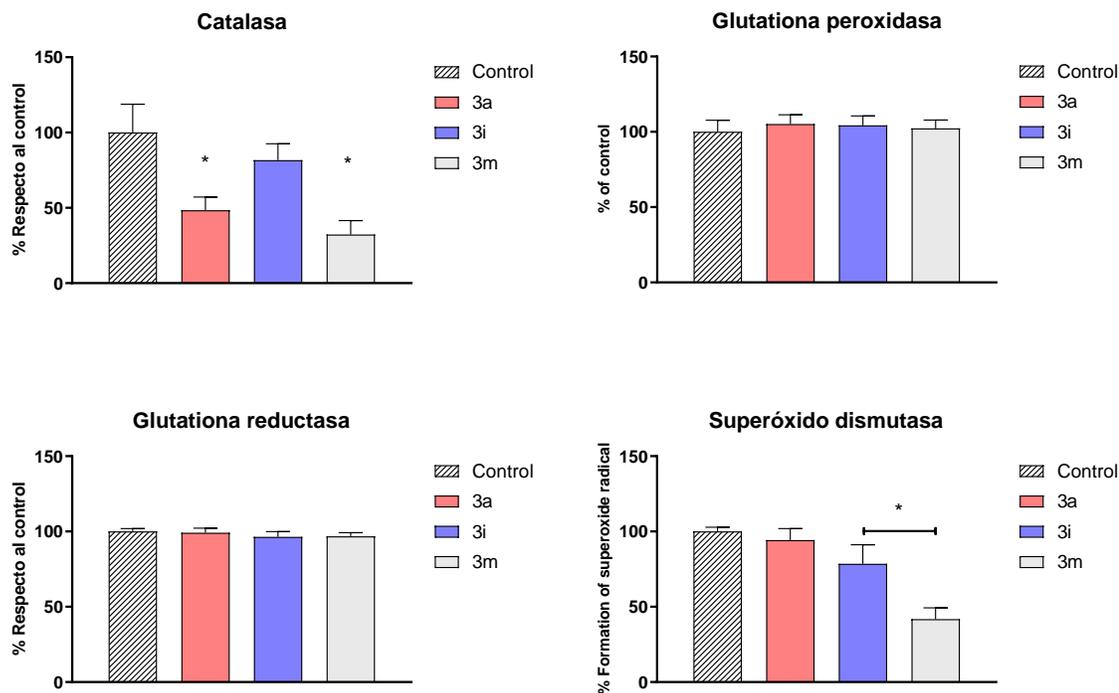
nmol de NBT reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. Los valores fueron representados por la media \pm DE de tres experimentos independientes. * denota valores estadísticamente significativos respecto al control con un valor de $p < 0.05$.

De forma contraria a los resultados obtenidos sobre la catalasa en mitocondrias aisladas, el híbrido **3i** no presentó efectos estadísticamente significativos cuando se evaluó sobre la línea celular B16F10. Por otra parte, no se presentaron efectos significativos en las actividades de las enzimas glutatona peroxidasa y glutatona reductasa para los modelos evaluados en mitocondrias aisladas y en la línea B16F10.

En lo que respecta a la superóxido dismutasa (SOD), se observó que los híbridos moleculares generaron una disminución en la cantidad de ion superóxido generado. En este caso, esa disminución está relacionada con un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa que cataliza la reducción del radical superóxido a peróxido de hidrógeno (Zelko et al., 2002). La disminución en la generación de radical superóxido después de tratar las mitocondrias con $1 \mu\text{M}$ de cada híbrido fue de $\sim 40\%$, $\sim 80\%$ y $\sim 78\%$ para los híbridos **3a**, **3i**, y **3m**, respectivamente (Figura 39). De manera interesante, luego de tratar por 24 horas las células B16F10 con $10 \mu\text{M}$ de cada híbrido y analizar su efecto sobre la enzima superóxido dismutasa se observó que los híbridos **3i** y **3m** también disminuyen la generación de radical superóxido en un $\sim 22\%$ y $\sim 60\%$, respectivamente (Figura 40).

Figura 40

Efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre las enzimas antioxidantes en la línea B16F10.



Nota: Valores del control corresponde a 100% donde; **catalasa:** 10.55 ± 1.98 pmol de H_2O_2 reducido $min^{-1} mg^{-1}$ de proteína; **Glutaciona peroxidasa:** 0.34 ± 0.30 nmol de NADPH oxidado $min^{-1} mg^{-1}$ de proteína; **Glutaciona reductasa:** 6.00 ± 0.20 pmol de NADPH oxidado $min^{-1} mg^{-1}$ de proteína; **Superóxido Dismutasa:** donde 100% corresponde a 0.2 ± 0.07 nmol de NBT reducido $min^{-1} mg^{-1}$ de proteína. Los valores fueron presentados por la media \pm DE de tres experimentos independientes. * denota valores estadísticamente significativos respecto al control para valores de $p < 0.05$.

2.4. Discusión

Las mitocondrias son orgánulos que se encargan no solamente de la producción de ATP en la célula, también se encargan de la homeostasis redox, señalización metabólica e incluso la inducción de procesos de muerte celular (Dong & Neuzil, 2019). Adicionalmente, la mitocondria puede contribuir en la transformación maligna mediante al menos tres mecanismos (Paolo Ettore Porporato et al., 2018). El término transformación maligna, generalmente se refiere a la conversión de una célula normal en un precursor neoplásico que adquiere potencial proliferativo sin restricciones (F. Weinberg et al., 2010). La mitocondria puede contribuir con la transformación maligna a través de la formación de especies reactivas de oxígeno, favoreciendo la acumulación de defectos en el ADN y activación de las vías de señalización oncogénicas (Sabharwal & Schumacker, 2014); la acumulación anormal de metabolitos mitocondriales como el fumarato, succinato y 2-hidroxiglutarato que han demostrado influir en la transformación maligna (al menos en algunos modelos en ratas) (Gaude & Frezza, 2014); finalmente, alteraciones en el potencial de membrana debido a la pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, o a la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial estarían involucrados en la inducción de la neoplasia (Paolo Ettore Porporato et al., 2018). Así, la modulación de estos factores podrían inducir a la célula a procesos de muerte celular programada, convirtiendo a la mitocondria en una diana farmacológica potencial en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer (Dong & Neuzil, 2019).

De igual forma, perturbaciones en la actividad de las enzimas de la vía glucolítica, y la modulación de su actividad por acción de los fármacos, pueden alterar la producción de

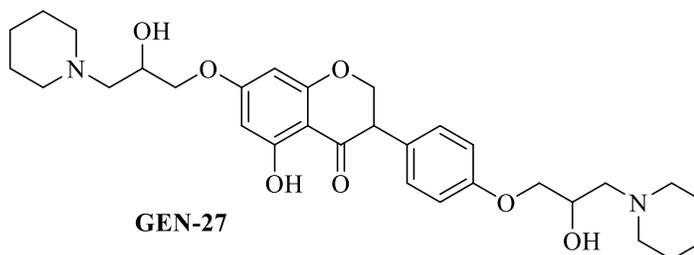
metabolitos necesarios para la generación de nucleótidos, debido a la disminución en el flujo de sustratos hacia la vía de las pentosas fosfato (K. C. Patra et al., 2013; K. Patra & Hay, 2014)

Por lo anterior, en este capítulo de tesis se evaluó el efecto de los híbridos de tetrahidroquinolina/isoxazolina **3a**, **3i**, y **3m**, teniendo como diana farmacológica la bioenergética mitocondrial, así como la actividad de las enzimas que regulan la vía glucolítica, y enzimas encargadas de la homeostasis redox. Encontramos que los híbridos moleculares inhiben la actividad de las enzimas encargadas de la regulación de la vía glucolítica en células B16F10 a 10 μM durante 24 horas. La hexoquinasa fue inhibida cerca del $\sim 30\%$, $\sim 20\%$, y $\sim 45\%$ para los híbridos **3a**, **3i**, y **3m**, respectivamente (Figura 35). De igual forma, la enzima piruvato quinasa fue inhibida cerca del $\sim 50\%$, $\sim 26\%$, y $\sim 40\%$ en presencia de los híbridos **3a**, **3i**, y **3m**, respectivamente (Figura 35).

La inhibición generada por los híbridos moleculares en la hexoquinasa representa una buena alternativa como tratamiento al cáncer, ya que la formación de glucosa-6-fosfato además de ser el primer subproducto de la vía glucolítica, también el punto de inicio para la vía de las pentosas fosfato donde se producirá el NADPH necesario para varias reacciones importantes, entre ellas la reducción del glutatión y la síntesis de ácidos grasos (Akins, Nielson, & Le, 2018; Payen et al., 2016). Además, la ruta de las pentosas fosfato produce las pentosas necesarias para las síntesis de nucleótidos necesarios para diversos procesos celulares entre ellos la proliferación (Akins et al., 2018; K. Patra & Hay, 2014). De igual forma, el compuesto GEN-27 ha demostrado buen efecto como fármaco anticancerígeno inhibiendo la hexoquinasa (Figura 41), cuyos resultados obtenidos en fase clínica I/II demuestran efecto antiproliferativo líneas de carcinoma de colon con IC_{50} menores que 31 μM , aumentando la generación de las especies reactivas de oxígeno e induciendo muerte celular apoptótica por vía mitocondrial (Akins et al., 2018).

Figura 41

Estructura química del compuesto antitumoral GEN-27 inhibidor de hexoquinasa



Ahora bien, la inhibición de la actividad de la enzima piruvato quinasa quien cataliza el último paso de la vía glucolítica en la conversión del fosfoenolpiruvato a piruvato por acción de los híbridos moleculares, también representa una buena alternativa en su actividad anticancerígena (Akins et al., 2018). Se ha reportado que en diversos tipos de cáncer la piruvato quinasa se encuentra sobre expresada y la inhibición de ésta ha permitido desarrollar mayor sensibilidad a fármacos como oxaliplatino en cáncer de colón (Lakhter et al., 2018; Raymond, Chaney, Taamma, & Cvitkovic, 2014). Además, diversos tratamientos empleados en melanoma concluyen que la inhibición de la piruvato quinasa genera una disminución en la cantidad de ATP, así como una menor cantidad de piruvato que eventualmente entraría a la mitocondria para realizar la fosforilación oxidativa, recordando que varias líneas de melanoma presentan una sobreexpresión de la maquinaria proteica que se encarga de oxidar sustratos como el piruvato en la mitocondria, desencadenando así procesos de muerte celular (Filipp et al., 2012; Lakhter et al., 2018).

En lo que respecta al efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre la respiración celular, se observó que el híbrido **3a** disminuye el consumo de oxígeno en el estado basal cerca del ~26% después de 24 horas a 10 μ M (Figura 36A). Esta disminución en el consumo

de oxígeno en el estado basal podría estar relacionada con algún bloqueo en el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial. Si tomamos en consideración los resultados obtenidos en las mitocondrias aisladas de hígado de rata (Figura 38A, Tabla 4), e intentamos relacionar los resultados con los resultados obtenidos en la respiración celular, podemos observar que al igual que las mitocondrias aisladas, el híbrido **3a** genera una disminución en el consumo de oxígeno en la respiración basal de la línea celular B16F10. No obstante, en los ensayos con mitocondrias se pudo establecer que ese bloqueo en el transporte de electrones estaría en algún sitio entre la entrega de electrones del complejo I a la ubiquinona y de ésta al complejo III y citocromo c. Sin embargo, en los ensayos realizados en este trabajo con la línea celular no es posible establecer con exactitud en que parte de la cadena respiratoria se encuentra el bloqueo de electrones, ya que para esto necesitaríamos realizar ensayos de respiración celular en células permeadas con digitonina (Kuznetsov et al., 2008).

Adicionalmente, el estado leak también se vio afectado el híbrido **3i**, donde después de 24 horas de exposición a 10 μ M, se observó un aumento en la velocidad del consumo de oxígeno de cerca del ~100%, respecto al control (Figura 36). Este aumento del consumo de oxígeno en el estado leak podría estar relacionado con un efecto desacoplador por parte del híbrido **3i**, efecto que podría estar relacionado de igual forma con el efecto desacoplador obtenido en los ensayos con mitocondrias aisladas, ya que allí generó un aumento del consumo de oxígeno en estado 4 (Figura 38B) así como un aumento de la actividad ATPasa en mitocondrias integras (Tabla 4).

Finalmente, en el estado desacoplado la velocidad de consumo de oxígeno disminuyó ~72% y ~80% para los híbridos **3m** y **3a**, respectivamente. Esta disminución del consumo de oxígeno en el estado desacoplado responde a la imposibilidad de transportar los electrones a través

de la cadena respiratoria mitocondrial debido a algún bloqueo en alguna de las enzimas de los complejos de la cadena transportadora de electrones.

En conjunto, se observó que los híbridos **3a** y **3m** generan una disminución del consumo de oxígeno para el estado basal y el estado desacoplado. Terapéuticamente hablando, ésta disminución del consumo de oxígeno podría ser una buena alternativa al tratamiento del melanoma ya que se ha demostrado que algunas líneas de melanoma presentan un aumento en la expresión de PGC1 α quien a su vez estimula a mTORC, generando como resultado una célula con mayor dependencia de la fosforilación oxidativa que de la vía glucolítica para obtener la energía necesaria para los procesos de proliferación celular (Figura 31) (Fischer et al., 2018; Gopal et al., 2014; Haq et al., 2013; Valerie S. LeBleu et al., 2014).

La inhibición de la fosforilación oxidativa generada por los híbridos **3a** y **3m** en la línea B16F10 podría proponerlos como coadyuvantes de la terapia contra el cáncer. Compuestos que inhiben la cadena respiratoria mitocondrial disminuyen la proliferación en células cancerígenas y aumentan la sensibilidad a los tratamientos tradicionalmente, ejemplos de estos tipos de fármacos son las biguanidinas fenformina y metformina, inicialmente empleados en el tratamiento de la diabetes, y donde actualmente la metformina se encuentra en estudios como anticancerígeno debido a su habilidad de inhibir proliferación celular y mejorar la sensibilidad a la radioterapia basado en su efecto como inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial como principal mecanismo de acción (Pernicova & Korbonits, 2014; Scotland et al., 2013; S. E. Weinberg & Chandel, 2015; Wheaton et al., 2014). Además, inhibir la fosforilación oxidativa puede ayudar a aliviar la hipoxia tumoral presentada en algunos tipos de cáncer, donde la poca vascularidad presentada al interior del tumor dificulta el acceso a los fármacos actualmente empleados (Ashton et al., 2016). De esta forma, los inhibidores de la fosforilación oxidativa alivian

la hipoxia tumoral disminuyendo el consumo de oxígeno en las células vecinas al tumor, generando una mayor disponibilidad del oxígeno el cual podría difundirse a través del tumor y llegar así a zonas de hipoxia (Ashton et al., 2016; Dhani et al., 2015; Diepart et al., 2012; W. Wang et al., 2016).

Finalmente, el híbrido **3i** como desacoplador de la fosforilación oxidativa también podría postularse como fármaco para el tratamiento del cáncer ya que el desacople estaría relacionado con una disminución de las especies reactivas de oxígeno. La terapia antioxidante se basa en dos mecanismos, el primero basado en el aumento de las especies reactivas de oxígeno generando estrés oxidativo, lipoperoxidación y finalmente la inducción de procesos de muerte celular, y el segundo basado en la disminución de las especies reactivas de oxígeno necesarias para la estimulación de diversos factores de transcripción lo cual generaría una disminución de la proliferación celular (Cannavò et al., 2019; Cotter et al., 2007; Kang et al., 2003; Moloney & Cotter, 2018).

Adicionalmente, la inhibición del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial podría estar relacionado con la disminución en el potencial de membrana observada después de 24 horas de tratamientos con los híbridos **3a**, **3i**, y **3m**. De esta forma, la disminución del potencial de membrana podría comprometer la proliferación de las células B16F10 debido al rol importante que juega el potencial de membrana en la bioenergética mitocondrial, así como en los demás procesos celulares (Jordán, Ceña, & Prehn, 2003). Asimismo, la alteración al potencial de membrana generada por los híbridos podría disminuir la síntesis del ATP en el interior de la

mitocondria, en parte debido a que el potencial de membrana es requerido para su síntesis y que las líneas de melanoma tienen en su preferencia el uso de la fosforilación oxidativa a la vía glucolítica, especialmente aquellas líneas celulares que tienen sobre expresada la proteína PGC1 α (Figura 31) (McQuade & Vashisht Gopal, 2015). Por otra parte, la disminución del potencial de membrana puede deberse al posible efecto desacoplador en el caso del híbrido **3i** (Figura 36B), y a la inhibición del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial en el caso de los híbridos **3a** y **3m** (Figura 39-40) (Griffiths, 2000; Webster, 2013; Wu, Smith, Bellomo, & Monte, 1990; Zorova et al., 2017).

En lo que respecta al efecto de los híbridos sobre la mitocondria, observamos una disminución en el consumo de oxígeno en estado 3 generada por el híbrido **3a** en mitocondrias energizadas con glutamato (Figura 38A). Lo anterior sugiere una inhibición del transporte de electrones en algún punto desde el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Madungwe et al., 2016). Adicionalmente, los híbridos **3a**, **3i** y **3m** generan un desacople entre el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial y la síntesis de ATP, esto se evidencia debido al aumento de la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4 observado para todos los compuestos al energizar la mitocondria con glutamato o succinato como sustrato oxidable (Figura 38 A-B). No obstante, el híbrido **3a** además de presentar un efecto desacoplador genera una inhibición en el transporte de electrones vía complejo I. Adicionalmente, se evidenciaron alteraciones en la tasa de síntesis de ATP debido a la disminución de la relación ADP/O relacionados con la posible disminución del potencial de membrana generado por el desacople de la fosforilación oxidativa, así como una disminución en el CCR (parámetro que relaciona la integridad de la mitocondria). Por otra parte, reportes señalan que el desacople mitocondrial está

implicado en la extensión de la vida útil de la mitocondria debido a los efectos que genera en la tasa metabólica y en la disminución e especies reactivas de oxígeno (Y. Liu, Fiskum, & Schubert, 2002; Mookerjee, Divakaruni, Jastroch, & Brand, 2010; Smith, Hartley, Cochemé, & Murphy, 2012; W. Wang et al., 2016).

Para corroborar la inhibición en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, se evaluó el efecto de los híbridos moleculares sobre la actividad de las enzimas de la cadena transportadora de electrones. Encontramos que la disminución en la velocidad del consumo de oxígeno en estado 3 por el híbrido **3a**, puede estar relacionado con la disminución de la actividad de la enzima NADH oxidasa (Tabla 4), indicando un bloqueo en algún punto de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que ocasionaría la disminución en el consumo de oxígeno en estado 3 cuando se energiza la mitocondria con glutamato (Figura 38A). Adicional a la disminución de la actividad de la enzima NADH oxidasa, el híbrido **3a** genera una disminución en la actividad de las enzimas NADH citocromo c reductasa y succinato citocromo c reductasa de cerca del ~20% (Tabla 4). La inhibición de estas enzimas nos permite inferir una disminución en la actividad del complejo III (R. W. Taylor, Birch-machin, Bartlett, & Turnbull, 1993).

Finalmente, encontramos que los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** generan un aumento de la actividad ATPasa de ~56%, ~81%, y ~84%, respectivamente (Tabla 4). Lo anterior, nos sugiere que los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina disminuyen el potencial de membrana mitocondrial, induciendo un desacople (Figura 38B) y generando que la mitocondria, en su intento de restablecer dicho potencial, hidrolice ATP, mientras se bombea un protón desde espacio intermembrana (Milakovic & Johnson, 2005). Además, de forma interesante se encontró que el desacople es mayor a medida que el sustituyente en el carbono 6 del anillo tetrahydroquinolínico es más electronegativo, partiendo de un aumento de la actividad ATPasa del ~56% cuando se presenta un

hidrógeno en dicho carbono para el híbrido **3a**, hasta un aumento de la actividad ATPasa del ~84% en presencia del híbrido **3m**, quien presenta un cloro como sustituyente.

Los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina no solo inhiben el transporte de electrones, además, afectan el sistema redox en la línea B16F10, donde los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** generan una disminución en la capacidad de reducción de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, debido a su actividad inhibitoria frente a la catalasa (Figura 40). Esta inhibición en la enzima catalasa estaría relacionada con un aumento en la concentración de peróxido en la célula, lo que podría generar lipoperoxidación y posteriormente inducción de procesos de muerte celular (Cannavò et al., 2019). No obstante, esta especie también puede ser reducida a agua por acción de la glutatona peroxidasa, enzima en la cual no se presentó efecto alguno por nuestros híbridos (Z. Yi et al., 2019). Por otra parte, los híbridos moleculares generan efecto en otra enzima antioxidante, la superóxido dismutasa que cataliza la reducción del ion superóxido a peróxido. En esta enzima los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** generan una disminución en la cantidad de ion superóxido formado lo cual generaría una mayor cantidad de peróxido que no puede ser reducido a agua ya que la catalasa se encuentra inhibida por acción de los mismos compuestos.

Sin embargo, al analizar el efecto generado por el híbrido **3a** observamos que éste no presentó efecto estadísticamente significativo alguno en la superóxido dismutasa cuando se evaluó en la línea B16F10 (Figura 40). Mientras que, en mitocondrias aisladas el mismo híbrido **3a** si generó una disminución en la producción del radical superóxido (Figura 39). Esta diferencia en los resultados obtenidos en la superóxido dismutasa en mitocondrias aisladas y en la línea celular B16F10 permitirían proponer una posible selectividad hacia la isoforma de la superóxido dismutasa presente en la mitocondria frente a la isoforma de la misma enzima presente en el citosol

de la célula, lo anterior debido a que al momento de evaluar la superóxido dismutasa en B16F10 se evaluaron las dos isoformas Mn-SOD y Cu-SOD. Por lo tanto, para determinar si realmente el híbrido **3a** estaría generando efecto de forma selectiva sobre la isoforma de la superóxido dismutasa Mn-SOD presente en la mitocondria, se debería realizar un nuevo ensayo adicionando 6mM de KCN para inactivar las demás isoformas de la enzima (Gozzi et al., 2013; Zelko et al., 2002). Lo anterior, debido a que se ha reportado que las isoformas Cu-SOD y Zn-SOD son susceptibles a inhibición por KCN gracias a la formación de complejos de cobre-cianuro, mientras, la actividad de la isoforma Mn-SOD no se ve afectada por la adición de KCN pero si por agentes como el cloroformo (Rotilio, Bray, & Fielden, 1972; Weiseger & Fridovich, 1973).

El desbalance del sistema redox generado por acción de los híbridos moleculares presenta una alternativa en el tratamiento del melanoma, debido a que los híbridos **3a** y **3m** generan una inhibición de la fosforilación oxidativa lo que conllevaría a la generación de especies reactivas de oxígeno que eventualmente no pueden ser reducidas a especies menos nocivas para la célula, debido al aumento en la actividad de la superóxido dismutasa y la inhibición de la catalasa. La inhibición de la catalasa generaría un aumento de la concentración de peróxido de hidrógeno quien puede llegar a inducir procesos de muerte celular en algunas líneas de melanoma mediante la estimulación de receptores de muerte celular como TRAIL (Tochigi et al., 2013). Además, los híbridos **3a** y **3m** se propondría como alternativa al tratamiento en el melanoma debido a que diversos estudios han encontrado que en líneas de melanoma, durante el desarrollo y fase temprana, la actividad de la catalasa y la Mn-SOD se encuentran inhibidas permitiendo la generación de un ambiente prooxidante que llevaría a la estimulación de factores de crecimiento y así la progresión de la enfermedad (Borrello et al., 1993; Kiritoshi et al., 2003). No obstante, en fases avanzadas del melanoma se reporta una sobre expresión de la catalasa y la Mn-SOD, las cuales estarían

implicadas en procesos de reducción del estrés oxidativo debido a la elevada tasa de proliferación (Cannavò et al., 2019; Moloney & Cotter, 2018). Por ende, la inhibición de estas dos enzimas sería una alternativa al tratamiento del melanoma, ya que con los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina se favorecería el aumento del estrés oxidativo en la célula cancerígena (Borrello et al., 1993; Cannavò et al., 2019; Mirończuk-Chodakowska et al., 2018; Moloney & Cotter, 2018; Vurusaner et al., 2012; F. Weinberg et al., 2010; Wozniak et al., 2004).

2.5. Conclusiones del capítulo

Los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina generan alteraciones en la bioenergética mitocondrial tales como el aumento del consumo de oxígeno en estado 4, desacoplando así la fosforilación oxidativa con la síntesis de ATP.

El efecto desacoplador de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en las mitocondrias aisladas de hígado de rata es mayor a medida que se aumenta la electronegatividad del sustituyente en el carbono 6 del anillo tetrahydroquinolínico.

Los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina generan un aumento de la actividad ATPasa en mitocondrias íntegras, producto del efecto desacoplador de la fosforilación oxidativa

El híbrido **3a** disminuye la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 inhibiendo el transporte de electrones entre el complejo I y el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial.

Los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina alteran la respiración celular en la línea B16F10 mediante la inhibición de la velocidad del consumo de oxígeno del estado basal (híbrido **3a**) y estado desacoplado (híbridos **3a** y **3m**).

Los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina desacoplan la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP en células B16F10, mediante el aumento de la velocidad de consumo de oxígeno en estado leak.

Los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina generan un desbalance en el sistema redox al inhibir la catalasa en mitocondrias, así como en la línea B16F10. Por otra parte, los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina generan una disminución en la concentración de superóxido mediante el aumento de la actividad de la superóxido dismutasa. De forma interesante el híbrido **3a** generó este efecto en la superóxido dismutasa de las mitocondrias aisladas de hígado de rata y no en la línea B16F10, lo cual permite concluir que este híbrido posiblemente tiene un efecto selectivo por la Mn-SOD presente solamente en la mitocondria.

Los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina alteran la vía glucolítica mediante la inhibición de las enzimas hexoquinasa y piruvato quinasa.

3. Híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina como nuevos agentes frente a la resistencia a medicamentos.

Introducción

La resistencia a fármacos es un desafío importante en el tratamiento de enfermedades infecciosas, así como en el cáncer. La organización mundial de la salud ha informado que, para el caso de enfermedades infecciosas, las bacterias resistentes han llegado a generar cerca del 60% de las infecciones adquiridas en hospitales a nivel mundial (Litman, Druley, Stein, & Bates, 2001). En cuanto al cáncer, la resistencia a fármacos es la principal razón del fracaso de agentes quimioterapéuticos, donde las células tumorales inicialmente sensibles a una amplia gama de medicamentos pueden volverse resistentes a la acción de estos agentes, llegando a disminuir las alternativas médicas para mejorar el estado de salud del paciente (Chang, 2003).

Una de las principales causas de resistencia a la quimioterapia se atribuye a una variedad de transportadores que expulsan los compuestos farmacológicos fuera de la célula (Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J., & Sarkadi B., 2004). La generación de la resistencia a los fármacos por este tipo de transportadores despertó el interés de evaluar el efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre transportadores de la familia ABC. De esta forma, como resultado de las pasantías de investigación realizadas en el laboratory of cancer drug resistance de la Universidade Federal do Paraná y en el molecular modeling de la University of Eastern Finland, se encontró que, los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina inhiben los transportadores P-gp, MRP1, y ABCG2. Donde, el híbrido **3a** genera una inhibición de más del 50% de la actividad de los tres transportadores de la familia ABC a la menor concentración evaluada (10 μ M), después de 30 minutos de exposición a los híbridos.

Adicionalmente, se evaluó la posición de los ligandos dentro del sitio de unión en el transportador ABCG2 a través de docking molecular, así como la estabilidad de los complejos proteína-ligando y sus interacciones a lo largo del tiempo a través de simulaciones de dinámica molecular. Encontramos que los híbridos de tetrahydroquinolina isoxazolina pueden ocupar dos sitios de unión definidos en el transportador ABCG2, dentro de estos sitios de unión generan interacciones de tipo puente de hidrógeno con residuos como Asn436 e interacciones hidrofóbicas con residuos como Phe439 implicados en el transporte substratos a través del transportador.

De esta forma los resultados obtenidos sugieren que los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina pueden presentar una alternativa en la resistencia a la quimioterapia, gracias a la inhibición de la actividad de los transportadores ABCG2, P-gp, y MRP1.

3.1. Marco de referencia y antecedentes

3.1.1. Transportadores multidrogas y su rol en la resistencia a fármacos

La resistencia a multi-fármacos (MDR, de sus siglas en inglés), se puede definir como la capacidad que tienen las células u organismos para resistir los efectos citotóxico de una amplia gama de compuestos químicos (Robert W. Robey et al., 2018). La MDR se observa en todo el espectro de la terapia de las enfermedades infecciosas, incluyendo la quimioterapia contra el cáncer, donde la adquisición de resistencia al tratamiento es un indicador de una mala prognosis en el paciente (Chang, 2003). La resistencia a los fármacos puede manifestarse a través de varios mecanismos, a menudo operando con cierto grado de sinergia, donde se incluye la modificación de la estructura química del fármaco haciéndola inactiva (o menos eficaz), así como la alteración

génica en las células para permitir la proliferación celular y el avance del metabolismo a través de otras vías metabólicas (Kakde et al., 2011).

Una de las principales causas de la resistencia a los medicamentos bacterianos y en el tratamiento al cáncer, se atribuye en gran medida a transportadores que expulsan los medicamentos al exterior de la célula (Gottesman, Fojo, & Bates, 2002). Estos transportadores que confieren resistencia a los tratamientos en la quimioterapia se pueden dividir en dos clases en función de su fuente de energía: transportadores secundarios, que utilizan el gradiente de protones para la expulsión de los fármacos en la célula, y los transportadores de unión de adenosina trifosfato (ATP), o también conocidos como transportadores ABC (Putman, Van veen, & Konings, 2000). Estos últimos, los transportadores ABC, pertenecen a una familia de proteínas que importan o exportan una amplia gama de sustratos que incluye aminoácidos, iones, lípidos y medicamentos (Glavinas H. et al., 2004). Por lo anterior, una mayor expresión de los transportadores ABC, se reporta como una de las principales causas de disminución en la eficacia del tratamiento contra el cáncer (Chearwae, Shukla, Limtrakul, & Ambudkar, 2006; Fletcher et al., 2016; Gillet & Gottesman, 2011).

Se han descrito alrededor de 48 proteínas ABC capaces de generar resistencia a los medicamentos en humanos. No obstante, 3 de estos, el transportador ABCB1 (glicoproteína P), el transportador ABCC1 (proteína de resistencia a múltiples fármacos 1), y el transportador ABCG2 (proteína de resistencia al cáncer de seno) han sido objeto de investigación durante las últimas décadas debido a su participación en la resistencia a los fármacos, especialmente en el tratamiento del cáncer (Gillet & Gottesman, 2011; Horsey, Cox, Sarwat, & Kerr, 2016). Como resultado de estas investigaciones se han reportado artículos sobre la estructura y función de los transportadores ABCB1, ABCC1, y ABCG2 (He, Li, R. Kanwar, & Zhou, 2012; Ravna, Sylte, & Sager, 2009;

Robert W. Robey et al., 2018), donde Taylor y colaboradores., 2017 obtuvieron la primera estructura cristalina y el mecanismo por el cual el transportador ABCG2 expulsaba los fármacos, siendo éste el transportador cuya estructura y mecanismo es el más reciente (N. M. I. Taylor et al., 2017).

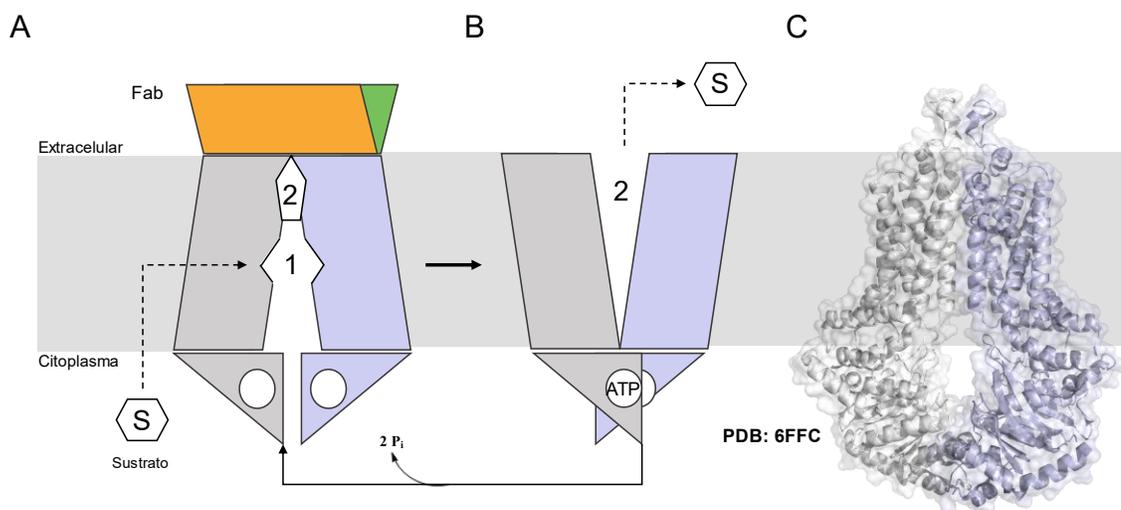
3.1.2. Transportador ABCG2: estructura, mecanismo e inhibidores

El transportador ABCG2, también conocido como la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP), es un transportador de la familia ABC normalmente expresado en algunos tejidos como hígado, riñón y glándulas mamarias (Mo & Zhang, 2012). La disfunción del transportador ABCG2 está vinculada con la hiperuricemia generando gota, enfermedades renales e hipertensión como consecuencia del deterioro en el transporte del ácido úrico (Glavinas H. et al., 2004). El transportador ABCG2 al igual que sus homólogos funcionales, los transportadores ABCB1y ABCC1, juega un papel importante en la protección de agentes xenobióticos afectando la farmacocinética de muchos fármacos de uso común, y su expresión está relacionada con un mal pronóstico en el tratamiento del cáncer (Robey et al., 2007).

Al igual que otros transportadores de la familia ABC, el transportador ABCG2 es un dímero con un dominio transmembrana (TMD, de sus siglas en inglés) y un dominio de unión a nucleótidos (NBD, de sus siglas en inglés) (Figura 42C), donde las hélices transmembrana y los loops intracelulares en el transportador ABCG2 son generalmente más cortos que en los demás miembros de la familia ABC, resultando en una distancia menor entre el NBD y la membrana celular asemejándose a los transportadores ABC bacterianos más compactos (N. M. I. Taylor et al., 2017).

Figura 42

Representación esquemática del mecanismo de liberación de sustratos y estructura cristalina del transportador ABCG2



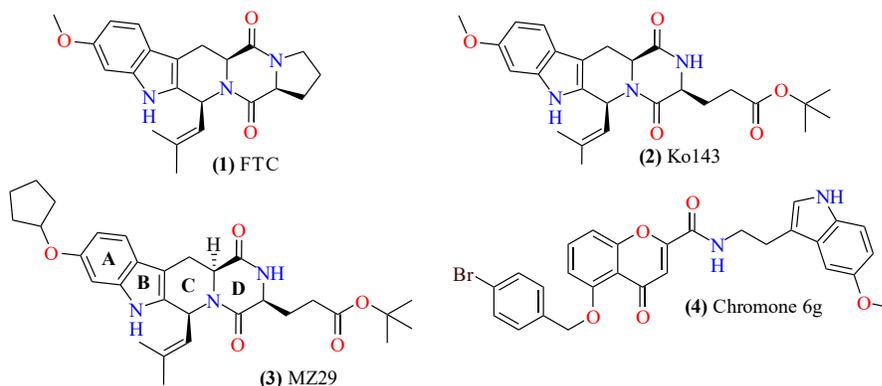
Nota: estado inactivo del transportador ABCG2 con la presencia de las cavidades 1 y 2 (A), cambio en la conformación del transportador permitiendo el paso del sustrato de la cavidad 1 a la 2, seguido de su liberación al espacio extracelular e hidrólisis de ATP (B), estructura cristalina del transportador ABCG2 (C), tomado y adaptado de (N. M. I. Taylor et al., 2017)

El transportador ABCG2 puede unir o transportar fármacos con estructuras químicas diversas como la hematoporfirina, la mitoxantrona y el metotrexato, hasta inhibidores como el inhibidor de tirosina quinasas genfitinib o derivados de la fumitremorgina c (Figura 43) (Allen et al., 2002). La estructura cristalina del transportador ABCG2 revelada por Taylor y colaboradores., 2017, revela una conformación abierta hacia adentro con una cavidad profunda que se abre hacia el citoplasma (cavidad 1) (Figura 42A). Adicionalmente, se encuentra una cavidad 2 separada por dos residuos Leu554 y Leu555, los cuales permiten el paso de sustratos desde la cavidad 1 hacia la cavidad 2 (Khunweeraphong, Szöllösi, Stockner, & Kuchler, 2019). La cavidad 2 es inaccesible en la conformación en la que se encuentra el transportador ABCG2 y es probable que tenga una

menor afinidad hacia los sustratos debido a su poca superficie hidrofóbica, lo que favorece la liberación del sustrato una vez ha ingresado a esa cavidad. Por lo anterior, y debido a la naturaleza, tamaño, y fácil acceso desde la membrana plasmática o desde el citoplasma a la cavidad 1, lo postulan como un sitio adecuado de unión a sustratos planos, policíclicos e hidrofóbicos (N. M. I. Taylor et al., 2017).

En cuanto al mecanismo de transporte empleado por transportador ABCG2, este es impulsado por la hidrólisis de ATP, donde el sustrato entra a la cavidad 1 desde el citoplasma o desde la parte interna de membrana plasmática (Figura 42A). Después, el cierre de los dominios de unión a nucleótidos es acompañado de la hidrólisis de ATP y la liberación de Pi, cambiando la orientación del transportador y permitiendo la liberación del sustrato (Figura 42B) (N. M. I. Taylor et al., 2017).

Se han generado grandes esfuerzos en la última década en el desarrollo de inhibidores específicos contra el transportador ABCG2, al igual que otros transportadores de la familia ABC (Chearwae, Shukla, Limtrakul, & Ambudkar, 2006; Marin et al., 2008). Como resultado de estos estudios, uno de los primeros inhibidores propuestos del transportador ABCG2 fue la toxina fúngica fumitremorgina c (FTC) (Figura 43), sin embargo, sus efectos neurotóxicos no permitieron el avance en los estudios de este compuesto, generando el desarrollo de compuestos tetracíclicos análogos con el fin de reducir la neurotoxicidad presente en el compuesto FTC (Allen et al., 2002). Dentro de estos compuestos, se desarrolló el inhibidor Ko143 (Figura 43), siendo más potente y menos citotóxico que el inhibidor FTC, teniendo efectos inhibitorios en ABCG2 con IC50 de 138 nM, de igual forma presenta efectos inhibitorios no específicos frente a los transportadores ABCB1 y ABCC1 en concentraciones superiores a 1µM, adicionalmente, este inhibidor no es estable en plasma sanguíneo (Weidner et al., 2015)

Figura 43*Inhibidores específicos del transportador ABCG*

Nota: adaptado de (Jackson et al., 2018; Pires et al., 2016)

Más adelante, modificaciones químicas a la estructura del inhibidor Ko143, así como análisis *in vitro* revelaron los detalles para el desarrollo de inhibidores como el compuesto MZ29 (Figura 43), el cual se ha reportado que inhibe el transporte de sustratos mediante la interacción con los residuos cercanos a los dominios transmembrana, evitando la unión de otras moléculas. Así, el grupo O-ciclopentanilo se encuentra ubicado en el bolsillo formado por los residuos Phe431, Phe431, Met549, y Leu555 mediante interacciones hidrofóbicas, asimismo, el oxígeno unido al carbono C-9 presenta un puente de hidrógeno con el residuo Thr435 (Jackson et al., 2018).

Al igual que los derivados de la toxina fúngica FTC, algunos compuestos de origen natural como las chalconas, flavonas y curcumina han sido reportados con actividad inhibitoria frente al transportador ABCG2 (Gallus, Juvale, & Wiese, 2014; Juvale, Stefan, & Wiese, 2013). Otros derivados como la cromona 6g (Figura 43), perteneciente al grupo de las flavonas inhibe el transporte de mitoxantrona por acción del transportador ABCG2 con un IC_{50} de 0.11 μM , después

de 30 minutos de exposición al inhibidor (Pires et al., 2016; Valdameri et al., 2012). De igual forma, algunos derivados como las tetrahidroisoquinolinas pertenecientes a la familia de las quinolinas inhiben el transportador ABCB1 en concentraciones entre 0.6 – 690 nM, aumentando la acumulación de doxorrubicina al interior de las células de glioblastoma humano (Salaroglio et al., 2018). Con base en la información sobre la estructura, función e inhibidores de los transportadores de la familia ABC en especial el transportador ABCG2, y que, a pesar del aumento en el número de publicaciones sobre inhibidores de dicho transportador, aun no se cuenta con un inhibidor disponible para uso clínico. Por lo anterior, surgió la idea de evaluar el efecto inhibidor de los derivados de tetrahidroquinolina/isoxazolina sobre la actividad de los transportadores de ABCG2, P-gp (ABCB1), y MRP1 (ABCC1).

3.2. Materiales y métodos

Los ensayos realizados en este capítulo corresponden a la fase III del diseño metodológico del estudio (Figura 25). En esta fase, se evaluó la actividad inhibitoria de los híbridos moleculares de tetrahidroquinolina/isoxazolina sobre los transportadores P-gp, MRP1, y ABCG2 en las instalaciones del laboratory of cancer drug resistance de la Universidade Federal do Paraná en Brasil. Adicionalmente, se realizaron ensayos de docking molecular, y se evaluó la estabilidad de los mejores complejos proteína-ligando obtenidos a través de dinámica molecular en el laboratorio de modeling de la escuela de farmacia de la University of Eastern Finland.

3.2.1. Cultivo Celular

Se emplearon células embrionarias de riñón humano HEK293 transfectadas con ABCG2 (HEK293-ABCG2) con el fin de aumentar la expresión de este transportador para su posterior ensayo. Por otra parte, se emplearon células de fibroblasto murino NIH313 también transfectadas con Pgp1 (NIH313-Pgp) para ensayos de inhibición de transportador P-gp. Las células fueron cultivadas en medio DMEM, suplementados con 10% de suero fetal bovino, y 1% gentamicina, a 37 °C y 5% de CO₂ para su adhesión, crecimiento y replicación. Los subcultivos se realizaron usando una solución de tripsina-EDTA (pH 7,3).

3.2.2. Efecto de los híbridos moleculares sobre la actividad de los transportadores de la familia ABC

Para el ensayo de eflujo de fármacos mediado por los transportadores P-gp, ABCG2, y MRP1 se cultivaron 1.0×10^5 células/pozo en placas de cultivo de 24 pozos. Después de 48 horas de incubación las células fueron incubadas con los siguientes fluorocromos para evaluar su transporta a través de cada transportador, Mitoxantrona 5 μ M (ABCG2), Rodamina 5 μ M (P-gp), calceina-AM 0.2 μ M (MRP1) por 30 minutos a 37°C, en presencia de los híbridos moleculares (10 y 50 μ M). Luego las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. La fluorescencia intracelular del fluorocromo fue monitoreada con un citómetro FACS calibur (Becton Dickinson) equipado con un láser rojo a 635nm, usando el canal FL1(500-560nm) para la detección de la Rodamina, canal FL4 para la detección de la Mitoxantrona (661/16), y un laser de argón de 488 nm con un filtro de 530nm (FL1), evaluando por lo menos 10000 eventos.

El porcentaje de inhibición fue calculado siguiendo la ecuación:

$$\%inhibición = \frac{C - M}{C_{ev} - M} \times 100$$

Donde C es la fluorescencia de las células resistentes HEK293-ABCG2 en presencia de los híbridos y la Mitoxantrona, M es la fluorescencia de las células resistentes solo en presencia de la Mitoxantrona, Rodamina, o calceína-AM y C_{ev} es la Fluorescencia de las células control las cuales fueron inhibidas un 100% con cromona 4a 0,5 μ M para ABCG2, Elacridar 0,5 μ M en P-gp, o Verapamil 35 μ M en MRP1 dependiendo el transportador a evaluar.

3.2.3. Identificación de los sitios de unión e interacciones de los híbridos moleculares de tetrahidroquinolina/isoxazolina en el transportador ABCG2

3.2.3.1. Identificación del modo de unión de los híbridos moleculares al transportador ABCG2 por docking molecular. La preparación de los sistemas y los cálculos de docking fueron realizados empleando el set Drug Discovery de Schrödinger para modeling molecular (versión 2019.4). La estructura cristalina del transportador ABCG2 (PDBID: 6FFC, resolución 3.56 Å (Jackson et al., 2018)) fue obtenida de la Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org). Esta estructura cristalina fue seleccionada ya que presenta una de las mejores resoluciones para las estructuras cryo-EM del transportador ABCG2 actualmente reportadas. La estructura del transportador ABCG2 fue preparada empleando la herramienta Protein preparation wizard en la interfaz de maestro (Adzhigirey, Day, Sherman, Madhavi Sastry, & Annabhimoju, 2013) para arreglar los estados de protonación de los residuos aminoacídicos, añadir hidrógenos y también corregir los átomos de las cadenas laterales. Los bucles faltantes entre Asp 301 – Leu 328 y Gly 354 – Tyr 369 fueron generados y optimizados empleando Prime (Jacobson et al., 2004).

Todas las estructuras químicas de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina, así como la estructura química del inhibidor de referencia (aquí referido como **MZ29**) fueron dibujados e ilustrados usando la interfaz de maestro y preparados empleando la función Ligprep (Shelley et al., 2007) para generar su conformación tridimensional, ajustar el estado de protonación a pH fisiológico (7.4), y calcular las cargas atómicas parciales, con un campo de fuerza OPLS3e (Roos et al., 2019a).

Los ensayos de docking con los ligandos ya preparados fueron realizados empleando Glide (Friesner et al., 2004; Halgren et al., 2004) (Glide V7.7), con la modalidad flexible en el modo Induced-fit docking con extra precisión (XP), seguido de un paso de minimización de la energía de las cadenas laterales usando Prime (Sherman, Day, Jacobson, Friesner, & Farid, 2006). Los ligandos fueron dockeados dentro de una cuadrícula de 12 Å desde el centro del ligando co-cristalizado (MZ29) generando 20 poses por ligandos. Luego se realizó un refinamiento de los complejos proteína-ligando, usando Prime mediante su configuración estándar. Dentro de este paso se minimizaron todas las cadenas laterales dentro de 5 Å de cada pose del ligando acoplado.

3.2.3.2. Validación de los sistemas proteína-ligando mediante simulaciones de dinámica molecular. Las poses seleccionadas de los ensayos de docking fueron posteriormente validadas por simulaciones de dinámica molecular, donde se evaluó la estabilidad del ligando dentro del sitio de unión seleccionado, así como sus interacciones a lo largo de la simulación. Las simulaciones de dinámica molecular fueron llevadas a cabo usando Desmond (Bowers et al., 2006) con un campo de fuerza OPLS3e (Harder et al., 2016; Roos et al., 2019b), el cual conduce a un mejor rendimiento en la predicción de afinidades de unión del ligando a la proteína. El transportador fue incrustado en una bicapa lipídica DMPC tomada de la base de datos OPM (Lomize, Lomize, Pogozheva, & Mosberg, 2006), empleando la opción System Builder, donde la posición de la membrana fue controlada basada en las alfa hélices.

El sistema proteína-membrana fue ubicado en un caja con 15 Å desde los bordes de la caja hasta cualquier átomo de la proteína, empleando condiciones de contorno periódicas, y agua TIP3P (Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey, & Klein, 1983). Luego, todos los sistemas se equilibraron mediante simulaciones cortas bajo el conjunto NPT durante 5 ns implementando los métodos de termostato y barostato de Berendsen. Una temperatura constante de 310 K y 1 atm de presión durante toda la simulación utilizando el algoritmo del termostato Nose-Hoover y el algoritmo Barostat Martyna-Tobias-Klein, respectivamente. Después de los pasos de minimización y relajación, se realizó el paso de producción de al menos 500 ns. Para todas las simulaciones MD se realizaron al menos tres corridas independientes con semillas generadas aleatoriamente.

Las interacciones proteína-ligando y los cambios conformacionales en la proteína fueron analizados empleando la herramienta Simulation Interaction Diagram (SID). La estabilidad de las simulaciones de dinámica molecular fue monitoreada mediante la observación del RMSD (del

inglés, root mean square deviation), el RMSF (del inglés, root mean square fluctuation) del ligando y de la proteína a lo largo de la simulación.

3.2.4. Análisis estructural y figuras

Las imágenes estructurales fueron generadas usando PyMol 2.2.3 (“Schrödinger L. PyMol, The PyMOL Molecular Graphics System.) y las gráficas fueron elaboradas empleando GraphPad Prism version 8.1 for windows, GraphPad Software, (San Diego, California USA, www.graphpad.com).

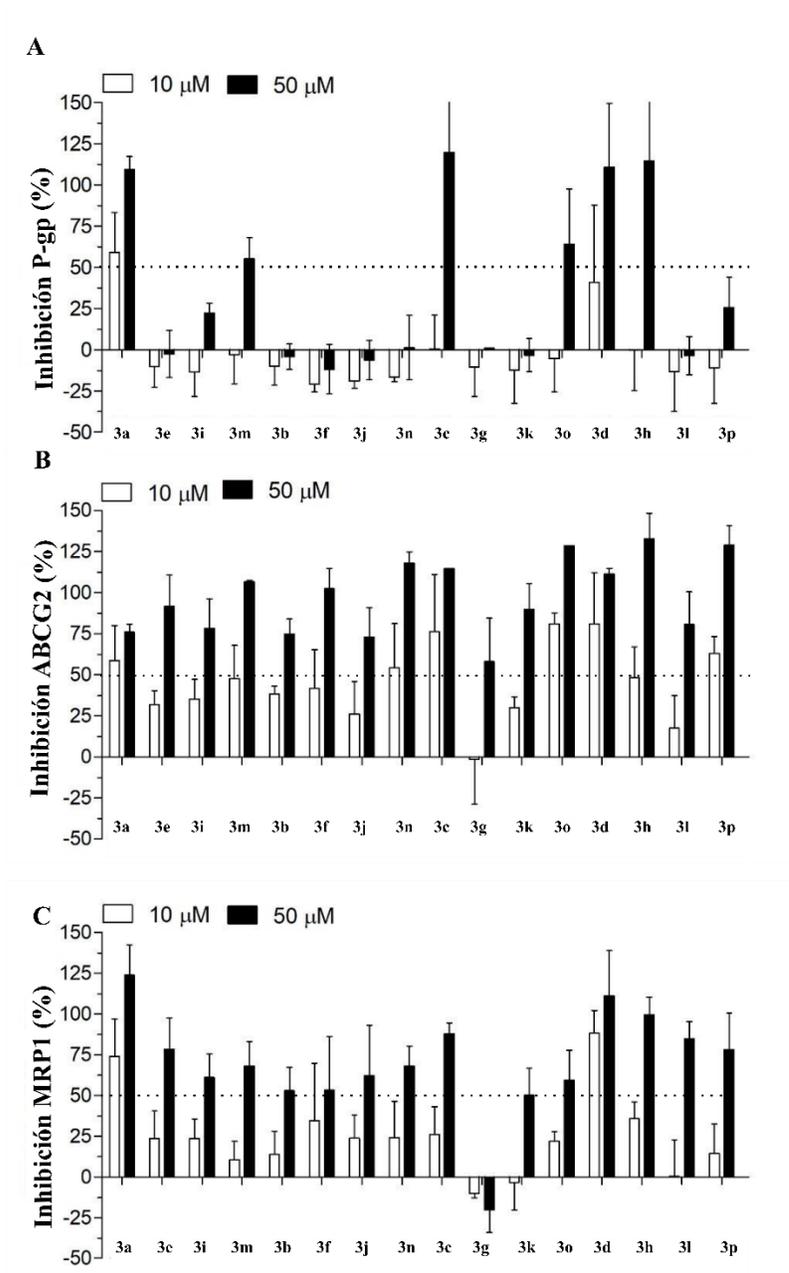
3.3. Resultados

3.3.1. Efecto de los híbridos moleculares sobre la actividad de los transportadores de la familia ABC

Con el fin de conocer el efecto de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el eflujo de fármacos mediado por los transportadores P-gp, ABCG2, y MRP1, se evaluó inicialmente los 16 híbridos en 2 concentraciones (10 y 50 μM), en cada uno de los transportadores. Respecto al transportador P-gp, los híbridos **3a**, **3m**, **3c**, **3o**, **3d**, y **3h** presentaron una inhibición en el transporte de rodamina (Figura 44), donde el híbrido **3c**, en la mayor concentración evaluada (50 μM) inhibió el transporte de rodamina cerca de ~120% respecto al inhibidor de referencia el elacridar, siendo la mayor inhibición generada por los híbridos moleculares para el inhibidor P-gp. Por otra parte, el híbrido **3a** (10 μM) inhibe cerca de ~60% de la actividad del transportador P-gp, generando la mayor inhibición en el transporte de rodamina para los híbridos de THQ/isoxazolina respecto al inhibidor de referencia empleado, el elacridar.

Figura 44

Efecto inhibitor de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre los transportadores A) P-gp, B) ABCG2, C) MRP1



Respecto al transportador ABCG2, el transporte de mitoxantrona a través de este fue inhibido por acción de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina (Figura 44B). En este caso, los 16 híbridos evaluados inhibieron más de 50% de la actividad del transportador ABCG2 a 50 μM , siendo los híbridos **3o**, **3h**, y **3p** los que presentaron la mayor inhibición en el transporte de mitoxantrona, inhibiendo cerca de $\sim 125\%$ de la actividad del transportador, respecto al inhibidor de referencia. Asimismo, los híbridos **3a**, **3n**, **3c**, **3o**, **3d**, y **3p** lograron inhibir el eflujo de mitoxantrona por encima de 50% en la menor concentración evaluada (10 μM). Así, los híbridos **3c**, **3o**, y **3p** generaron inhibición cercana a $\sim 75\%$, $\sim 80\%$, y $\sim 81\%$, respectivamente en el transporte de mitoxantrona, respecto al inhibidor de referencia empleado, la cromona 4a, siendo los híbridos con mayor efecto inhibitorio sobre el transportador ABCG2.

Finalmente, el transporte de calceina-AM por el transportador MRP1 también fue inhibido por los híbridos moleculares, donde los híbridos **3a** y **3d** presentaron la mayor inhibición en la concentración de 50 μM , con una inhibición de $\sim 125\%$ y $\sim 112\%$, respectivamente (Figura 44C). Adicionalmente, 15 de los 16 híbridos evaluados inhibieron más del 50% de la actividad del transportador a la mayor concentración evaluada, siendo el híbrido **3g** el único híbrido que no presentó actividad inhibitoria frente al transportador MRP1. Los híbridos con mayor actividad inhibitoria frente al transportador MRP1 en la menor concentración evaluada (10 μM) fueron los híbridos **3a** y **3d** con un porcentaje de inhibición de $\sim 75\%$ y $\sim 87\%$, respectivamente.

Con base en los resultados obtenidos sobre la inhibición en el transporte de fármacos a través de la membrana celular por acción de los híbridos moleculares sobre los transportadores

ABC, y en especial el efecto inhibitorio generado por los híbridos sobre la actividad del transportador ABCG2. Se decidió estudiar las interacciones presentadas por los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre el transportador ABCG2, a través de técnicas de docking molecular.

3.3.2. Identificación de los sitios de unión e interacciones de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el transportador ABCG2

3.3.2.1. Identificación del modo de unión de los híbridos moleculares al transportador ABCG2 por docking molecular. Con el fin de conocer las interacciones que hacen posible la inhibición del transportador ABCG2, y conocer los potenciales modos de unión de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina, se evaluó su acople molecular sobre la estructura cristalina del transportador ABCG2. Asimismo, con base en los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición del transportador ABCG2, se seleccionaron los híbridos 3a, 3c, 3o, 3d, y 3p como los compuestos más activos debido a su porcentaje de inhibición a la concentración de 10 μ M.

Los resultados del docking molecular obtenidos, indican que los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina pueden formar interacciones con residuos aminoacídicos presentes en la cavidad 1 del transportador ABCG2 (Figura 42), y en algunos casos comparten el mismo sitio de unión que el inhibidor MZ29. Así, el inhibidor MZ29 ubicado en la cavidad 1, se encuentra en el sitio de unión formado por los residuos Phe 431, Phe 432, Met 549 y Leu 55 mediante interacciones hidrofóbicas con su grupo O-ciclopentanilo. Adicionalmente, el oxígeno presente en ese grupo se encuentra formando un puente de hidrógeno con el aminoácido Thr 435 (Figura 45A).

El núcleo policíclico del inhibidor MZ29 se encuentra rodeado de una serie de residuos polares e hidrofóbicos donde se incluyen Ser 440, Thr 542 y Val 546, con los cuales forma interacciones de van der Waals. Además, el residuo Asn 436 forma un puente de hidrógeno con el nitrógeno presente en el anillo del indol, mientras que el grupo isobutilo unido al C-12 se encuentra formando interacciones de van der Waals con los residuos Leu 401, Val 405, y la cadena lateral que incluye el grupo tert-butiloxicarbonilo se encuentra formando interacciones de van der Waals con los residuos Ala 397, Val 401, y Leu 539 (Figura 45A).

De igual forma, los resultados del docking sugieren que el híbrido **3a** se une al transportador ABCG2 en el mismo sitio que el inhibidor MZ29, además forma un puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo pirrolidona unido a la tetrahydroquinolina y el residuo aminoacídico Ser 440 (Figura 45B). Adicionalmente, el grupo arilo unido al núcleo isoxazolina se encuentra en un bolsillo formado por los aminoácidos hidrofóbicos Phe 432, Leu 555, Met 549, y Phe 431, donde además forma una interacción de tipo π - π con este último aminoácido. Finalmente, el núcleo tetrahydroquinolina se encuentra formando interacciones de tipo van der Waals con los aminoácidos Thr 435, Asn 436, y Val 546, así como una interacción de tipo π - π con el aminoácido Phe 547 (Figura 45B).

Respecto a los híbridos **3c**, **3o**, y **3d**, los resultados obtenidos del docking molecular indican que estos, se unen al transportador ABCG2 en la cavidad 1 a una distancia más cercana a los dominios de unión a nucleótidos (NBD). Además, resulta interesante notar que a medida que se introducen los grupos metoxilo en el arilo del anillo de isoxazolina, la orientación del híbrido dentro del transportador cambia. De esta forma, en el híbrido **3c** el metoxilo presente en el arilo de la isoxazolina forma un puente hidrógeno con el residuo Arg 482, mientras que el núcleo tetrahydroquinolina y el anillo de pirrolidona forman interacciones de van der Waals con los residuos Phe 547, Val 546, Ile 543, Thr 542, Leu 539, Ser 443, Val 442, Ser 441, Ser 440, y Phe 439 (Figura 45C). Interacciones similares se obtienen con el híbrido **3o**, donde se presenta un puente de hidrógeno entre el residuo Arg 482 y el grupo metoxilo presente en el arilo del anillo de isoxazolina. La parte superior de la estructura química, el núcleo de tetrahydroquinolina y el anillo de pirrolidona, se encuentra rodeado por los residuos Val 546, Phe 547, Met 549, Ile 550, Phe 432, Thr 435, Asn 436, y Phe 439. Adicionalmente, los resultados del docking sugiere una interacción

de tipo π - π entre el anillo aromático de la tetrahydroquinolina y el residuo Phe 547 (Figura 45D). Por otra parte, a pesar de que el híbrido **3d** presenta una orientación similar a los híbridos **3o**, y **3c**, este no presenta el puente de hidrógeno que si se encuentra en las dos poses anteriores. En este caso, el grupo arilo del híbrido se encuentra formando interacciones de van der Waals con los residuos Thr 402, Val 401, Ile 399, Gln 398, Asn 436, Phe 439, y Ser 43, mientras que el grupo pirrolidona se encuentra formando un puente de hidrógeno con el residuo Thr 542 (Figura 45E).

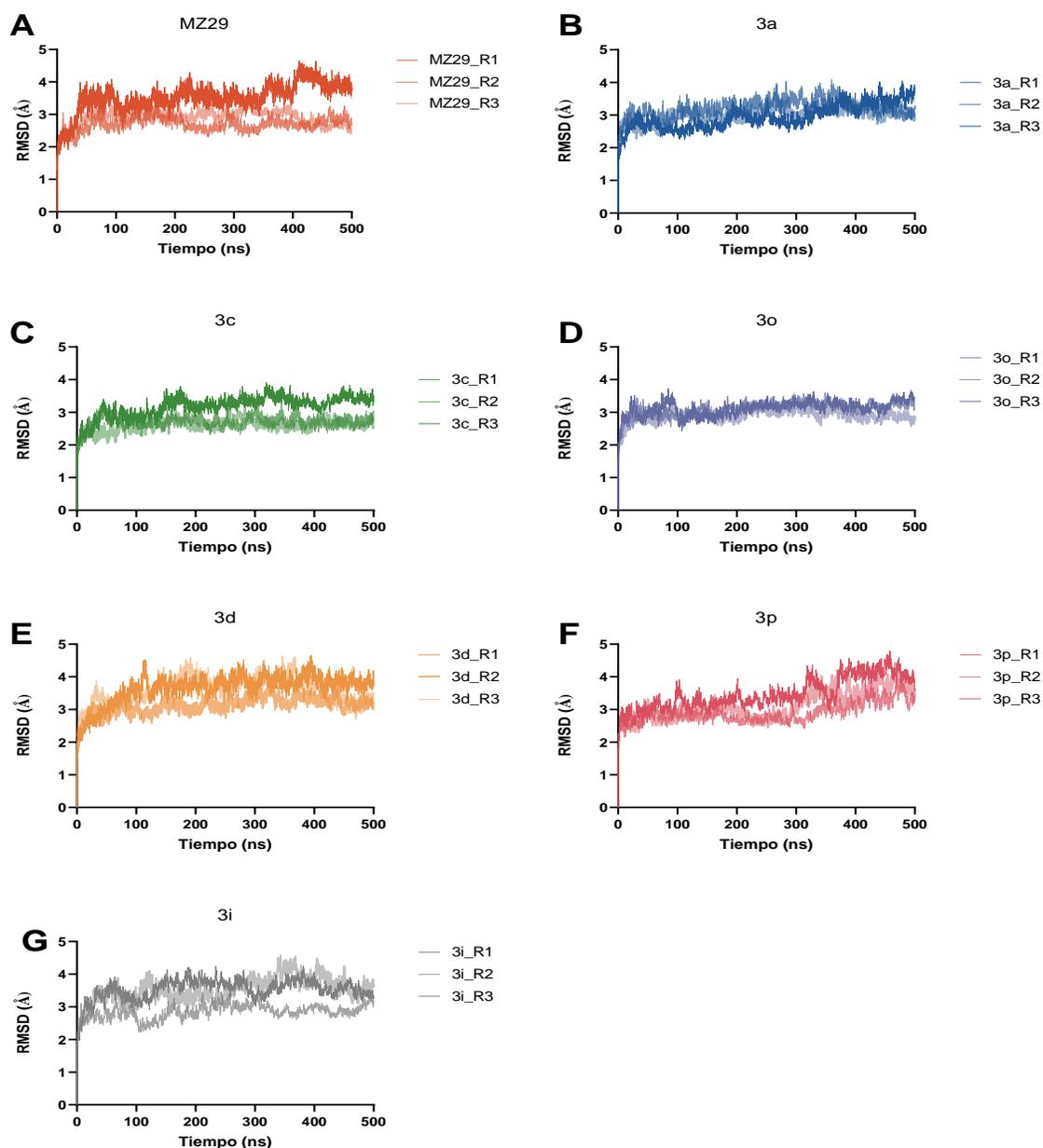
Finalmente, el híbrido **3i** (considerado como no activo) presenta una orientación similar dentro de la cavidad 1 del transportador ABCG2 a la obtenida por el híbrido **3a**. Sin embargo, este híbrido no logra formar puentes de hidrógeno con algún residuo dentro del transportador. Al igual que el híbrido **3a**, el grupo arilo y el anillo de isoxazolina del híbrido **3i** se encuentra formando interacciones de van der Waals con los residuos Phe 431, Phe 432, Thr 435, Asn 436, Met 549, y Val 546, mientras el núcleo de tetrahydroquinolina se encuentra dentro de un bolsillo formado por los residuos Phe 439, Ser 440, Ser 443, Gln 398, Val 401, Thr 402, y Leu 405 (Figura 45F).

3.3.2.2. Validación de los sistemas proteína-ligando mediante simulaciones de dinámica molecular. Con el fin de evaluar la estabilidad de los ligandos dentro del sitio de unión propuesto por el docking molecular en el transportador ABCG2, se simuló cada sistema proteína-ligando por triplicado durante 500 ns, el RMSD (del inglés, Root Mean Square Deviation) fue monitoreado para cada sistema proteína-ligando, donde se puede observar estabilidad en cada sistema a lo largo de la simulación, indicando que el ligando no genera grandes cambios en el desplazamiento de los átomos del transportador, debido a que grandes variaciones en el RMSD pueden estar relacionadas con una posible desnaturalización de la proteína, o la pérdida del ligando dentro del sitio de unión (Figura 46).

Imágenes representativas de la simulación por dinámica molecular, revela interacciones estables de tipo puente de hidrógeno con el residuo Asn 436 y Gln 398 (Figura 47A), con el grupo NH del anillo indol y el grupo carboxilo, respectivamente. Asimismo, la interacción de tipo puente de hidrógeno con el residuo Asn 436 y la Gln 398 se encuentra presente en un ~100% y ~48%, respectivamente, a lo largo de la simulación (Figura 48A). Además, el anillo aromático del inhibidor MZ29 presenta una interacción de tipo π - π con el residuo Phe 439, en una frecuencia de ~20% (Figura 48D), por su parte el anillo O-ciclopentanilo, se encuentra ocupando un bolsillo formado por los residuos Phe 431 y Val 546, con los cuales presenta interacciones hidrofóbicas (Figura 48).

Figura 46

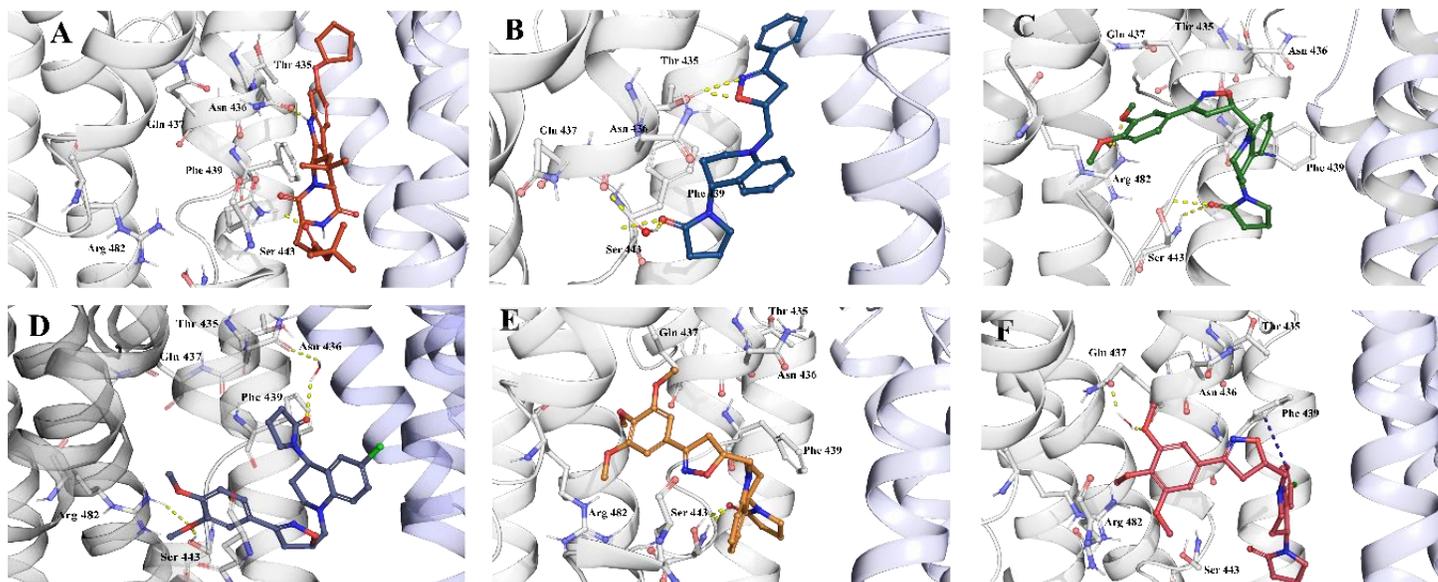
Imagen representativa de los valores observado de la desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal de la proteína para los siete complejos de proteína-ligando a lo largo de los 500 ns.



Nota: Las líneas representan el RMSD de los átomos centrales de ABCG2 a lo largo del tiempo de simulación respecto al tiempo inicial con cada inhibidor del transportador ABCG2. **A)** MZ29, **B)** 3a, **C)** 3c, **D)** 3o, **E)** 3d, **F)** 3p, **G)** 3i

Figura 47

Estructura representativa de últimos frames de las simulaciones de dinámica molecular de los híbridos de tetrahidroquinolina/isoxazolina



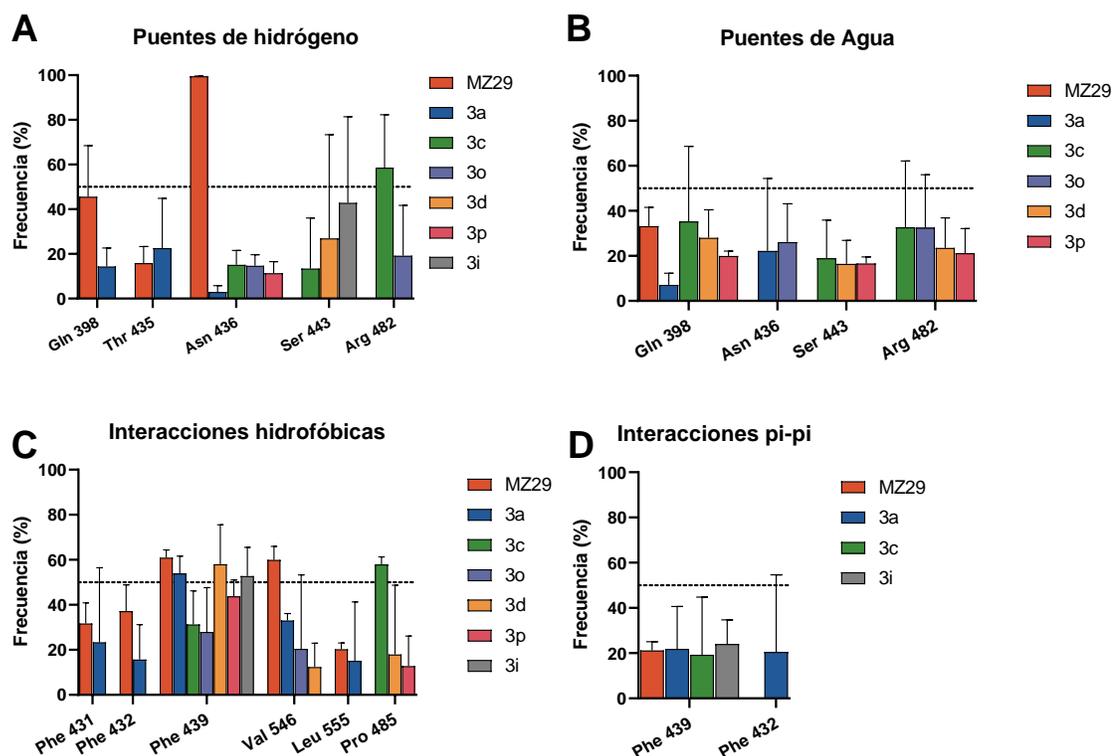
Nota: A) inhibidor MZ29, híbridos moleculares B) 3a, C) 3c, D) 3o, E) 3d, F) 3p. Los residuos del transportador ABCG2 se colorean de acuerdo con el tipo de átomo de los residuos de aminoácidos que interactúan (carbono de la proteína, gris claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando están representadas por líneas discontinuas de la siguiente manera: las interacciones de enlace de hidrógeno están coloreadas en amarillo, y las interacciones π - π están coloreadas en azul.

De forma similar, las simulaciones de dinámica molecular muestran interacciones entre el oxígeno del grupo isoxazolina presente en el híbrido **3a** y los residuos Thr 435 y Asn 436 (Figura 47B), dichas interacciones son de tipo puente de hidrógeno con una frecuencia de $\sim 3\%$, así como una interacción de tipo puente de agua con una frecuencia del $\sim 20\%$, para el residuo Asn 436, mientras el puente de hidrógeno formado entre el anillo de isoxazolina y el residuo Thr 435 presenta una frecuencia de $\sim 22\%$ (Figura 48A,B). Además, el grupo arilo unido a la isoxazolina

se encuentra en un bolsillo de unión formado por los residuos Phe 431 y Leu 555, con los cuales presenta una interacción de tipo hidrofóbico de cerca del ~20% de frecuencia (Figura 51C). Finalmente, el grupo tetrahydroquinolina del híbrido **3a** se encuentra en un bolsillo de unión formado por los residuos Phe 439 y Phe 432 (Figura 51C), donde el anillo aromático de la tetrahydroquinolina presenta una interacción de tipo π - π con el residuo Phe 439 con una frecuencia del ~20% (Figura 51D).

Figura 48

Representación gráfica de la frecuencia de las interacciones proteína-ligando a lo largo de la simulación de dinámica molecular de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina



Adicionalmente, se observó que a medida que aumenta el número de grupos metoxilos presentes en el arilo unido al núcleo isoxazolina, cambia la orientación de los híbridos **3c**, **3o**, **3d**, y **3p** respecto a la orientación presentada por el híbrido **3a** (Figura 47), así como el modo de unión y su posición el dominio transmembrana (TMD). En este sentido, los híbridos **3c**, **3o**, **3d**, y **3p** tienen un modo de unión similar caracterizado por una interacción de tipo puente de hidrógeno con el residuo Arg 482 (Figura 47), de esta forma la interacción de mayor frecuencia con el residuo Arg 482 la realiza el híbrido **3c** con una frecuencia de ~60% junto un puente de agua realizado durante cerca del ~30% de la simulación con el mismo residuo (Figura 48A,B).

Finalmente, el híbrido **3i** mantuvo la misma orientación que el híbrido **3a**, sin embargo, el compuesto **3i** a lo largo de la simulación se basó en gran medida en las interacciones hidrofóbicas y el apilamiento π - π con Phe439 para mantener su posición dentro de la cavidad de unión (Figura 48C,D). Además, las simulaciones de dinámica muestran una interacción de enlace de hidrógeno entre el grupo carbonilo de pirrolidona presente en el grupo tetrahydroquinolina con el residuo Ser 443 (Figura 48A), aunque esta interacción no es tan frecuente como lo son las interacciones hidrofóbica e interacciones de tipo π - π con el residuo Phe 439 (Figura 48CD).

4. Análisis y discusión de resultados globales

En 1998, una nueva proteína de membrana relacionada con la resistencia a fármacos fue descubierta en una línea celular de cáncer de mama resistente a la doxorrubicina, desde ese entonces se conoce como la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP, de sus siglas en inglés), siendo el miembro más reciente de los transportadores de la familia ABC (Y. N. Chen et al., 1990; Doyle et al., 1998). La sobreexpresión del transportador BCRP o ABCG2, al igual que

los otros transportadores de la familia ABC como el transportador ABCB1 y ABCC1, se encuentra estrechamente relacionada con la generación de resistencia a la quimioterapia (Gillet & Gottesman, 2011; Lászloá, Sarkadi, & Hegedüs, 2016). Adicionalmente, la expresión de estos transportadores también se presenta en la barrera hematoencefálica previniendo la entrada de xenobióticos y fármacos en el sistema nervioso central (De Boer, De Lange, Van Der Sandt, & Breimer, 1998; Horsey et al., 2016). Las investigaciones en el transportador ABCG2 han aumentado en la última década, dando como resultado la generación de inhibidores de la actividad del transportador ABCG2 (Figura 43)(Robert W. Robey et al., 2018). Así, dentro de los inhibidores del transportador ABCG2 más potentes conocidos se encuentran la fumitremorgina C (FTC), derivados de la FTC como el inhibidor Ko142 y derivados de cromonas, entre otros, donde a pesar de su potente actividad inhibitoria, aun no se ha aprobado inhibidor alguno para ensayos clínicos debido a que inducen neurotoxicidad y a su baja estabilidad en plasma sanguíneo (Allen et al., 2002; Pires et al., 2016; Weidner et al., 2015).

En consecuencia, el desarrollo de nuevos inhibidores del transportador ABCG2 se presenta como una oportunidad para la generación de agentes químicos como los derivados de tetrahydroquinolina/isoxazolina, y así contribuir al tratamiento de cáncer resistente a fármacos. Adicionalmente, empleando herramientas computacionales como el docking y la dinámica molecular se puede reducir el tiempo y costos necesarios para el desarrollo de estos nuevos fármacos.

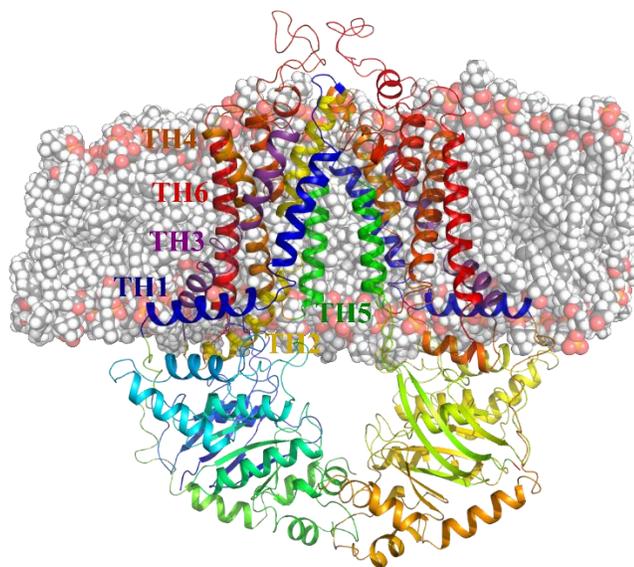
Por lo anterior, en este capítulo se estudiaron los posibles modos de unión de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina en el transportador ABCG2 a través de docking molecular y simulaciones de dinámica molecular. De esta forma, los estudios de acoplamiento

molecular sugieren que el híbrido **3a** puede ocupar el sitio de unión ubicado entre los dominios transmembranas (TMD) (Figura 47B). Este sitio fue descrito anteriormente por Krapf y colaboradores., 2018, siendo denominado como S1 y conteniendo residuos importantes como Thr435 – Phe 439, mientras, los híbridos **3c**, **3o**, **3d**, y **3p** ocupan el sitio de unión denominado como S2 (Krapf, Gallus, Namasivayam, & Wiese, 2018). El sitio 2 se encuentra ubicado entre la hélice transmembrana 1 (TH1) y la hélice transmembrana 4 (Figura 49) conteniendo los residuos Arg 482 y Pro 485, los cuales juegan un papel importante en la selectividad de sustratos para el transportador, así como en la captación e hidrólisis de ATP por el transportador, lo cual podría indicar que la interacción de los híbridos moleculares con el residuo Arg 482 podría estar relacionada con un aumento en la hidrólisis de ATP (Cox, Kapoor, Briggs, & Kerr, 2018; Ejendal, Diop, Schweiger, & Hrycyna, 2006; László et al., 2016; R. W. Robey et al., 2003). Adicionalmente, mutaciones en estos residuos como Arg482Thr y Arg482Lys muestran una deficiencia en la actividad de transporte de sustratos como la mitoxantrona y la feoforbida A, así como en la hidrólisis de ATP (Ejendal et al., 2006; Ni, Bikadi, Cai, Rosenberg, & Mao, 2010; Ni et al., 2011). Dado que el residuo Arg482 se encuentra en la tercera hélice transmembrana (TH3), la evidencia sugiere que este residuo desempeña un papel importante en la señal del dominio transmembrana hacia el NBD (Cox et al., 2018; Ejendal et al., 2006; Pozza, Perez-Victoria, Sardo, Ahmed-Belkacem, & Di Pietro, 2006; R. W. Robey et al., 2003). Por otro lado, el residuo Pro 485 también se encuentra en la misma hélice que el residuo Arg 482, lo que le da flexibilidad estructural a la hélice y, desde un punto de vista estructural, genera una cavidad de unión dinámica. Por esta razón, se reportan mutaciones en este residuo que eliminarían esa flexibilidad afectando la actividad de transporte de algunos sustratos como la prazosina y el SN-38 (Ni et al., 2011). De forma interesante, se ha reportado que la entrada al sitio S2 es limitada para aquellos compuestos

que no son sustratos del transportador, lo cual hace que esta región sea responsable del reconocimiento de sustratos, mientras que el sitio conocido como S1 es altamente promiscuo para la unión de sustratos o no sustratos (Lászloá et al., 2016). Lo anterior, indicaría que el ingreso de los híbridos **3c**, **3o**, **3d**, y **3p** al sitio S2 dificultaría el reconocimiento de sustratos indicando una posible inhibición competitiva.

Figura 49

Representación gráfica del sistema proteína-ligando-membrana preparado para las simulaciones de dinámica molecular



Respecto al híbrido **3a**, las interacciones observadas con los residuos Thr 435 y Asn 436, así como la posición del arilo unido al grupo isoxazolina ocupando el bolsillo formado por los residuos Phe 431 y Leu 555 (Figura 48A-C), se asemeja a las interacciones observadas por el inhibidor MZ29. Por lo tanto, la interacción hidrófoba con el residuo Leu555 podría desempeñar

un papel importante en la inhibición del transporte de fármacos, ya que el dominio transmembrana del transportador ABCG2 contiene dos cavidades aparentes separadas por dos residuos de leucina 554 y 555 (Figura 42) (Jackson et al., 2018). Donde la cavidad central y la más grande es esencial para el reconocimiento del sustrato, mientras que la cavidad superior está más relacionada con el control de la liberación del fármaco, donde la interacción di-leucina forma un sello hidrofóbico creando una válvula que permite el paso de fármacos a través de estas cavidades (Khunweeraphong et al., 2019).

En este sentido, es importante tener en cuenta que el farmacóforo isoxazolina en el compuesto **3a** puede compartir la misma región de unión formada por el residuo Phe431 con algunos inhibidores como Ko143, fumitremorgin C y sunitinib (Allen et al., 2002; Pires et al., 2016; Rabindran et al., 1998). Además, el híbrido **3a** tiene la misma interacción con Leu555 que el inhibidor MZ29 (Cox et al., 2018; Manolaridis et al., 2018). En consecuencia, la interacción hidrofóbica entre el inhibidor MZ29 y el residuo Leu 555, así como la interacción hidrofóbica entre el grupo arilo del núcleo isoxazolina en el híbrido **3a** con el mismo residuo, puede mediar la resistencia a múltiples fármacos ya que este Leu55 tiene un papel crítico para trasladar el sustrato hacia la cavidad superior (Khunweeraphong et al., 2019).

En el siguiente apartado se presentará una discusión hacia aspectos que impliquen abordar todos los resultados obtenidos en esta tesis doctoral. Es decir, se relacionarán los resultados obtenidos para los híbridos **3a**, **3i**, y **3m**, sobre mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular de melanoma murino B16F10 como modelos evaluados en este trabajo.

Se evaluó la actividad citotóxica sobre las líneas celulares cancerígenas HeLa, A549, B16F10, MCF 7, Hep-G2, y Vero de los 16 híbridos moleculares de THQ/isoxazolina (Anexo 1),

y de los 16 derivados de indenoquinolina (Anexo 2) análogos al antitumoral TAS-103. Los resultados obtenidos indican que los derivados de indenoquinolina no presentan efecto citotóxico alguno sobre las líneas celulares anteriormente mencionadas (Tabla 2). No obstante, es importante mencionar que el derivado CB72 presenta efecto citotóxico marcado en la línea de hepatocarcinoma humano ($CC_{50} = 25,67 \mu\text{M}$), así como en la línea no cancerígena Vero ($CC_{50} = 41,62 \mu\text{M}$), presentando así un índice de selectividad de $IS = 1,6$. Así, los resultados obtenidos por la quimioteca de indenoquinolinas no permitieron continuar con los ensayos planteados para estudiar su mecanismo de acción. Sin embargo, la adición de una cadena lateral de naturaleza básica al extremo en los derivados de indenoquinolina tal y como se muestra en los pasos IV y V (Figura 30), podría generar un aumento en la actividad biológica de estos compuestos. La anterior afirmación se basa en resultados de docking molecular que indican que dicha cadena lateral logra generar interacciones de tipo puente de hidrógeno con el residuo Arg364 en la topoisomerasa I, principal target del TAS-103 (Cincinelli et al., 2018).

Por otra parte, los híbridos de THQ/isoxazolina presentaron efecto citotóxico en las líneas de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa), y melanoma murino (B16F10) (Tabla 1). No obstante, se decidió seguir los ensayos para determinar el mecanismo de acción solo para los compuestos **3a**, **3i**, y **3m** debido al buen índice de selectividad presentado respecto a la línea no tumoral Vero. El ensayo de viabilidad celular por el método del MTT indica que los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** presentan efectos citotóxicos en la línea B16F10 después de 48 horas de tratamiento en concentraciones entre $11,37 - 25,59 \mu\text{M}$. De igual forma, los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** inhiben la proliferación celular en B16F10, evaluada mediante el método del cristal violeta (Figura 26). Así, el híbrido **3a** genera una disminución en el número de células viables a partir de las 24 horas de tratamiento a $10 \mu\text{M}$, llegando a tener efectos citotóxicos estadísticamente significativos en la

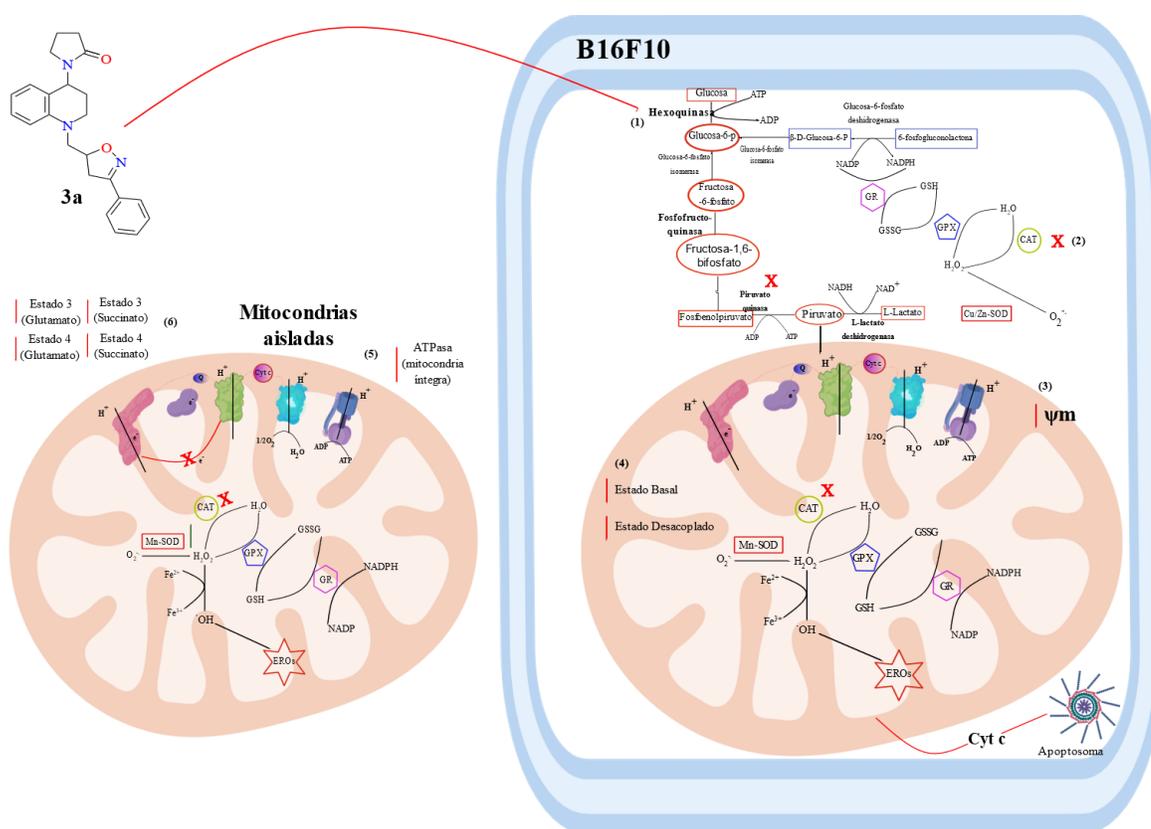
menor concentración evaluada (1 μM) después de 72 horas de tratamiento. Por su parte, los híbridos **3i** y **3m** disminuyeron el número de células viables después de 72 horas de tratamiento en concentraciones de 5 y 10 μM . Como se reportó anteriormente, la aparente diferencia en los resultados obtenidos por los dos métodos (MTT y cristal violeta) es debido al principio empleado para cada uno de estos métodos (Vistica et al., 1991; P. Wang et al., 2010).

A continuación, se discutirá el mecanismo de acción mediante el cual los híbridos **3a**, **3i**, y **3m** inducen procesos de muerte celular una vez han ingresado a la célula (Figura 50). De esta forma, primero, el híbrido **3a** genera un incremento de aproximadamente $\sim 10\%$ en la población de células en apoptosis temprana y un $\sim 5\%$ en apoptosis tardía después de 24 horas de tratamiento (Figura 28). Además, una vez ha ingresado en la célula el híbrido **3a** tiene como target la mitocondria, algunas enzimas de la vía glucolítica y afecta el sistema redox en la célula. En este sentido, el híbrido **3a** al interior de la célula inhibe la actividad de las enzimas hexoquinasa y piruvato quinasa alrededor de $\sim 50\%$ (Figura 35). Adicionalmente, la bioenergética mitocondrial también se ve afectada por la acción de este compuesto (Figura 36). Los ensayos de respiración celular demuestran una reducción en la velocidad de consumo de oxígeno en los estados basal y desacoplado generada por la acción del híbrido **3a** después de 24 horas de tratamiento. Esta reducción en la velocidad de consumo de oxígeno puede estar relacionada con una inhibición en el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial. Inhibición que se puede presentar en el transporte de electrones desde el complejo I hacia al complejo III. Lo anterior, con base en los resultados obtenidos en el modelo en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Allí, el híbrido **3a** genera una disminución en el consumo de oxígeno en estado 3 y 4 cuando se es energizada la mitocondria con glutamato (Figura 38). Además, el híbrido **3a** inhibe la actividad de

las enzimas NADH oxidasa y NADH citocromo c reductasa (Tabla 4) indicando la inhibición en el transporte de electrones vía complejo I al III.

Figura 50

Esquema del mecanismo de acción propuesto para el híbrido de THQ/isoxazolina 3a en los modelos evaluados, mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular B16F10



Nota: Efecto del híbrido molecular **3a** sobre la actividad de las enzimas de la vía glucolítica (1), inhibición de la actividad de la enzima catalasa (2), disminución del potencial de membrana (3), y disminución de consumo de oxígeno en estados basal y desacoplado en células B16F10 (4), aumento de la actividad ATPasa en mitocondrias integra (5) y modulación de los parámetros de respiración mitocondrial (estado 3 y estado 4) (6).

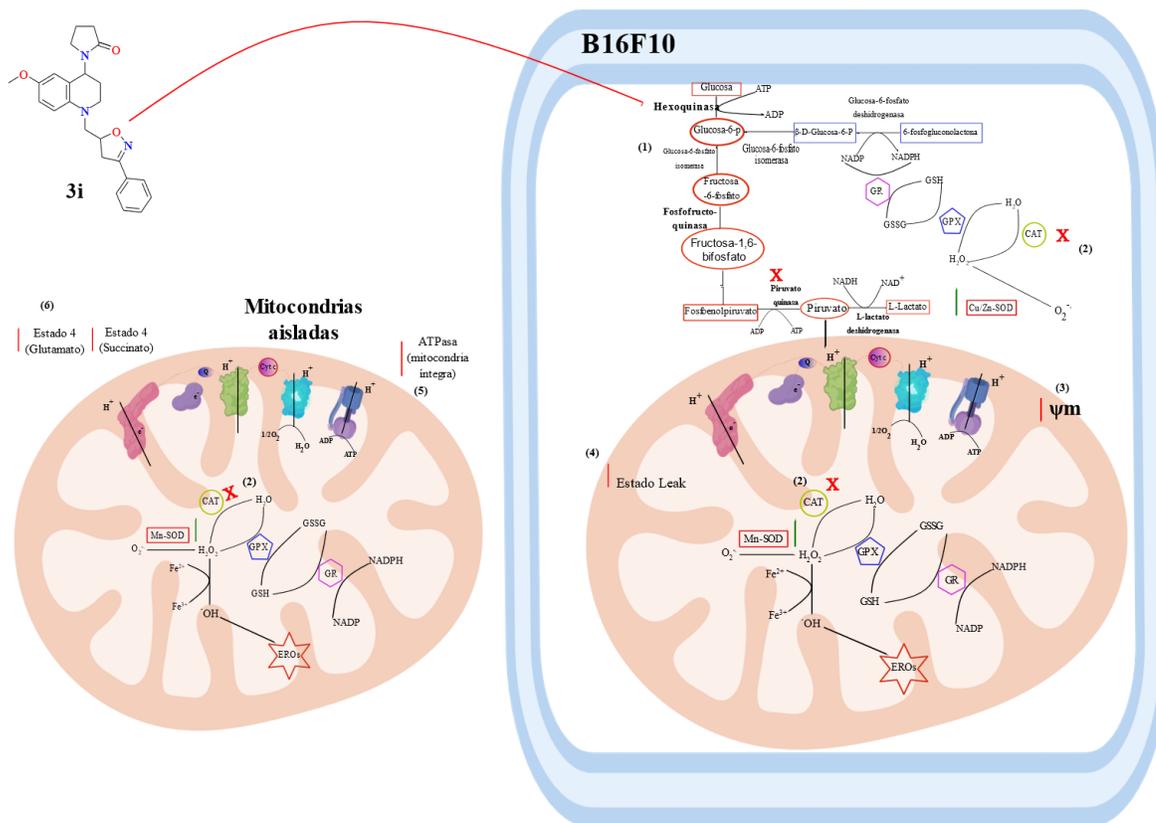
Además, los resultados obtenidos en las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial indican un aumento en la actividad ATPasa en mitocondrias aisladas de hígado de rata de cerca de ~56% respecto al control (Tabla 4). Este aumento en la actividad ATPasa puede estar relacionado con un efecto desacoplador de la fosforilación oxidativa, soportado por un aumento en el consumo de oxígeno en el estado 4 (Figura 38B) y que puede relacionarse a su vez con la disminución en el potencial de membrana presentado en la línea B16F10 después del tratamiento con el híbrido **3a** (Figura 37). No obstante, el potencial de membrana también puede verse afectado por otros factores, entre ellos, se incluye la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, disminuyendo así la fuerza protón-motriz generada por el bombeo de protones a través de la membrana por este complejo (Arakaki, Kita, Shibata, & Higuti, 2007; Han, Kim, Kim, & Park, 2009). A su vez, la disminución en el potencial de membrana puede ser generado por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Figura 50) que posteriormente inducirían peroxidación lipídica (Kagan et al., 2004; Nakagawa, 2004). Este aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno podría estar relacionado con la actividad del híbrido **3a** sobre el sistema redox en la célula. Dentro del sistema redox de la célula se encuentran enzimas como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), las cuales presentan alteración en su actividad por acción del híbrido **3a**. Así, el híbrido **3a** genera inhibición en la actividad de la CAT en la línea celular B16F10 (Figura 40). Además, en el modelo evaluado de mitocondrias aisladas de hígado de rata se encontró que este híbrido genera de la misma manera una inhibición de la actividad de cerca del ~50% para esta misma enzima. La inhibición de la enzima catalasa generaría un eventual aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno al interior de la célula y la mitocondria (principal productor de especies reactivas de oxígeno) (Boveris & Chance, 1973; Y. Liu et al., 2002). Asimismo, la producción de peróxido podría verse aumentada debido al incremento en la

actividad de la enzima superóxido dismutasa en mitocondrias aisladas (Figura 39). Sin embargo, de forma interesante se halló que el híbrido **3a** presentó efecto inhibitorio en la SOD solo en las mitocondrias aisladas de hígado de rata, indicando la posible actividad frente la isoforma Mn-SOD presente en la mitocondria (Figura 39) (Zelko et al., 2002). Dicho esto, la inhibición del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, y la inhibición de la enzima catalasa generaría un ambiente oxidativo en la célula permitiendo la peroxidación lipídica y la consecuente salida de agentes proapoptóticos como el citocromo c (Desagher & Martinou, 2000; Kantrow & Piantadosi, 1997). El cual es liberado luego después de 24 horas de tratamiento con el híbrido **3a** (Figura 28). Con su salida, el citocromo c junto a otros factores como SMAC/DIABLO y Apaf-1 formarían el apoptosoma y la consecuente activación de la procaspasa-9 (Berridge, 2014; Lorenzo Galluzzi et al., 2018), postulando al híbrido **3a** como un inductor de apoptosis por vía intrínseca o mediada por la mitocondria.

De igual forma, el híbrido **3i** afecta la bioenergética mitocondrial, el sistema redox, y algunas de las enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa al ingresar a la célula (Figura 51). De esta manera, una vez dentro de la célula, el híbrido **3i** genera una inhibición de aproximadamente ~20% en la hexoquinasa, así como inhibición de cerca del ~26% en la piruvato quinasa (Figura 35).

Figura 51

Esquema del mecanismo de acción propuesto para el híbrido de THQ/isoxazolina **3i** en los modelos evaluados, mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular B16F10



Nota: Efecto del híbrido molecular **3i** sobre la actividad de las enzima de la vía glucolítica (1), inhibición de la actividad de la enzima catalasa (2), disminución del potencial de membrana (3), y disminución de consumo de oxígeno en estado leak en células B16F10 (4), aumento de la actividad ATPasa en mitocondrias integra (5) y modulación de los parámetros de respiración mitocondrial (estado 4) (6).

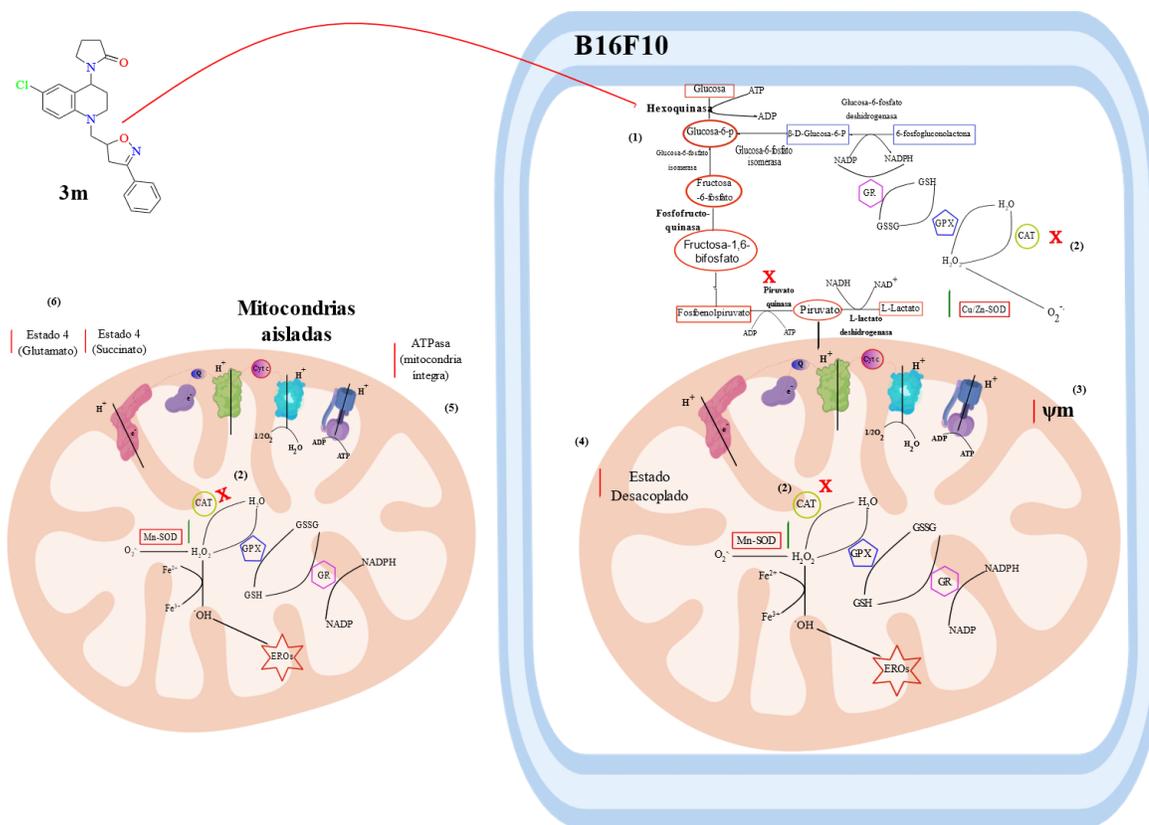
Adicionalmente, la bioenergética mitocondrial y en especial la síntesis de ATP se ve afectada por la acción del híbrido **3i**. Donde una vez en la mitocondria, el híbrido **3i** genera una disminución en el potencial de membrana de cerca del ~30% (Figura 37), disminución que se ve

reflejada a su vez en el aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado de mayor potencial o estado leak de cerca del ~100% (Figura 36). Asimismo, la disminución del potencial de membrana observado en B16F10 se puede relacionar con los resultados obtenidos en mitocondrias de hígado de rata. Allí el híbrido **3i** genera un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4 cuando la mitocondria es energizada con glutamato y succinato (Figura 38B). El aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4, cuando la mitocondria es energizada con ambos sustratos, indica un desacople de la fosforilación oxidativa con la síntesis de ATP generado por una disminución en el potencial de membrana (Puchowicz et al., 2004; Smith et al., 2012). Adicionalmente, el potencial de membrana también podría verse afectado por el aumento en las especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre biomoléculas como ADN y lípidos de membrana. De esta forma, la disminución del potencial de membrana observado en la línea B16F10 por acción del híbrido **3i** puede ser ocasionado por inhibición de enzimas como la catalasa, la cual fue estadísticamente inhibida en ~23% en mitocondrias aisladas (Figura 40). Asimismo, el ensayo del NBT para determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa se ve afectado por acción del híbrido **3i**. En la línea celular de melanoma murino B16F10 generó una disminución en la cantidad de NBT reducido en un ~22%, mientras que en mitocondrias aisladas esta disminución fue cerca del ~80%. Por otro lado, el híbrido **3i** genera alteraciones en la vía glucolítica mediante la inhibición en las enzimas hexoquinasa y piruvato quinasa. Además, por su efecto en la bioenergética mitocondrial el híbrido **3i** se postula como un desacoplador de la fosforilación oxidativa, soportado en los resultados obtenidos en la línea celular B16F10, donde se evidenció un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en el estado leak. Resultados que están relacionados con el aumento en el consumo de oxígeno en estado 4, así como la disminución del potencial de membrana.

Finalmente, el híbrido **3m** al igual que los híbridos anteriores presenta efectos inhibitorios sobre enzimas de la vía glucolítica y sobre la bioenergética mitocondrial (Figura 52). Estos efectos se ven reflejados en la inhibición de las actividades de las enzimas hexoquinasa y piruvato quinasa en aproximadamente un ~45% y ~40%, respectivamente (Figura 35).

Figura 52

Esquema del mecanismo de acción propuesto para el híbrido de THQ/isoxazolona 3m en los modelos evaluados, mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular B16F10.



Nota: Efecto del híbrido molecular **3m** sobre la actividad de las enzima de la vía glucolítica **(1)**, inhibición de la actividad de la enzima catalasa **(2)**, disminución del potencial de membrana **(3)**, y disminución de consumo de oxígeno en estado desacoplado en células B16F10 **(4)**, aumento de la

actividad ATPasa en mitocondrias integras (**5**) y modulación de los parámetros de respiración mitocondrial (estado 4) (**6**).

Adicionalmente, el híbrido **3m** presenta alteraciones en la bioenergética mitocondrial donde presenta inhibición en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial presentado en la disminución del consumo de oxígeno en el estado desacoplado de cerca del ~80% (Figura 36). La inhibición en la cadena respiratoria mitocondrial junto con la disminución en la actividad de la enzima catalasa (~68%) estaría involucrada en la disminución observada en el potencial de membrana para la línea B16F10 después del tratamiento con el híbrido **3m** (Figura 37).

Además, la disminución en el potencial de membrana al igual que en el híbrido anterior puede estar relacionado con el efecto desacoplador observado en las mitocondrias aisladas, donde se observó un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4 (Figura 38). Adicionalmente el efecto desacoplador es observado por el aumento en la actividad ATPasa en mitocondrias integras, donde se observa un aumento de cerca del ~56% (Tabla 4).

En general los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina, **3a**, **3i**, y **3m** corroboran la hipótesis planteada en este trabajo, que “los híbridos moleculares de THQ/isoxazoline presentan efecto citotóxico sobre líneas celulares cancerígenas, induciendo procesos de muerte celular programada mediante la inhibición de vías metabólicas involucradas en la proliferación celular, así como en la bioenergética mitocondrial”. Así los híbridos moleculares de THQ/isoxazolina se postulan como buenos candidatos para continuar estudios en la línea de melanoma, especialmente aquellas líneas donde se presenta la mutación en el gen BRAF, mutación que activa la actividad

mitocondrial en este tipo de célula (Luke & Ott, 2014; Pejkova, Dzokic, & Panov, 2016; Schadendorf et al., 2018). Adicionalmente, el núcleo tetrahydroquinolina y miembros de la misma familia de las quinolinas como las tetrahydroisoquinolinas han demostrado inducir procesos de muerte celular en líneas cancerígenas, mediante la inhibición de la respiración mitocondrial, específicamente en el transporte de electrones en el complejo I. Así, derivados de las quinolinas inhiben la proliferación celular en rangos de 2,5 – 16,7 μM , induciendo apoptosis mediada por la mitocondria en las células C6 de glioma, junto con la regulación de la expresión de bax y Bcl-2 y posterior activación de las caspasas 3 y 9 (Muthukrishnan, Sridharan, & Menéndez, 2019; Suzuki, Mizuno, & Yoshida, 1990). De igual forma derivados de tetrahydroquinolina/isoxazol han demostrado inducir muerte celular mediante la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, junto con efecto desacoplador de la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP en células de hepatocarcinoma humano (Álvarez santos et al., 2019).

Finalmente, el avance en el conocimiento del modo de acción de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina permite un mejor abordaje en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del melanoma, una enfermedad altamente metastásica.

5. Conclusión

Los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina inhiben el transporte de fármacos a través de los transportadores ABCB1, ABCC1, y ABCG2, siendo el híbrido **3a** el único híbrido capaz de inhibir más del 50% de la actividad de los 3 transportadores en la menor concentración evaluada (10 μ M).

El acoplamiento molecular sugiere que el híbrido **3a** tiene un perfil de interacción similar con el inhibidor de MZ29, manteniendo una interacción estable a lo largo de las 500ns de simulación con residuos como Asn 436, Gln 398 y Leu 555.

La interacción del híbrido **3a** con el residuo Leu 555 podría impedir el paso de sustratos a través del transportador.

A medida que aumenta el número de grupos metoxilo en el núcleo isoxazolina (Híbridos **3o**, **3c**, **3d**, **3p**), su perfil de interacción y su ubicación cambian hacia el sitio 2 del transportador ABCG2, permitiendo interacciones entre los híbridos y residuos como Arg 482 y Pro 485, residuos que se encuentran en TH3 y permiten el reconocimiento de sustratos tales como mitoxantrona y feoforbida A.

Las simulaciones de acoplamiento y dinámica molecular proporcionan nuevos conocimientos sobre el sitio de unión y las interacciones de los híbridos moleculares tetrahydroquinolina/isoxazolina en el transportador ABCG2, generando un gran potencial para el desarrollo de nuevos inhibidores del transportador ABCG2 potentes y selectivos.

6. Recomendaciones

Con el fin de continuar en la búsqueda del conocimiento del mecanismo de acción de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina, se plantean las siguientes recomendaciones:

Implementar biomarcadores específicos para apoptosis (Caspasa 8, caspasa 9, BCL-2) y así determinar si el tipo de muerte producido por acción de los híbridos **3a**, **3i** y **3m** es por vía extrínseca o vía mitocondrial. Además, de biomarcadores para procesos necróticos como RIP1 y RIP3.

Evaluar el efecto citotóxico en otras líneas de melanoma humano incluyendo líneas no tumorales de melanocitos. Lo anterior con el fin de determinar si existe algún tipo de selectividad frente a la línea tumoral frente a la no tumoral.

Evaluar el efecto generado por lo híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre la respiración celular en diferentes líneas de melanoma y además líneas de melanocitos con el fin de contrastar los efectos en la respiración celular en la línea cancerígena versus la línea normal. También, realizar ensayos de respiración celular en células permeadas con digitonina en B16F10 para estudiar la actividad complejo a complejo y determinar donde se encuentra el bloqueo de los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial generado por los híbridos **3a** y **3m**.

Realizar ensayos de hinchamiento mitocondrial inducido por valinomicina así como ensayos de activación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, con el fin de determinar si el efecto desacoplador de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina es debido al transporte de protones a través de la membrana interna mitocondrial (protonóforo) o mediante la activación de algún translocador mitocondrial de nucleótidos de adenina (ANT).

Realizar ensayos de producción de especies reactivas de oxígeno, así como ensayos de peroxidación lipídica para corroborar la producción de estas especies como producto de la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial y de las enzimas antioxidantes por acción de los híbridos de tetrahydroquinolina/isoxazolina.

Realizar otros ensayos en donde se evalúe el efecto de los híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre otras vías metabólicas que sirve como ruta anapleróticas para conseguir nutrientes del ciclo Krebs, generado por alguna reprogramación metabólica en la célula por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial y la vía glucolítica. Así como también el efecto en el metabolismo de la arginina y ciclo de la urea.

Divulgación de resultados

C.C. Bernal, L.C. Vesga, S.C. Mendez-Sánchez, A.R. Romero Bohórquez, Synthesis and anticancer activity of new tetrahydroquinoline hybrid derivatives tethered to isoxazoline moiety, Med. Chem. Res. (2020). <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02513-8>.

Luis Carlos Vesga, Ana Milena Pérez Silva, Cristian Camilo Bernal, Arnold Rafael Romero B, Stelia Carolina Mendez-Sanchez, Tetrahydroquinoline/isoxazoline Molecular Hybrids Targeting Mitochondrial Bioenergetic Metabolism on B16F10 murine melanoma, Journal of European Pharmacology (Sometido).

Trabajo “Actividad anticancerígena *in vitro* de nuevos híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/isoxazolina” presentado en el segundo congreso colombiano de bioquímica y biología molecular -C2B2 realizado del 3 al 5 de noviembre de 2016 en Medellín, Antioquia.

Trabajo “Anticancer activity on melanoma cells of new molecular hybrids of tetrahydroquinoline/isoxazoline” presentado en 43rd FEBBS congress realizado del 7 al 12 de julio de 2018 en Praga, Republica Checa.

Trabajos “Relación Estructura/Actividad de Híbridos Moleculares de Tetrahydroquinolina/Isoxazolina Sobre el Metabolismo Bioenergético Mitocondrial” y “Novel molecular hybrids of Tetrahydroquinoline/Isoxazoline as new possible treatments of cervical cancer and melanome” presentado en el tercer congreso colombiano de bioquímica y biología molecular- C2B2 realizado del 1 al 3 de noviembre de 2018 en Bogotá, Cundinamarca.

Referencias Bibliográficas

- Abou-shoer, M. I., Shaala, L. A., Diao, T. A., Badr, J. M., & Habib, A. M. (2008). Bioactive Brominated Metabolites from the Red Sea Sponge *Suberea mollis* Table of Contents. *Journal of Natural Products*, *71*, 1464–1467.
- Adzhigirey, M., Day, T., Sherman, W., Madhavi Sastry, G., & Annabhimoju, R. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *27*(3), 221–234.
<https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, *105*, 121–126.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86091-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86091-9)
- Aggarwal, K., & Khurana, J. M. (2017). Synthesis and application of an indenoquinoline dione conjugate as a dual fluorescent and colorimetric pH sensor. *Journal of Luminescence*, *187*, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2017.03.040>
- Aki, T., Nara, A., & Uemura, K. (2012). Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biology and Toxicology*, *28*(3), 125–131.
<https://doi.org/10.1007/s10565-012-9212-3>
- Akins, N. S., Nielson, T. C., & Le, H. V. (2018). Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *18*(6), 494–504. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180523111351>
- Al-lazikani, B., Banerji, U., & Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology*, *30*(7), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nbt.2284>
- Albano, F., Arcucci, A., Granato, G., Romano, S., Montagnani, S., De Vendittis, E., & Ruocco, M. R. (2013). Markers of mitochondrial dysfunction during the diclofenac-induced apoptosis in melanoma cell lines. *Biochimie*, *95*(4), 934–945.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.12.012>
- Allen, J. D., Van Loevezijn, A., Lakhai, J. M., Van Der Valk, M., Van Tellingen, O., Reid, G., ... Schinkel, A. H. (2002). Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance

protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(6), 417–425.

- Álvarez santos, M. R., Bueno Duarte, Y., M Güiza, F., Romero Bohórquez, A. R., & Mendez-Sanchez, S. C. (2019). Effects of new tetrahydroquinoline-isoxazole hybrids on bioenergetics of hepatocarcinoma Hep-G2 cells and rat liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*, 302(February), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.02.002>
- American Cancer Society. (2016). About Melanoma Skin Cancer. Retrieved from <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/what-is-melanoma.html>
- Appaix, F., Minatchy, M., Riva-Lavieille, C., Olivares, J., Antonsson, B., & Saks, V. a. (2000). Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1457(3), 175–181.
- Appleby, C. A., & Morton, R. K. (1959). Lactic dehydrogenase and cytochrome b2 of baker's yeast. Purification and crystallization. *Biochemical Journal*, 71(3), 492–499.
- Arakaki, N., Kita, T., Shibata, H., & Higuti, T. (2007). Cell-surface H⁺-ATP synthase as a potential molecular target for anti-obesity drugs. *FEBS Letters*, 581(18), 3405–3409. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.041>
- Arif, M. I., Samin, G., van Leeuwen, J. G. E., Oppentocht, J., & Janssen, D. B. (2012). Novel dehalogenase mechanism for 2,3-Dichloro-1-propanol utilization in *Pseudomonas putida* strain MC4. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6128–6136. <https://doi.org/10.1128/AEM.00760-12>
- Armstrong, J. S. (2007). Mitochondrial medicine: pharmacological targeting of mitochondria in disease. *British Journal of Pharmacology*, 151(8), 1154–1165. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707288>
- Ashkenazi, A. (2006). Death Receptors : Signaling and Modulation. *Science*, 1305(1998), 1305–1309. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Ashton, T. M., Fokas, E., Kunz-Schughart, L. A., Folkes, L. K., Anbalagan, S., Huether, M., ... McKenna, W. G. (2016). The anti-malarial atovaquone increases radiosensitivity by

- alleviating tumour hypoxia. *Nature Communications*, 7, 1–13.
<https://doi.org/10.1038/ncomms12308>
- Ashton, T. M., Gillies McKenna, W., Kunz-Schughart, L. A., & Higgins, G. S. (2018). Oxidative phosphorylation as an emerging target in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 24(11), 2482–2490. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3070>
- Atkinson, S. J., Soden, P. E., Angell, D. C., Bantscheff, M., Chung, C. W., Giblin, K. A., ... Prinjha, R. K. (2014). The structure based design of dual HDAC/BET inhibitors as novel epigenetic probes. *MedChemComm*, 5(3), 342–351. <https://doi.org/10.1039/c3md00285c>
- B, M. R., Bond, L. W., Burnett, R. W., Keech, R. C., & Bowers, G. N. J. (1976). Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clinical Chemistry*, 22(2), 141–150.
- Badisa, R. B., Darling-Reed, S. F., Joseph, P., Cooperwood, J. S., Latinwo, L. M., & Goodman, C. B. (2009). Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Research*, 29(8), 2993–2996.
- Ballot, C., Kluza, J., Lancel, S., Martoriati, A., Hassoun, S. M., Mortier, L., ... Marchetti, P. (2010). Inhibition of mitochondrial respiration mediates apoptosis induced by the anti-tumoral alkaloid lamellarin D. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 15(7), 769–781. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0471-2>
- Barbi de Moura, M., Vincent, G., Fayewicz, S. L., Bateman, N. W., Hood, B. L., Sun, M., ... Moschos, S. J. (2012). Mitochondrial respiration--an important therapeutic target in melanoma. *PloS One*, 7(8), e40690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040690>
- Basciani, S., Vona, R., Matarrese, P., Ascione, B., Mariani, S., Gnessi, L., ... Straface, E. (2007). Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells. *FEBS Letters*, 581(30), 5897–5903. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.069>
- Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., & Hajnóczky, G. (2006). Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *The Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17347–17358. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600906200>
- Berghe, T. Vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P.

- (2014). Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 135–147. <https://doi.org/10.1038/nrm3737>
- Bernal, C. C., Vesga, L. C., Mendez-Sánchez, S. C., & Romero Bohórquez, A. R. (2020). Synthesis and anticancer activity of new tetrahydroquinoline hybrid derivatives tethered to isoxazoline moiety. *Medicinal Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02513-8>
- Berridge, M. J. (2014). Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death. *Cell Signalling Biology*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1042/csb0001011>
- Bertrand, R., Solary, E., O'connor, P., Khon, K. W., & Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporina. *Experimental Cell Research*, 211, 314–321.
- Birth, D., Kao, W. C., & Hunte, C. (2014). Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc 1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action. *Nature Communications*, 5(May), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5029>
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., & Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.7795>
- Borrello, S., De Leo, M. E., & Galeotti, T. (1993). Defective gene expression of MnSOD in cancer cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 14(3), 253–258. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(93\)90012-3](https://doi.org/10.1016/0098-2997(93)90012-3)
- Bost, F., Decoux-Poullot, A.-G., Tanti, J. F., & Clavel, S. (2016). Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis*, 5(1), e188–e188. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.46>
- Bouillet, P., Metcalf, D., & Huang, D. C. S. (1999). Proapoptotic Bcl-2 Relative Bim Required for Certain Apoptotic Responses, Leukocyte... *Science*, 286(5445), 1735. Retrieved from <http://ezproxy.leedsbeckett.ac.uk/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edb&AN=2573971&site=eds-live&scope=site>

- Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., Ivanova, V., Stoica, B. A., Wang, G., Iyer, S., & Smulson, M. (1999). Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 22932–22940. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22932>
- Boveris, B. A., & Chance, B. (1973). The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide, *134*, 707–716.
- Bowers, K. J., Bowers, K. J., Chow, E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., ... Shaw, D. E. (2006). Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. *IN SC '06: PROCEEDINGS OF THE 2006 ACM/IEEE CONFERENCE ON SUPERCOMPUTING*. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.98.2121>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Brafford, P., Wei, Z., Xu, W., Dimwamwa, E., Ope, O., Xiao, M., ... Xu, C. (2016). Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*, 126(5), 1834–1856. <https://doi.org/10.1172/jci82661>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, (68), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brumatti, G., Salmanidis, M., & Ekert, P. G. (2010). Crossing paths: Interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10), 1619–1630. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0288-8>
- Cai, T., Kuang, Y., Zhang, C., Zhang, Z., Chen, L., Li, B., ... Zhu, Y. (2015). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase 4 control STAT3 activity in melanoma cells through a pathway involving reactive oxygen species, c-SRC and SHP2. *American Journal of Cancer Research*, 5(5), 1610–1620. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26175932> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/art>

iclerender.fcgi?artid=PMC4497430

- Cannavò, S. P., Tonacci, A., Bertino, L., Casciaro, M., Borgia, F., & Gangemi, S. (2019). The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. *Pathology Research and Practice*, 215(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.11.020>
- Cassago, A., Ferreira, A. P., Ferreira, I. M., Fornezari, C., Gomes, E. R., Greene, K. S., ... Ambrosio, A. L. (2012). Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1092–1097. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112495109>
- Chaabane, W., Mohamed, D. U., Jaksik, E. R., Ripk, Á., & Vhl, Á. P.-Á. P. Á. T. N. F. Á. (2013). Autophagy , Apoptosis , Mitoptosis and Necrosis : Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp*, 61, 43–58. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0205-y>
- Chaitanya, M. V. S. K., Reddy, P. O. V., Nikhil, K., Kumar, A., Shah, K., & Kumar, D. (2018). Synthesis and anticancer activity studies of indolyloxazoline analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 28(17), 2842–2845. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.035>
- Chakrabarty, S., Croft, M. S., Marko, M. G., & Moyna, G. (2013). Synthesis and evaluation as potential anticancer agents of novel tetracyclic indenoquinoline derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(5), 1143–1149. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.12.026>
- Chamberlain, S. D., Redman, A. M., Wilson, J. W., Deanda, F., Shotwell, J. B., Gerding, R., ... Patnaik, S. (2009). Optimization of 4,6-bis-anilino-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine IGF-1R tyrosine kinase inhibitors towards JNK selectivity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(2), 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.077>
- Chan, D. W., Liu, V. W. S., Tsao, G. S. W., Yao, K. M., Furukawa, T., Chan, K. K. L., & Ngan, H. Y. S. (2008). Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(9), 1742–1750. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn167>

- Chang, G. (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Letters*, 555(1), 102–105. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01085-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01085-8)
- Charles, E. M., & Rehm, M. (2014). Key regulators of apoptosis execution as biomarker candidates in melanoma. *Molecular and Cellular Oncology*, 1(3), 1–10. <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.964037>
- Chearwae, W., Shukla, S., Limtrakul, P., & Ambudkar, S. V. (2006). Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1995–2006. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0087>
- Chen, D., Yu, J., & Zhang, L. (2016). Necroptosis: An alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1865(2), 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003>
- Chen, P., Toribara, T., & Warner, H. (1971). Microdetermination of phosphorus in proteins. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 288–291.
- Chen, Y. N., Mickley, L. A., Schwartz, A. M., Acton, E. M., Hwang, J., & Fojo, A. T. (1990). Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265(17), 10073–10080.
- Chowdhury, S., Yung, E., Pintilie, M., Muaddi, H., Chaib, S., Yeung, M. T., ... Koritzinsky, M. (2016). MATE2 expression is associated with cancer cell response to metformin. *PLoS ONE*, 11(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165214>
- Ciaraldi, T. P., Nikoulina, S. E., Bandukwala, R. A., Carter, L., & Henry, R. R. (2007). Role of glycogen synthase kinase-3 α in insulin action in cultured human skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 148(9), 4393–4399. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0932>
- Cincinelli, R., Musso, L., Artali, R., Guglielmi, M. B., La Porta, I., Melito, C., ... Dallavalle, S. (2018). Hybrid topoisomerase i and HDAC inhibitors as dual action anticancer agents. *PLoS ONE*, 13(10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205018>
- Cippà, P. E., & Fehr, T. (2017). Pharmacological modulation of cell death in organ

- transplantation. *Transplant International*, 30(9), 851–859. <https://doi.org/10.1111/tri.12977>
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
- Colak, E., Ignjatovic, S., Radosavljevic, A., & Zoric, L. (2017). The association of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense parameters with inflammatory markers in patients with exudative form of age-related macular degeneration. *J Clin Biochem Nutr*, 60(2), 100–107. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.16>
- Cotter, M. A., Thomas, J., Cassidy, P., Robinette, K., Jenkins, N., Scott, R. F., ... Grossman, D. (2007). N-acetylcysteine protects melanocytes against oxidative stress/damage and delays onset of UV-induced melanoma in mice. *Clinical Cancer Research*, 13(19), 5952–5958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Cox, M. H., Kapoor, P., Briggs, D. A., & Kerr, I. D. (2018). Residues contributing to drug transport by ABCG2 are localised to multiple drug-binding pockets. *Biochemical Journal*, 475(9), 1553–1567. <https://doi.org/10.1042/bcj20170923>
- Cuezva, J. M., Li, M., Griendling, K., Smeitink, J. A., Cohen, C., Oberley, L., ... Arbiser, J. L. (2007). Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 719–729. <https://doi.org/10.1172/jci30102>
- Cury-Boaventura, M. F., Pompéia, C., & Curi, R. (2005). Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Raji cells. *Nutrition*, 21(3), 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.07.007>
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Das, P., Omollo, A. O., Sitole, L. J., McClendon, E., Valente, E. J., Raucher, D., ... Hamme, A. T. (2015). Synthesis and investigation of novel spiro-isoxazolines as anti-cancer agents. *Tetrahedron Letters*, 56(14), 1794–1797. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.02.059>

- De Boer, A. B. G., De Lange, E. L. C. M., Van Der Sandt, I. C. J., & Breimer, D. D. (1998). Transporters and the blood-brain barrier (BBB). *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 36(1), 14–15. <https://doi.org/10.2174/1381612043384844>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer cell metabolism. *Science Advances*, 2(May). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., & Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19345–19350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>
- Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 10(9), 369–377. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10932094>
- Dhani, N., Fyles, A., Hedley, D., & Milosevic, M. (2015). The clinical significance of hypoxia in human cancers. *Seminars in Nuclear Medicine*, 45(2), 110–121. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2014.11.002>
- Diepart, C., Karroum, O., Magat, J., Feron, O., Verrax, J., Calderon, P. B., ... Gallez, B. (2012). Arsenic trioxide treatment decreases the oxygen consumption rate of tumor cells and radiosensitizes solid tumors. *Cancer Research*, 72(2), 482–490. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1755>
- Digirolamo, M., Newby, F. D., & Lovejoy, J. (1992). Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(7), 2405–2412.
- Ding, C., Song, Z., Shen, A., Chen, T., & Zhang, A. (2020). Small molecules targeting the innate immune cGAS–STING–TBK1 signaling pathway. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.03.001>
- Djulgovic, M. B., & Uversky, V. N. (2019). Ferroptosis – An iron- and disorder-dependent programmed cell death. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 1052–

1069. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.221>

- Dong, L., & Neuzil, J. (2019). Targeting mitochondria as an anticancer strategy. *Cancer Communications*, 39(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40880-019-0412-6>
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V, Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells (mitoxantrone-anthracycline-transporter proteins). *Medical Sciences*, 95(December), 15665–15670.
- Dunai, Z. A., Imre, G., Barna, G., Korcsmaros, T., Petak, I., Bauer, P. I., & Mihalik, R. (2012). Staurosporine induces necroptotic cell death under caspase-compromised conditions in U937 cells. *PLoS ONE*, 7(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041945>
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M. M., Arnoult, D., Wang, C., ... Youle, R. J. (2011). Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*, 145(1), 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.034>
- Ejendal, K. F. K., Diop, N. K., Schweiger, L. C., & Hrycyna, C. A. (2006). The nature of amino acid 482 of human ABCG2 affects substrate transport and ATP hydrolysis but not substrate binding. *Protein Science*, 15(7), 1597–1607. <https://doi.org/10.1110/ps.051998406>
- Ekici, Ö. D., Li, Z. Z., Campbell, A. J., James, K. E., Asgian, J. L., Mikolajczyk, J., ... Powers, J. C. (2006). Design, synthesis, and evaluation of aza-peptide Michael acceptors as selective and potent inhibitors of caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9, and -10. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(19), 5728–5749. <https://doi.org/10.1021/jm0601405>
- Ekiz, M., Tutar, A., Ökten, S., Bütün, B., Koçyiğit, Ü. M., Taslimi, P., & Topçu, G. (2018). Synthesis, characterization, and SAR of arylated indenoquinoline-based cholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. *Archiv Der Pharmazie*, 351(9), 1–11. <https://doi.org/10.1002/ardp.201800167>
- Eleftheriadis, T., Pissas, G., Liakopoulos, V., & Stefanidis, I. (2016). Cytochrome c as a potentially clinical useful marker of mitochondrial and cellular damage. *Frontiers in Immunology*, 7(JUL), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00279>
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G. N., & Radi, E. (2012).

- Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 322(1–2), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.05.030>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Ferreira, J. G., Pereira, A. L., & Maiato, H. (2014). *Microtubule Plus-End Tracking Proteins and Their Roles in Cell Division*. *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 309). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800255-1.00002-8>
- Filipp, F. V., Ratnikov, B., De Ingeniis, J., Smith, J. W., Osterman, A. L., & Scott, D. A. (2012). Glutamine-fueled mitochondrial metabolism is decoupled from glycolysis in melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 25(6), 732–739. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12000>
- Filippakopoulos, P., & Knapp, S. (2012). The bromodomain interaction module. *FEBS Letters*, 586(17), 2692–2704. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.045>
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., ... Bradner, J. E. (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468(7327), 1067–1073. <https://doi.org/10.1038/nature09504>
- Fischer, G. M., Vashisht Gopal, Y. ., McQuade, J. L., Peng, W., DeBerardinis, R. J., & Davies, M. A. (2018). Metabolic Strategies of Melanoma Cells: Mechanisms, Interactions with the Tumor Microenvironment, and Therapeutic Implications. *Pigment Ce*, 31(1), 11–30. <https://doi.org/10.1002/cncr.27633.Percutaneous>
- Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D., & Haber, M. (2016). ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates*, 26, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.03.001>
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays Of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*,

105, 114–120.

- Flusberg, D. A., & Sorger, P. K. (2015). Surviving apoptosis: Life-death signaling in single cells. *Trends in Cell Biology*, 25(8), 446–458. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.03.003>
- Fortune, J. M., Velea, L., Graves, D. E., Utsugi, T., Yamada, Y., & Osheroff, N. (1999). DNA topoisomerases as targets for the anticancer drug TAS-103: DNA Interactions and Topoisomerase Catalytic Inhibition. *Biochemistry*, 38, 15580–15586. <https://doi.org/10.1021/bi991791o>
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., ... Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Fruehauf, J. P., Zonis, S., Al-Bassam, M., Kyshtoobayeva, A., Dasgupta, C., Milovanovic, T., ... Buzaid, A. C. (1998). Melanin content and downregulation of glutathione S-transferase contribute to the action of L-buthionine-S-sulfoximine on human melanoma. *Chemico-Biological Interactions*, 111–112, 277–305. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00167-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00167-1)
- Fu, Q., Fu, T. M., Cruz, A. C., Sengupta, P., Thomas, S. K., Wang, S., ... Chou, J. J. (2016). Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor. *Molecular Cell*, 61(4), 602–613. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.009>
- Gallus, J., Juvale, K., & Wiese, M. (2014). Characterization of 3-methoxy flavones for their interaction with ABCG2 as suggested by ATPase activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(11), 2929–2938. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.003>
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1237–1243. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>
- Galluzzi, Lorenzo, Bravo-San Pedro, J. M., Kepp, O., & Kroemer, G. (2016). Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11–12),

2405–2410. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2209-y>

Galluzzi, Lorenzo, Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G., & Linkermann, A. (2014). Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 35, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.006>

Galluzzi, Lorenzo, Kepp, O., & Kroemer, G. (2016). Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microbial Cell*, 3(3), 101–108. <https://doi.org/10.15698/mic2016.03.483>

Galluzzi, Lorenzo, Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 13(9), 1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>

Gaude, E., & Frezza, C. (2014). Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer and Metabolism*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-10>

Gedawy, E. M., Kassab, A. E., & El-malah, A. A. (2015). Synthesis and anticancer activity of novel tetrahydroquinoline and tetrahydropyrimidoquinoline derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 24(9), 3387–3397. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1388-7>

Gerardo Guillen-Nieto, P. L.-S., & Luis Herrera-Martínez, B. A.-C. (2013). Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM): Biological Overview from Pathways to Organelles and its Translation toward a Torpid Wound Healing Process. *J Diabetes Metab*, 04(07). <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000285>

Geserick, P., Wang, J., Schilling, R., Horn, S., Harris, P. A., Bertin, J., ... Leverkus, M. (2015). Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma. *Cell Death and Disease*, 6(9), e1884-12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.240>

Ghorab, M. M., Ragab, F. a., & Hamed, M. M. (2009). Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety.

European Journal of Medicinal Chemistry, 44(10), 4211–4217.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.017>

Ghosh, S., Santulli, R. J., Kinney, W. A., DeCorte, B. L., Liu, L., Lewis, J. M., ... Maryanoff, B. E. (2004). 1,2,3,4-Tetrahydroquinoline-containing $\alpha V\beta 3$ integrin antagonists with enhanced oral bioavailability. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(23), 5937–5941. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.08.067>

Gillet, J.-P., & Gottesman, M. M. (2011). Advance in the Molecular Detection of ABC Transporters Involved in Multidrug Resistance in Cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(4), 686–692.

Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., ... Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5887–5892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217823110>

Giorgio, Valentina, Burchell, V., Schiavone, M., Bassot, C., Minervini, G., Petronilli, V., ... Bernardi, P. (2017). Ca²⁺ binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition. *EMBO Reports*, 18(7), 1065–1076. <https://doi.org/10.15252/embr.201643354>

Giorgio, Valentina, Guo, L., Bassot, C., Petronilli, V., & Bernardi, P. (2018). Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*, 70, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004>

Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J., & Sarkadi B. (2004). The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Current Drug Delivery*, 1(1), 27–42. <https://doi.org/10.2174/1567201043480036>

Goli, N., Ummanni, R., Chandrasekhar, S., K, T., Ummanni, R., & Chandrasekhar, S. (2017). Expanding the tetrahydroquinoline pharmacophore. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(8), 1714–1720. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.077>

Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., ... Liu, C. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, 1–17.

<https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>

- Gongo, Y.-N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J. U., Yang, M., Fitzgerald, P., ... Green, D. R. (2017). ESCRT-III act downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences. *Cell*, *119*(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.020>
- Gonzalez-Polo, R.-A., Boya, P., Pauleau, A.-L., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., ... Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *Journal of Cell Science*, *118*(14), 3091–3102. <https://doi.org/10.1242/jcs.02447>
- Goodson, A. G., Cotter, M. A., Cassidy, P., Wade, M., Florrel, S. R., Liu, T., ... Grossman, D. (2009). Use of oral N-acetylcysteine for protection of melanocytic nevi against UV-induced oxidative stress: towards a novel paradigm for melanoma chemoprevention. *Clinical Cancer Research*, *15*(23), 7434–7440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Gopal, V. Y. N., Rizos, H., Chen, G., Deng, W., Frederick, D. T., Cooper, Z. A., ... Davies, M. A. (2014). Inhibition of mTORC1/2 overcomes resistance to MAPK pathway inhibitors mediated by PGC1 α and Oxidative Phosphorylation in melanoma. *Cancer Research*, *74*(23), 7037–7047. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823da96d>
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). MULTIDRUG RESISTANCE IN CANCER : ROLE OF ATP-DEPENDENT TRANSPORTERS. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(January), 48–58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>
- Gozzi, G. J., Pires, A. D. R. A., Martinez, G. R., Rocha, M. E. M., Noletto, G. R., Echevarria, A., ... Cadena, S. M. S. C. (2013). The antioxidant effect of the mesoionic compound SYD-1 in mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*, *205*(3), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.07.004>
- Griffiths, E. J. (2000). Mitochondria — potential role in cell life and death. *Cardiovascular Research*, *46*, 24–27.
- Hadfield, J. A., Ducki, S., Hirst, N., & McGown, A. T. (2003). Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Progress in Cell Cycle Research*, *5*(February), 309–325. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593726>

- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>
- Haltinner, K. (2013). Enhancing Activist Commitment Through Frame Alignment and the Amplification of Collective Identity : How the Tea Party Unites Its Divergent Membership. *Nature Reviews. Cancer*, *4*(May), 229. <https://doi.org/10.1038/nr1317>
- Han, Y. H., Kim, S. H., Kim, S. Z., & Park, W. H. (2009). Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) as an O₂(⁻) generator induces apoptosis via the depletion of intracellular GSH contents in Calu-6 cells. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *63*(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.05.005>
- Handa, O., Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2010). Helicobacter pylori: A ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflammation Research*, *59*(12), 997–1003. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0245-x>
- Haq, R., & Et all. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell*, *23*(3), 302–315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G. C., ... Widlund, H. R. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell*, *23*(3), 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.003>
- Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., ... Friesner, R. A. (2016). OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *12*(1), 281–296. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00864>
- He, S.-M., Li, R., R. Kanwar, J., & Zhou, S.-F. (2012). Structural and Functional Properties of Human Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1). *Current Medicinal Chemistry*, *18*(3), 439–481. <https://doi.org/10.2174/092986711794839197>
- Hersey, P., Watts, R. N., Xu, D. Z., & Hackett, J. (2009). Metabolic approaches to treatment of melanoma. *Clinical Cancer Research*, *15*(21), 6490–6494. <https://doi.org/10.1158/1078->

0432.CCR-09-0251

- Higgins, G. S., O’Cathail, S. M., Muschel, R. J., & McKenna, W. G. (2015). Drug radiotherapy combinations: Review of previous failures and reasons for future optimism. *Cancer Treatment Reviews*, *41*(2), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.12.012>
- Hoffmann, M. H., & Griffiths, H. R. (2018). The dual role of Reactive Oxygen Species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models. *Free Radical Biology and Medicine*, *125*(December 2017), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.016>
- Horseý, A. J., Cox, M. H., Sarwat, S., & Kerr, I. D. (2016). The multidrug transporter ABCG2 : still more questions than answers. *Biochemical Society Transactions*, *44*(3), 824–830. <https://doi.org/10.1042/BST20160014>
- Ishida, K., & Asao, T. (2002). Self-association and unique DNA binding properties of the anti-cancer agent TAS-103, a dual inhibitor of topoisomerases I and II. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1587*(2–3), 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00078-9)
- Izzo, V., Bravo-San Pedro, J. M., Sica, V., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2016). Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends in Cell Biology*, *26*(9), 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.04.006>
- Jackson, S. M., Manolaridis, I., Kowal, J., Zechner, M., Taylor, N. M. I., Bause, M., ... Locher, K. P. (2018). Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. *Nature Structural & Molecular Biology*, *25*(April). <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0049-1>
- Jacobson, M. P., Pincus, D. L., Rapp, C. S., Day, T. J. F., Honig, B., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2004). A Hierarchical Approach to All-Atom Protein Loop Prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *367*(March), 351–367. <https://doi.org/10.1002/prot.10613>
- Jordan, B. F., & Sonveaux, P. (2012). Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, *3 MAY*(May), 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00094>

- Jordán, J., Ceña, V., & Prehn, J. H. M. (2003). Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 59(2), 129–141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14649878>
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Juvale, K., Stefan, K., & Wiese, M. (2013). Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 67, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.035>
- Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Potapovich, A. I., ... Fujii, Y. (2004). Oxidative lipidomics of apoptosis: Redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1963–1985. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.016>
- Kakde, D., Jain, D., Shrivastava, V., Kakde, R., & Patil, A. T. (2011). Cancer therapeutics-opportunities, challenges and advances in drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(9), 1–10.
- Kamath, P. R., Sunil, D., Ajees, a. A., Pai, K. S. R., & Das, S. (2015). Some new indole–coumarin hybrids; Synthesis, anticancer and Bcl-2 docking studies. *Bioorganic Chemistry*, 63, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.10.001>
- Kang, S., Chung, J. H., Lee, J. H., Fisher, G. J., Wan, Y. S., Duell, E. A., & Voorhees, J. J. (2003). Topical n-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(5), 835–841. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12122.x>
- Kantrow, S. P., & Piantadosi, C. a. (1997). Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232(3), 669–671. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6353>
- Karch, J., Kwong, J. Q., Burr, A. R., Sargent, M. A., Elrod, J. W., Peixoto, P. M., ... Molkenin,

- J. D. (2013). Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *ELife*, 2, 1–21.
<https://doi.org/10.7554/elife.00772>
- Kaur, K., Kumar, V., Sharma, A. K., & Gupta, G. K. (2014). Isoxazoline containing natural products as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77, 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.063>
- Khunweeraphong, N., Szöllösi, D., Stockner, T., & Kuchler, K. (2019). The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid. *Nature Communications*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13302-2>
- Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177–185.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>
- Kiritoshi, S., Nishikawa, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Senokuchi, T., Matsuo, T., ... Araki, E. (2003). Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: Potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 52(10), 2570–2577. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.10.2570>
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., & Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 12(6), 611–620. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80212-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80212-5)
- Klippstein, R., Bansal, S. S., & Al-jamal, K. T. (2016). Doxorubicin enhances curcumin ' s cytotoxicity in human prostate cancer cells in vitro by enhancing its cellular uptake. *International Journal of Pharmaceutics*, 514(1), 169–175.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.003>
- Koritzinsky, M. (2015). Metformin: A novel biological modifier of tumor response to radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 93(2), 454–464.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.06.003>

- Krapf, M. K., Gallus, J., Namasivayam, V., & Wiese, M. (2018). 2,4,6-Substituted Quinazolines with Extraordinary Inhibitory Potency toward ABCG2. *Journal of Medicinal Chemistry*, *61*(17), 7952–7976. research-article. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01011>
- Krysko, O., Aaes, T. L., Kagan, V. E., D'Herde, K., Bachert, C., Leybaert, L., ... Krysko, D. V. (2017). Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. *Immunological Reviews*, *280*(1), 207–219. <https://doi.org/10.1111/imr.12583>
- Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B., & Koul, H. K. (2008). Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Research*, *68*(6), 1777–1785. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5259>
- Kumar, S. M., Yu, H., Edwards, R., Chen, L., Kazianis, S., Brafford, P., ... Xu, X. (2007). Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1 α expression in melanoma. *Cancer Research*, *67*(7), 3177–3184. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3312>
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, *3*(6), 965–976. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>
- Lakhter, A. J., Hamilton, J., Dagher, P. C., Mukkamala, S., Hato, T., Dong, X. C., ... Naidu, S. R. (2014). Ferroptosis: A cell death from modulation of oxidative phosphorylation and PKM2-dependent glycolysis in melanoma. *Oncotarget*, *5*(24). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3031>
- Lakhter, A. J., Hato, T., Shankar Babu, M., Naidu, S. R., Paul, S., & Mahanta, S. (2018). Lapachol inhibits glycolysis in cancer cells by targeting pyruvate kinase M2. *Plos One*, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191419>
- Land, S. C., & Tee, A. R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(28), 20534–20543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611782200>
- Lászloá, L., Sarkadi, B., & Hegedüs, T. (2016). Jump into a new fold-A homology based model for the ABCG2/BCRP multidrug transporter. *PLoS ONE*, *11*(10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164426>

- Lenardo, M., Chan, F. K.-M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., & Zheng, L. (2002). MATURE T LYMPHOCYTE APOPTOSIS—Immune Regulation in a Dynamic and Unpredictable Antigenic Environment. *Annual Review of Immunology*, *17*(1), 221–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.221>
- Lewin, G., Schaeffer, C., Hocquemiller, R., Jacoby, E., Léonce, S., Pierré, A., & Atassi, G. (2000). Access to new cytotoxic bisindole alkaloids by a modified Borch reductive amination process. *Heterocycles*, *53*(11), 2353–2356. <https://doi.org/10.3987/COM-00-9001>
- Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., ... Wu, H. (2012). The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis. *Cell*, *2*(150), 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.019>.
- Lin, C.-H., Al-Suwayeh, S. A., Hung, C.-F., Chen, C.-C., & Fang, J.-Y. (2014). Camptothecin-Loaded Liposomes with α -Melanocyte-Stimulating Hormone Enhance Cytotoxicity Toward and Cellular Uptake by Melanomas: An Application of Nanomedicine on Natural Product. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, *3*(2), 102–109. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.110423>
- Lingaraju, G. S., Balaji, K. S., Jayarama, S., Anil, S. M., Kiran, K. R., & Sadashiva, M. P. (2018). Synthesis of new coumarin tethered isoxazolines as potential anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *28*(23–24), 3606–3612. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.10.046>
- Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D., & Bates, S. E. (2001). From MDR to MXR: New understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*(7), 931–959. <https://doi.org/10.1007/PL00000912>
- Liu, H., Colavitti, R., Rovira, I. I., & Finkel, T. (2005). Redox-dependent transcriptional regulation. *Circulation Research*, *97*(10), 967–974. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000188210.72062.10>
- Liu, J., Wang, Y., Sun, Y., Marshall, D., Miao, S., Tonn, G., ... Medina, J. (2009).

- Tetrahydroquinoline derivatives as CRTH2 antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(24), 6840–6844. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.094>
- Liu, X. P., Zhou, S. T., Li, X. Y., Chen, X. C., Zhao, X., Qian, Z. Y., ... Wei, Y. Q. (2010). Anti-tumor activity of N-trimethyl chitosan-encapsulated camptothecin in a mouse melanoma model. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-76>
- Liu, X., Zhou, M., Mei, L., Ruan, J., Hu, Q., Peng, J., ... Li, C. Y. (2016). Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget*, 7(16), 22219–22233. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7924>
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), 780–787. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3191002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Liu, Y. M., Lee, H. Y., Chen, C. H., Lee, C. H., Wang, L. T., Pan, S. L., ... Liou, J. P. (2015). 1-arylsulfonyl-5-(N-hydroxyacrylamide)tetrahydroquinolines as potent histone deacetylase inhibitors suppressing the growth of prostate cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.052>
- Locasale, J. W., Grassian, A. R., Melman, T., Lyssiotis, C. A., Mattaini, K. R., Bass, A. J., ... Heiden, M. G. Vander. (2013). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet*, 43(9), 869–874. <https://doi.org/10.1038/ng.890.Phosphoglycerate>
- Lomize, M. A., Lomize, A. L., Pogozheva, I. D., & Mosberg, H. I. (2006). OPM: Orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics*, 22(5), 623–625. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk023>
- Luke, J. J., & Ott, P. A. (2014). New developments in the treatment of metastatic melanoma – role of dabrafenib – trametinib combination therapy. *Drug, HEalthcare and Patient Safety*, 6, 77–88.

- Madungwe, N. B., Zilberstein, N. F., Feng, Y., & Bopassa, J. C. (2016). Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 6(3), 93–108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27679744><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5030389>
- Manolaridis, I., Jackson, S. M., Taylor, N. M. I., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2018). Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature*, 563(7731), 426–430. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0680-3>
- Marchand, C., Antony, S., Kohn, K. W., Cushman, M., Loanovicu, A., Burgin, A. B., ... Pommier, Y. (2006). A novel norindenisoquinoline structure reveals a common interfacial inhibitor paradigm for ternary trapping of the topoisomerase I-DNA covalent complex. *Mol Cancer Ther*, 5(2), 287–295. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Marin, J. J. G., Castaño, B., Martínez-becerra, P., Rosales, R., & Monte, J. (2008). Chemotherapy in the treatment of primary liver tumours. *Cancer Therapy*, 6, 711–728.
- Martin-Sanchez, D., Poveda, J., Fontecha-Barriuso, M., Ruiz-Andres, O., Sanchez-Niño, M. D., Ruiz-Ortega, M., ... Sanz, A. B. (2018). Targeting of regulated necrosis in kidney disease. *Nefrologia*, 38(2), 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2017.04.004>
- Martins, P., Jesus, J., Santos, S., Raposo, L. R., Roma-Rodrigues, C., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2015). Heterocyclic anticancer compounds: Recent advances and the paradigm shift towards the use of nanomedicine's tool Box. *Molecules*, 20(9), 16852–16891. <https://doi.org/10.3390/molecules200916852>
- Marushige, K. (1976). Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), 3937–3941. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3937>
- Mason, T. L., Poyton, R. O., Wharton, D. C., & Schatz, G. (1973). Cytochrome c oxidase from bakers' yeast. I. Isolation and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(4),

1346–1354.

- McQuade, J. L., & Vashisht Gopal, Y. (2015). Counteracting oxidative phosphorylation-mediated resistance of melanomas to MAPK pathway inhibition. *Molecular and Cellular Oncology*, 2(3), 2–4. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.991610>
- Meira, W. V., Heinrich, T. A., Maria, S., Correia, S., & Martinez, G. R. (2017). Melanogenesis inhibits respiration in B16-F10 melanoma cells whereas enhances mitochondrial cell content. *Experimental Cell Research*, 350(1), 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.11.006>
- Meyskens, F. L., McNulty, S. E., Buckmeier, J. A., Tohidian, N. B., Spillane, T. J., Kahlon, R. S., & Gonzalez, R. I. (2001). Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(6), 799–808. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00650-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00650-5)
- Meyskens, F. L., Van Chau, H., Tohidian, N., & Buckmeier, J. (1997). Luminol-Enhanced Chemiluminescent Response of Human Melanocytes and Melanoma Cells to Hydrogen Peroxide Stress. *Pigment Cell Research*, 10(3), 184–189. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1997.tb00482.x>
- Milakovic, T., & Johnson, G. V. W. (2005). Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30773–30782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504749200>
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>
- Mo, W., & Zhang, J. (2012). Human ABCG2 : structure , function , and its role in multidrug resistance. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(1), 1–27.
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.05.023>
- Mookerjee, S. A., Divakaruni, A. S., Jastroch, M., & Brand, M. D. (2010). Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mech Ageing Dev*, 131(7–8), 463–472.

<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

- Morin, D., Pires, F., Plin, C., & Tillement, J.-P. (2004). Role of the permeability transition pore in cytochrome C release from mitochondria during ischemia-reperfusion in rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 68(10), 2065–2073. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.006>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mulakkal, N. C., Nagy, P., Takats, S., Tusco, R., Juhász, G., & Nezis, I. P. (2014). Autophagy in *Drosophila*: From Historical Studies to Current Knowledge. *BioMed Research International*, 2014(C), 1–24. <https://doi.org/10.1155/2014/273473>
- Mullarky, E., Mattaini, K. R., Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Locasale, J. W. (2011). PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 24(6), 1112–1115. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00919.x>
- Muñoz, A., Sojo, F., Arenas, D. R. M., Kouznetsov, V. V., & Arvelo, F. (2011). Cytotoxic effects of new trans-2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4- tetrahydroquinolines and their interaction with antitumoral drugs gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 189(3), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.11.010>
- Murphy, J. M., Czabotar, P. E., Hildebrand, J. M., Lucet, I. S., Zhang, J. G., Alvarez-Diaz, S., ... Alexander, W. S. (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39(3), 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.018>
- Muthukrishnan, I., Sridharan, V., & Menéndez, J. C. (2019). Progress in the Chemistry of Tetrahydroquinolines. *Chemical Reviews*, 119(8), 5057–5191. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00567>
- Nagaiah, K., Venkatesham, A., Srinivasa Rao, R., Saddanapu, V., Yadav, J. S., Basha, S. J., ... Addlagatta, A. (2010). Synthesis of new cis-fused tetrahydrochromeno[4,3-b]quinolines and

their antiproliferative activity studies against MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(11), 3259–3264.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.04.061>

Nagata, S. (2005). Dna Degradation in Development and Programmed Cell Death. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 853–875.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115811>

Nakagawa, Y. (2004). Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1011, 177–184.

<https://doi.org/10.1196/annals.1293.018>

Ni, Z., Bikadi, Z., Cai, X., Rosenberg, M. F., & Mao, Q. (2010). Transmembrane helices 1 and 6 of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Identification of polar residues important for drug transport. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 299(5), 1100–1109. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00160.2010>

Ni, Z., Bikadi, Z., Shuster, D. L., Zhao, C., Rosenberg, M. F., & Mao, Q. (2011). Identification of proline residues in or near the transmembrane helices of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) that are important for transport activity and substrate specificity. *Biochemistry*, 50(37), 8057–8066. <https://doi.org/10.1021/bi200573t>

Nishikimi, M., Appaji Rao, N., & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849–854. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(72\)80218-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(72)80218-3)

Nixon, G. L., Moss, D. M., Shone, A. E., Lalloo, D. G., Fisher, N., O'neill, P. M., ... Biagini, G. A. (2013). Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 977–985. <https://doi.org/10.1093/jac/dks504>

O'Neil, R. G., Wu, L., & Mullani, N. (2005). Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Molecular Imaging and Biology*, 7(6), 388–392.

<https://doi.org/10.1007/s11307-005-0011-6>

Observatorio Nacional De Salud. (2015). Informe técnico - Carga de enfermedades Crónicas No

Transmisibles y Discapacidad en Colombia. *Ministerio de Salud*, 5, 239.

- Ohyama, T., Li, Y., Utsugi, T., Irie, S., Yamada, Y., & Sato, T. A. (1999). A dual topoisomerase inhibitor, TAS-103, induces apoptosis in human cancer cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90(6), 691–698. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00802.x>
- Opatov, A., Cumov, A., Slíva, D., Vodi, P., & Rejho, A. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 582–594. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.039>
- Paluncic, J., Kovacevic, Z., Jansson, P. J., Kalinowski, D., Merlot, A. M., Huang, M. L., ... Richardson, D. R. (2016). Roads to melanoma : Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *BBA - Molecular Cell Research*, 1863(4), 770–784. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.025>
- Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2010). Metastasis: Cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 351–378. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9225-4>
- Park, S., Hatanpaa, K. J., Xie, Y., Mickey, B. E., Christopher, J., Raisanen, J. M., ... Habib, A. A. (2009). The receptor interacting protein (RIP1) inhibits p53 induction through NF- κ B activation and confers a worse prognosis in glioblastoma. *Cancer Research*, 69(7), 2809–2816. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4079>.The
- Parmenter, T. J., Kleinschmidt, M., Kinross, K. M., Bond, S. T., Li, J., Kaadige, M. R., ... McArthur, G. A. (2014). Response of BRAF mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulator of glycolysis. *Cancer Discovery*, 4(4), 423–433. <https://doi.org/10.1158/2159-8290>
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333(1–2), 19–39. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00200-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00200-6)
- Patra, K. C., Wang, Q., Bhaskar, P. T., Miller, L., Wang, Z., Chandel, N., ... Robey, B. (2013). hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell*, 24(2), 213–228.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.06.014>.Hexokinase

Patra, K., & Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(8), 347–354. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Payen, V. L., Porporato, P. E., Baselet, B., & Sonveaux, P. (2016). Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: Tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(7), 1333–1348. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2098-5>

Pejkova, S., Dzokic, G., & Panov, S. T. S. (2016). in the Progression of the Malignant Skin Melanoma.

Penefsky, H. S. (1985). Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(6), 1589–1593. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.6.1589>

Pernicova, I., & Korbonits, M. (2014). Metformin-Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(3), 143–156. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256>

Pervaiz, S., & Clement, M. V. (2007). Superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species? *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(7–8), 1297–1304. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.04.007>

Petrie, E. J., Czabotar, P. E., & Murphy, J. M. (2019). The Structural Basis of Necroptotic Cell Death Signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.11.002>

Philpott, N. J., Turner, A. J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J. C., Gordon-Smith, E. C., ... Gibson, F. M. (1996). The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*, 87(6), 2244–2251. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630384>

Pihán, P., Carreras-Sureda, A., & Hetz, C. (2017). BCL-2 family: Integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death and Differentiation*, 24(9), 1478–1487.

<https://doi.org/10.1038/cdd.2017.82>

Pinheiro, C., Miranda-Gonçalves, V., Longatto-Filho, A., Vicente, A. L. S. A., Berardinelli, G. N., Scapulatempo-Neto, C., ... Vazquez, V. L. (2016). The metabolic microenvironment of melanomas: Prognostic value of MCT1 and MCT4. *Cell Cycle*, *15*(11), 1462–1470.

<https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1175258>

Pires, A. do R. A., Lecerf-Schmidt, F., Guragossian, N., Pazinato, J., Gozzi, G. J., Winter, E., ... Pérès, B. (2016). New, highly potent and non-toxic, chromone inhibitors of the human breast cancer resistance protein ABCG2. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *122*, 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.053>

Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, *6*(10), 789–802. <https://doi.org/10.1038/nrc1977>

Porporato, Paolo E., Payen, V. L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C. J., Danhier, P., Copetti, T., ... Sonveaux, P. (2014). A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Reports*, *8*(3), 754–766. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.043>

Porporato, Paolo Ettore, Filigheddu, N., Pedro, J. M. B. S., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2018). Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Research*, *28*(3), 265–280. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.155>

Pozza, A., Perez-Victoria, J. M., Sardo, A., Ahmed-Belkacem, A., & Di Pietro, A. (2006). Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *63*(16), 1912–1922. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6159-7>

Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, *13*, 1–26. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>

Puchowicz, M. a, Varnes, M. E., Cohen, B. H., Friedman, N. R., Kerr, D. S., & Hoppel, C. L. (2004). Oxidative phosphorylation analysis: assessing the integrated functional activity of human skeletal muscle mitochondria--case studies. *Mitochondrion*, *4*(5–6), 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.004>

- Pullman M. E, Hervey S, P. S. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 3322–3329.
- Purton, J. F., Godfrey, D. I., Bouillet, P., Pellegrini, M., Strasser, A., Puthalakath, H., ... Cory, S. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*, 418(6893), 108–108. <https://doi.org/10.1038/nature00885>
- Putman, M., Van veen, H., & Konings, W. N. (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(4), 672–693.
- Rabindran, S. K., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, K. I., Annable, T., & Greenberger, L. M. (1998). Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Research*, 58(24), 5850–5858.
- Rabinovich, S., Adler, L., Yizhak, K., Sarver, A., Silberman, A., Agron, S., ... Erez, A. (2015). Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis. *Nature*, 527(7578), 379–383. <https://doi.org/10.1038/nature15529>
- Ratnikov, B. I., Scott, D. A., Osterman, A. L., Smith, J. W., & Ronai, Z. A. (2017). Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene*, 36(2), 147–157. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.198>
- Ravna, A. W., Sylte, I., & Sager, G. (2009). Binding site of ABC transporter homology models confirmed by ABCB1 crystal structure. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-6-20>
- Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A., & Cvitkovic, E. (2014). Oxaliplatin : A review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology*, (March). <https://doi.org/10.1023/A>
- Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J. M., & Chaney, S. G. (1998). Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Seminars in Oncology*, 25(2 Suppl 5), 4–12. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/9609103>
- Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M., & Matsuyama, S. (1998). Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366(1–2), 127–137. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714773>

- Remijsen, Q., Goossens, V., Grootjans, S., Van den Haute, C., Vanlangenakker, N., Dondelinger, Y., ... Vandenaabeele, P. (2014). Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *Cell Death & Disease*, 5(1), e1004-8. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.531>
- Robey, R. W., Honjo, Y., Morisaki, K., Nadjem, T. A., Runge, S., Risbood, M., ... Bates, S. E. (2003). Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *British Journal of Cancer*, 89(10), 1971–1978. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601370>
- Robey, Robert W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(7), 452–464. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>
- Robey, Robert W, Polgar, O., Deeken, J., To, K. W., & Bates, S. E. (2007). ABCG2 : determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis*, 1, 39–57. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9042-6>
- Rodriguez, D. A., Weinlich, R., Brown, S., Guy, C., Fitzgerald, P., Dillon, C. P., ... Green, D. R. (2016). Characterization of RIPK3-mediated phosphorylation of the activation loop of MLKL during necroptosis. *Cell Death and Differentiation*, 23(1), 76–88. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.70>
- Rodríguez, Y. A., Gutiérrez, M., Ramírez, D., Alzate-Morales, J., Bernal, C. C., Güiza, F. M., & Romero Bohórquez, A. R. (2016). Novel N-allyl/propargyl tetrahydroquinolines: Synthesis via Three-component Cationic Imino Diels–Alder Reaction, Binding Prediction, and Evaluation as Cholinesterase Inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design*, (March), 498–510. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12773>
- Romero-Garcia, S., Moreno-Altamirano, M. M. B., Prado-Garcia, H., & Sánchez-García, F. J. (2016). Lactate contribution to the tumor microenvironment: Mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. *Frontiers in Immunology*, 7(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00052>
- Roos, K., Wu, C., Damm, W., Reboul, M., Stevenson, J. M., Lu, C., ... Harder, E. D. (2019a).

- OPLS3e : Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15, 1863–1874. research-article.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01026>
- Roos, K., Wu, C., Damm, W., Reboul, M., Stevenson, J. M., Lu, C., ... Harder, E. D. (2019b). OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15, acs.jctc.8b01026. research-article.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01026>
- Rotilio, G., Bray, R. C., & Fielden, E. M. (1972). A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *BBA - Enzymology*, 268(2), 605–609. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(72\)90359-2](https://doi.org/10.1016/0005-2744(72)90359-2)
- Rumsey, W. L., Schlosser, C., Nuutinen, E. M., Robiolio, M., & Wilson, D. F. (1990). Cellular energetics and the oxygen dependence of respiration in cardiac myocytes isolated from adult rat. *Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15392–15399.
- Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*, 14(11), 709–721.
<https://doi.org/10.1038/nrc3803>
- Sadashiva, M. P., Basappa, Nanjundaswamy, S., Li, F., Manu, K. A., Sengottuvelan, M., ... Rangappa, K. S. (2012). Anti-cancer activity of novel dibenzo[b,f]azepine tethered isoxazoline derivatives. *BMC Chemical Biology*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6769-12-5>
- Salaroglio, I. C., Gazzano, E., Kopecka, J., Id, K. C., Costamagna, C., Fruttero, R., ... Riganti, C. (2018). New Tetrahydroisoquinoline Derivatives Overcome Pgp Activity in Brain-Blood Barrier and Glioblastoma Multiforme in Vitro. *Molecules*, 23, 1–18.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061401>
- Saleh, J. (2018). Murine models of melanoma. *Pathology Research and Practice*, 214(9), 1235–1238. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.07.008>
- Satchell, M. A., Lai, Y., Kochanek, P. M., Wisniewski, S. R., Fink, E. L., Siedberg, N. A., ... Clark, R. S. B. (2005). Cytochrome c, a biomarker of apoptosis, is increased in

- cerebrospinal fluid from infants with inflicted brain injury from child abuse. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(7), 919–927.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600088>
- Saxena, N., Ansari, K. M., Kumar, R., Dhawan, A., Dwivedi, P. D., & Das, M. (2009). Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p53 and p21/WAF1 proteins in skin of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.033>
- Schadendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., ... Ugurel, S. (2018). Melanoma. *The Lancet*, 392(10151), 971–984.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
- Schawartz, L., Abolhassani, M., Guais, A., Sanders, E., Steyaert, J.-M., Campion, F., & Israël, M. (2010). A combination of alpha lipoic acid and calcium hydroxycitrate is efficient against mouse cancer models: preliminary results. *Oncology Reports*, 23, 1407–1416.
<https://doi.org/10.3892/or>
- Schrödinger L. PyMol, The PyMOL Molecular Graphics System. n.d. (n.d.).
- Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H., & Ramaekers, F. (1998). Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 86(1), 63–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9894786>
- Schwartz, B. E., Hofer, M. D., Lemieux, M. E., Bauer, D. E., Cameron, M. J., West, N. H., ... French, C. A. (2011). Differentiation of NUT midline carcinoma by epigenomic reprogramming. *Cancer Research*, 71(7), 2686–2696. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3513>
- Schweichel, J.-U., & Merker, H.-J. (1973). The Morphology of Various Types of Cell Death in Prenatal Tissues. *Teratology*, 7, 253–266.
- Scotland, S., Saland, E., Skuli, N., De Toni, F., Boutzen, H., Micklow, E., ... Sarry, J. E. (2013). Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia*, 27(11), 2129–2138.
<https://doi.org/10.1038/leu.2013.107>

- Scott, D. A., Richardson, A. D., Filipp, F. V., Knutzen, C. A., Chiang, G. G., Ronai, Z. A., ... Smith, J. W. (2011). Comparative Metabolic Flux Profiling of Melanoma Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42626–42634. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.282046>
- Sever, O. N., & Demir, O. G. (2017). Autophagy: Cell death or survive mechanism. *Journal of Oncological Sciences*, 3(2), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.07.001>
- Shaala, L. A., Youssef, D. T. A., Sulaiman, M., Behery, F. A., Foudah, A. I., & El Sayed, K. A. (2012). Subereamolline A as a potent breast cancer migration, invasion and proliferation inhibitor and bioactive dibrominated alkaloids from the red sea sponge *Pseudoceratina arabica*. *Marine Drugs*, 10(11), 2492–2508. <https://doi.org/10.3390/md10112492>
- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>
- Shelley, J. C., Cholleti, A., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Timlin, M. R., & Uchimaya, M. (2007). Epik: A software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(12), 681–691. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9133-z>
- Sherman, W., Day, T., Jacobson, M. P., Friesner, R. A., & Farid, R. (2006). Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(2), 534–553. <https://doi.org/10.1021/jm050540c>
- Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M., & Kostrov, S. V. (2016). Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, 7(34). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10150>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Ahmedin, J. (2017). Cáncer Statistics. *Ca Cáncer Journal*, 67(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer Statistics , 2016. *CA Cancer J Clin*, 66(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal*

- for Clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Sies, H., Koch, O. R., Martino, E., & Boveris, A. (1979). Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Letters*, 103(2), 287–290. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81346-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81346-0)
- Singer, T. P. (1974). Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and α -Glycerophosphate Dehydrogenases. In *Methods in Biochemical Analysis* (Vol. 22, pp. 123–173).
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K., ... Chilmonczyk, Z. (2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS ONE*, 11(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155772>
- Smith, R. a J., Hartley, R. C., Cochemé, H. M., & Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(6), 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.010>
- Somlo, M. (1965). Induction des lactico-cytochrome c reductases (d-et l-) de la levure aerobie par les lactates (d- et l-). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 97(2), 183–201. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(65\)90083-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90083-8)
- Sridharan, V., Suryavanshi, P. A., & Menéndez, J. C. (2011). Advances in the Chemistry of Tetrahydroquinolines. *Chemical Reviews*, 111(11), 7157–7259. <https://doi.org/10.1021/cr100307m>
- Staker, B. L., Feese, M. D., Cushman, M., Pommier, Y., Zembower, D., Stewart, L., & Burgin, A. B. (2005). Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(7), 2336–2345. <https://doi.org/10.1021/jm049146p>
- Stine, Z. E. ., Walton, Z. E. ., Altman, B. J. ., Hsieh, A. L. ., & Dang, C. V. (2015). *MYC, Metabolism, and Cancer Zachary*. *Cancer Discovery* (Vol. 5). [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)30284-X](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)30284-X).Epidemiology
- Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U. C., ... Offermanns,

- S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*, *536*(7615), 215–218. <https://doi.org/10.1038/nature19076>
- Suzuki, K., Mizuno, Y., & Yoshida, M. (1990). Inhibition of mitochondrial respiration by 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-like endogenous alkaloids in mouse brain. *Neurochemical Research*, *15*(7), 705–710. <https://doi.org/10.1007/BF00973651>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, *29*(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- Taylor, N. M. I., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, *546*(7659), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature22345>
- Taylor, R. W., Birch-machin, M. A., Bartlett, K., & Turnbull, D. M. (1993). Succinate-cytochrome c reductase : assessment of its value in the investigation of defects of the respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1181*, 261–265.
- Thiry, A., Ledecq, M., Cecchi, A., Dogné, J. M., Wouters, J., Supuran, C. T., & Masereel, B. (2006). Indanesulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. Toward structure-based design of selective inhibitors of the tumor-associated isozyme CA IX. *Journal of Medicinal Chemistry*, *49*(9), 2743–2749. <https://doi.org/10.1021/jm0600287>
- Tiwari, B. K., Pandey, K. B., Abidi, A. B., & Rizvi, S. I. (2013). Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Juornal of Biomarkers*, (1), 449–455. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Tochigi, M., Inoue, T., Suzuki-Karasaki, M., Ochiai, T., Ra, C., & Suzuki-Karasaki, Y. (2013). Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *International Journal of Oncology*, *42*(3), 863–872. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1769>
- Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., Kaiser, A., ... Edlich, F. (2015). Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *The EMBO Journal*, *34*(1), 67–80. <https://doi.org/10.15252/embj.201488806>

- Tracey, E. H., & Vij, A. (2019). Updates in Melanoma. *Dermatologic Clinics*, 37(1), 73–82.
<https://doi.org/10.1016/j.det.2018.08.003>
- Ullah, M. S., Davies, A. J., & Halestrap, A. P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9030–9037.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M511397200>
- Valdameri, G., Genoux-Bastide, E., Peres, B., Gauthier, C., Guitton, J., Terreux, R., ... Di Pietro, A. (2012). Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(2), 966–970.
<https://doi.org/10.1021/jm201404w>
- Valerie S. LeBleu, Joyce T. O’Connell, Karina N. Gonzalez Herrera, Pantel, H. W.-K. K., Damascena, M. C. H. F. M. de C. A., Chinen, L. T. D., ... Kalluri, R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation to promote metastasis. *Nat Cell Biol*, 16(10), 1–32. <https://doi.org/10.1038/ncb3039.PGC-1>
- van Genderen, H. O., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J., & Reutelingsperger, C. P. M. (2008). Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(6), 953–963. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.030>
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Herreweghe, F. Van, & Berghe, T. Vanden. (2010). The Role of the Kinases RIP1 and RIP3 in TNF-Induced Necrosis | Science Signaling. *Sciencesignaling*, 3(115), 1–9. Retrieved from
<http://stke.sciencemag.org/content/3/115/re4%0Ahttp://files/837/re4.html>
- Vander Heiden, M., Cantley, L., & Thompson, C. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
<https://doi.org/10.1126/science.1160809.Understanding>
- Vistica, D. T., Monks, A., Pittman, A., & Boyd, M. R. (1991). Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Research*, 51(10), 2515–2520.

- Voss, D. O., Campello, A. P., & Bacila, M. (1961). The Respiratory Chain and the Oxidative Phosphorylation of Rat Brain Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4(1), 48–51.
- Voss, D. O., Cowles, J. C., & Bacila, M. (1963). A New Oxygen Electrode Model for the Polarographic Assay of Cellular and Mitochondrial Respiration. *Analytical Biochemistry*, 6, 211–222.
- Vurusaner, B., Poli, G., & Basaga, H. (2012). Tumor suppressor genes and ROS: Complex networks of interactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 7–18.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035>
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondrial and cancer. *Nat Rev Cancer*, 12(10), 685–698.
<https://doi.org/10.1038/nrc3365.Mitochondria>
- Wang, P., Henning, S. M., & Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE*, 5(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010202>
- Wang, W., Karamanlidis, G., & Tian, R. (2016). Novel target for mitochondrial medicine. *Science Translational Medicine*, 8(326), 289–313.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac7410>
- Wang, X. F., Wang, S. B., Ohkoshi, E., Wang, L. T., Hamel, E., Qian, K., ... Xie, L. (2013). N-aryl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: A novel class of antitumor agents targeting the colchicine site on tubulin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 67, 196–207.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.041>
- Wang, Z., Liu, D., Nicolas, V., Courilleau, D., Mateo, P., Caubere, C., ... Brenner, C. (2016). A cardiac mitochondrial cAMP signaling pathway regulates calcium accumulation, permeability transition and cell death. *Cell Death and Disease*, 48(7), 829–834.
<https://doi.org/10.1038/pj.2016.37>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309–314.
- Ward, T. H., Cummings, J., Dean, E., Greystoke, A., Hou, J. M., Backen, A., ... Dive, C. (2008). Biomarkers of apoptosis. *British Journal of Cancer*, 99(6), 841–846.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604519>

- Wardihan, Rusdi, M., Alam, G., Lukman, & Manggau, M. A. (2013). Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of *Boehmeria virgata* (Forst) guill leaves to several human cell lines: HeLa, WiDr, T47D and Vero. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, *12*(2), 123–126. <https://doi.org/10.3329/dujps.v12i2.17615>
- Webster, K. A. (2013). Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiol*, *8*(6), 863–884. <https://doi.org/10.2217/fca.12.58>. Mitochondrial
- Weidner, L. D., Zoghbi, S. S., Lu, S., Shukla, S., Ambudkar, S. V., Pike, V. W., ... Hall, M. D. (2015). The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, (September), 384–393.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., ... Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(19), 8788–8793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003428107>
- Weinberg, S. E., & Chandel, N. S. (2015). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemical Biology*, *11*(1), 9–15. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1712>
- Weiseger, R. A., & Fridovich, I. (1973). Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, *248*(10), 3582–3589.
- Wheaton, W. W., Weinberg, S. E., Hamanaka, R. B., Soberanes, S., Sullivan, L. B., Anso, E., ... Chandel, N. S. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *ELife*, *2014*(3), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.02242>
- Wozniak, A., Drewa, G., Wozniak, B., & Schachtschabel, D. O. (2004). Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in selected tissues of mice of different ages, both healthy and melanoma-bearing. *Gerontologie and Geriatrie*, *37*, 184–189. <https://doi.org/10.1007/s00391-004>
- Wu, E. Y., Smith, M. T., Bellomo, G., & Monte, D. Di. (1990). Relationships between the mitochondrial transmembrane potential, ATP concentration, and cytotoxicity in isolated rat

- hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 282(2), 358–362.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90129-M](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90129-M)
- Xu, S., Wang, P., Zhang, H., Gong, G., Gutierrez Cortes, N., Zhu, W., ... Wang, W. (2016). CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic β -AR stimulation. *Nature Communications*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms13189>
- Yang, M., & Vousden, K. H. (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 650–662. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.81>
- Yi, W., Clark, P. M., Mason, D. E., Keenan, M. C., Hill, C., Goddard, W. A., ... Hsieh-Wilson, L. C. (2012). Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6097), 975–980. <https://doi.org/10.1126/science.1222278>
- Yi, Z., Jiang, L., Zhao, L., Zhou, M., Ni, Y., Yang, Y., ... Zhu, Y. (2019). Glutathione peroxidase 3 (GPX3) suppresses the growth of melanoma cells through reactive oxygen species (ROS)-dependent stabilization of hypoxia-inducible factor 1- α and 2- α . *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(11), 19124–19136. <https://doi.org/10.1002/jcb.29240>
- Yivgi-Ohana, N., Eifer, M., Addadi, Y., Neeman, M., & Gross, A. (2011). Utilizing mitochondrial events as biomarkers for imaging apoptosis. *Cell Death and Disease*, 2(6), e166-9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.47>
- Yu, M. (2011). Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sciences*, 89(3–4), 65–71.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.010>
- Yu, X., Deng, Q., Li, W., Xiao, L., Luo, X., Liu, X., ... Cao, Y. (2015). Neoalbacinol induces cell death through necroptosis by regulating RIPK-dependent autocrine TNF α ; and ROS production. *Oncotarget*, 6(4). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3038>
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison Of The CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution And Expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), 337–349.
<https://doi.org/10.3828/rs.2012.10>
- Zhang, Z., Hou, S., Chen, H., Ran, T., Jiang, F., Bian, Y., ... Chen, Y. (2016). Targeting

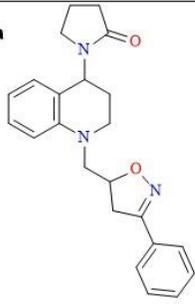
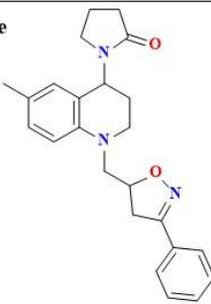
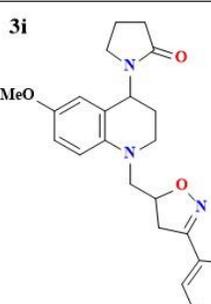
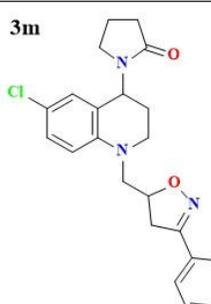
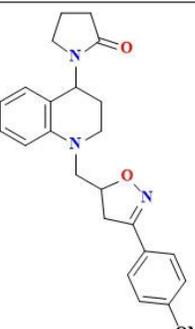
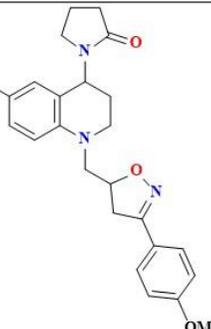
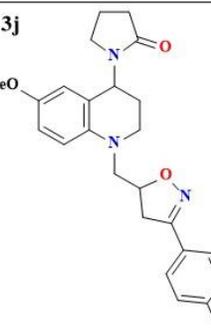
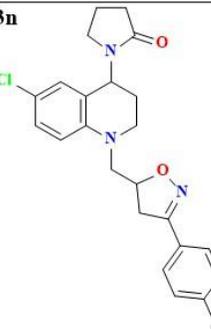
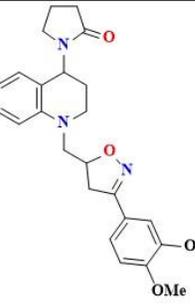
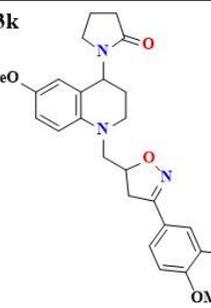
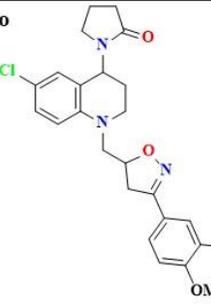
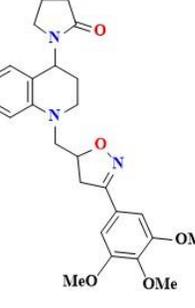
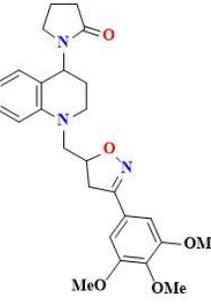
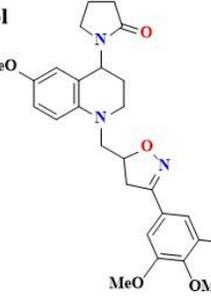
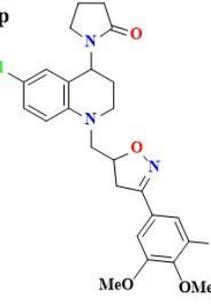
epigenetic reader and eraser: Rational design, synthesis and in vitro evaluation of dimethylisoxazoles derivatives as BRD4/HDAC dual inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(12), 2931–2935. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.034>

Zhou, B., Liu, J., Kang, R., Klionsky, D. J., Kroemer, G., & Tang, D. (2019). Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death. *Seminars in Cancer Biology*, (January), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.03.002>

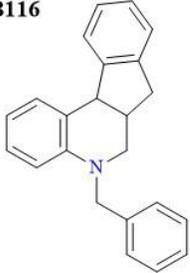
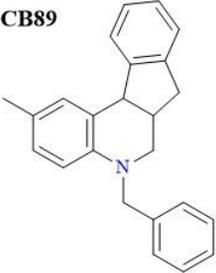
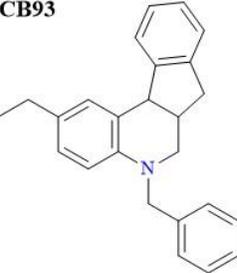
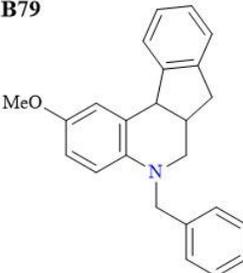
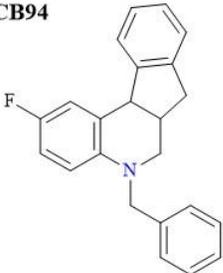
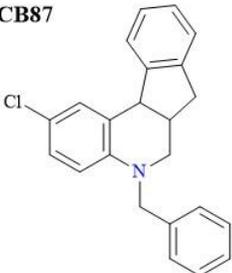
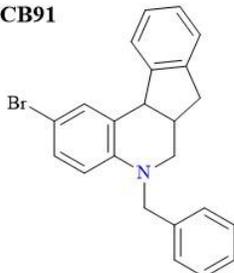
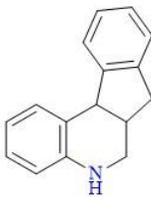
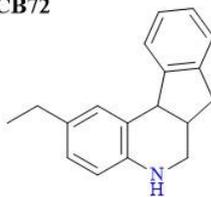
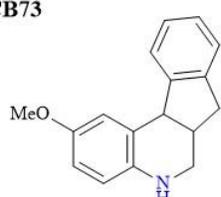
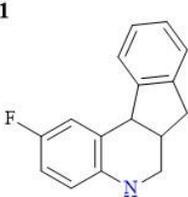
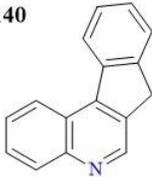
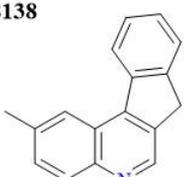
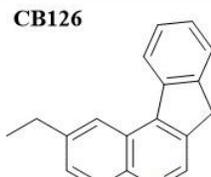
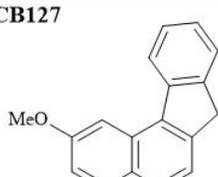
Zhou, M., Li, Y., Hu, Q., Bai, X. C., Huang, W., Yan, C., ... Shi, Y. (2015). Atomic structure of the apoptosome: Mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes and Development*, 29(22), 2349–2361. <https://doi.org/10.1101/gad.272278.115>

Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, B., Jankauskas, S. S., ... Zorov, D. B. (2017). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>

Apéndice 1

<p>3a</p>  <p>Chemical Formula: $C_{23}H_{25}N_3O_2$ Molecular Weight: 375.47</p>	<p>3e</p>  <p>Chemical Formula: $C_{24}H_{27}N_3O_2$ Molecular Weight: 389.50</p>	<p>3i</p>  <p>Chemical Formula: $C_{24}H_{27}N_3O_3$ Molecular Weight: 405.50</p>	<p>3m</p>  <p>Chemical Formula: $C_{23}H_{24}ClN_3O_2$ Molecular Weight: 409.91</p>
<p>3b</p>  <p>Chemical Formula: $C_{24}H_{27}N_3O_3$ Molecular Weight: 405.50</p>	<p>3f</p>  <p>Chemical Formula: $C_{25}H_{29}N_3O_3$ Molecular Weight: 419.53</p>	<p>3j</p>  <p>Chemical Formula: $C_{25}H_{29}N_3O_4$ Molecular Weight: 435.52</p>	<p>3n</p>  <p>Chemical Formula: $C_{24}H_{26}ClN_3O_3$ Molecular Weight: 439.94</p>
<p>3c</p>  <p>Chemical Formula: $C_{25}H_{29}N_3O_4$ Molecular Weight: 435.52</p>	<p>3g</p>  <p>Chemical Formula: $C_{26}H_{31}N_3O_4$ Molecular Weight: 449.55</p>	<p>3k</p>  <p>Chemical Formula: $C_{26}H_{31}N_3O_5$ Molecular Weight: 465.55</p>	<p>3o</p>  <p>Chemical Formula: $C_{25}H_{30}ClN_3O_4$ Molecular Weight: 469.97</p>
<p>3d</p>  <p>Chemical Formula: $C_{26}H_{31}N_3O_5$ Molecular Weight: 465.55</p>	<p>3h</p>  <p>Chemical Formula: $C_{27}H_{33}N_3O_5$ Molecular Weight: 479.58</p>	<p>3l</p>  <p>Chemical Formula: $C_{27}H_{33}N_3O_6$ Molecular Weight: 495.58</p>	<p>3p</p>  <p>Chemical Formula: $C_{26}H_{30}ClN_3O_5$ Molecular Weight: 499.99</p>

Apéndice 2

<p>CB116</p>  <p>Chemical Formula: C₂₃H₂₁N Molecular Weight: 311.43</p>	<p>CB89</p>  <p>Chemical Formula: C₂₄H₂₃N Molecular Weight: 325.46</p>	<p>CB93</p>  <p>Chemical Formula: C₂₅H₂₅N Molecular Weight: 339.48</p>	<p>CB79</p>  <p>Chemical Formula: C₂₄H₂₃NO Molecular Weight: 341.45</p>
<p>CB94</p>  <p>Chemical Formula: C₂₃H₂₀FN Molecular Weight: 329.42</p>	<p>CB87</p>  <p>Chemical Formula: C₂₃H₂₀ClN Molecular Weight: 345.87</p>	<p>CB91</p>  <p>Chemical Formula: C₂₃H₂₀BrN Molecular Weight: 390.32</p>	<p>CB70</p>  <p>Chemical Formula: C₁₆H₁₅N Molecular Weight: 221.30</p>
<p>CB122</p>  <p>Chemical Formula: C₁₇H₁₇N Molecular Weight: 235.33</p>	<p>CB72</p>  <p>Chemical Formula: C₁₈H₁₉N Molecular Weight: 249.36</p>	<p>CB73</p>  <p>Chemical Formula: C₁₇H₁₇NO Molecular Weight: 251.33</p>	<p>CB71</p>  <p>Chemical Formula: C₁₆H₁₄FN Molecular Weight: 239.29</p>
<p>CB140</p>  <p>Chemical Formula: C₁₆H₁₁N Molecular Weight: 217.27</p>	<p>CB138</p>  <p>Chemical Formula: C₁₇H₁₃N Molecular Weight: 231.30</p>	<p>CB126</p>  <p>Chemical Formula: C₁₈H₁₅N Molecular Weight: 245.33</p>	<p>CB127</p>  <p>Chemical Formula: C₁₇H₁₃NO Molecular Weight: 247.30</p>