

Estudio de los cambios metabólicos en la línea celular hep-g2, cáncer hepático, durante la interacción con el compuesto híbrido (*r/s*) 1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il) metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il) pirrolidin-2-ona (FM50).

Jose Leonardo Guerrero Niño

Trabajo de Grado para Optar el título de Químico

Director

WILLIAM FERNANDO HIDALGO BUCHELLI

Químico, M.Sc. PhD

Codirector

STELIA CAROLINA MÉNDEZ

Doctora en Ciencias-Bioquímicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

Este logro se lo quiero dedicar a tres 3 mujeres (mi madre le agradezco por todo el apoyo y su cariño, mi tía Libia por todo el apoyo que me brindo y en especial a mi nonita Elvira que aunque en estos momento no se encuentre con nosotros, fue un gran apoyo en mi vida) que gracias a ellas pude culminar este nuevo logro en mi vida, por eso este logro se lo debo a estas tres mujeres que fueron mi pilar en todo este transcurso de formación profesional.

Agradecimientos

Le agradezco en especial a mis dos mentores la profesora Stelia y el profesor William por todo lo que me enseñaron durante este proceso de formación. Agradezco a mi familia por todo el apoyo brindado, agradezco al laboratorio de cromatografía (CENIVAM) en especial a la doctora Elena Stashenko por colaborarnos con el análisis de las muestras, a los de más laboratorios y personas que nos colaboraron para el desarrollo de este trabajo experimental.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	22
1. Objetivos.....	26
1.1 Objetivo General.....	26
1.2 Objetivos Específicos	26
2. Cuerpo del trabajo	27
2.1 Marco Referencial	27
2.1.1 Epidemiología.....	27
2.1.2 Factores de riesgo de CHC	28
2.1.3 Desbalance metabólico y su relación con cáncer	32
2.1.4 Tratamientos terapéuticos utilizados para el CHC	42
2.1.5 Tetrahydroquinolinas y su potencial biológico	47
2.1.6 Isoxazoles	49
2.1.7 Metabolómica	51
2.2 Metodología.....	56
2.2.1 Cultivo celular	57
2.2.2 Preparación de la muestra.....	57
2.2.3 Derivatización de los extractos metabólicos	58
2.2.4 Análisis GC-MS	59
2.2.5 Procesamiento y análisis estadístico de datos obtenidos por GC-MS	59

2.2.6 Análisis UHPLC-Orbitrap-MS	61
2.2.7 Procesamiento y análisis estadístico de datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS.....	63
2.3 Resultados y discusión.....	63
2.3.1 Análisis de los extractos metabólicos usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), después de la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 12 horas.....	64
2.3.2 Análisis de los extractos metabólicos usando cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-Orbitrap-MS), después de la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 12 horas.	73
2.3.3 Análisis de rutas metabólicas afectadas en la línea celular HepG2 por la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 12 horas.	80
2.3.4 Análisis de los extractos metabólicos usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), después de la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 24 horas.....	86
2.3.5 Análisis de los extractos metabólicos usando cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a masas (UHPLC-ORBITRAP-MS), después de la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 24 horas.....	92
2.3.6 Análisis rutas metabólicas afectadas después de 24 horas de exposición al compuesto FM50	97
2.3.7 Análisis de componentes principales para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS para 12 y 24 horas de tratamiento, tanto en modo ion positivo y negativo.....	103
2.3.8 Análisis rutas metabólicas afectas después de 12 y 24 horas de exposición al compuesto FM50	104

3. Conclusiones.....	106
4. Recomendaciones	108
Referencias bibliográficas	109
Apéndices	121

Lista de Tablas

	Pág.
<i>Tabla 1. Metabolitos tentativamente identificados con la base de datos NIST MS.</i>	67
<i>Tabla 2. Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 12h.</i>	70
<i>Tabla 3. Análisis comparativo de los iones de fragmentación para los espectros teóricos y experimentales</i>	71
<i>Tabla 4. Análisis estadístico univariado T-test del grupo control con respecto al grupo tratamiento 12 horas</i>	71
<i>Tabla 5. Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 12h</i>	76
<i>Tabla 6. Análisis estadístico univariado T-test del grupo control con respecto al grupo tratamiento 12 horas</i>	78
<i>Tabla 7. Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 12h.</i>	80
<i>Tabla 8. Metabolitos tentativamente identificados en el tratamiento de 24 horas, con la base de datos NIST MS</i>	87
<i>Tabla 9. Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 24h.</i>	90
<i>Tabla 10. Análisis comparativo de los iones de fragmentación para los espectros teóricos y experimentales</i>	91
<i>Tabla 11. Análisis estadístico univariado T-test del grupo control con respecto al grupo tratamiento 24h.....</i>	91

<i>Tabla 12. Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 24h</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 13. Análisis estadístico univariado T-test del grupo control con respecto al grupo tratamiento 12 horas</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 14. Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 24h</i>	<i>97</i>

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Factores involucrados en el desarrollo del CHC. Fuente: (Aravalli & Steer, 2014) ...	28
<i>Figura 2.</i> Mecanismos del CHC relacionado con el VHB. Fuente: (Vildózola & Salinas, 2009)	30
<i>Figura 3.</i> Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B ₁	32
<i>Figura 4.</i> Efectos metabólicos de algunos oncogenes y genes supresores de tumor. En el esquema se puede observar como algunos oncogenes (AKT, MYC y HIF) y genes supresores de tumores (p53) afectan el metabolismo celular, al ser activados o reprimidos. Las flechas (→) indican activación y las barras (–) inhibición. Fuente: (Coller, 2014).....	36
<i>Figura 5.</i> Esquema general del metabolismo de glucosa en células normales y células cancerígenas. Fuente: (Lu et al., 2015).....	38
<i>Figura 6.</i> Metabolismo de L-serina y L-glicina en las células cancerígenas. Fuente: (Amelio et al., 2014).....	41
<i>Figura 7.</i> Tratamientos para CHC según su etapa. Fuente:(Brian I. Carr, 2012).....	43
<i>Figura 8.</i> Esquema explicativo para los diferentes Tratamientos para CHC.....	44
<i>Figura 9.</i> Estructura química de los compuestos usados para el tratamiento de CHC.....	45
<i>Figura 10.</i> Tetrahydroquinolinas con actividad anticancerígena. Fuente: (Sridharan et al., 2011)	49
<i>Figura 11.</i> Isoxazoles con actividad anticancerígena. Fuente: (Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017).....	50

<i>Figura</i> 12. Estructura química del derivado de acridona, hidrocloreuro de 2-aminoacetamido-10-(3,5-dimetoxi)-bencil-9(10 <i>H</i>)-acridona (8a)	52
<i>Figura</i> 13. Estructura del flexibilide. Fuente: (D. Gao et al., 2016)	53
<i>Figura</i> 14. Estructura molecular del hexabromociclododecano (HBCD) fuente: Autor	55
<i>Figura</i> 15. Estructura química del (-)-5-hidroxi-equol fuente:(L. Gao et al., 2018).....	56
<i>Figura</i> 16. Estructura química del compuesto (<i>R/S</i>) 1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il) metil)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il) pirrolidin-2-ona (FM50).....	58
<i>Figura</i> 17. Ensayo de viabilidad en la línea celular HepG2, usando diferentes concentraciones del compuesto híbrido FM50 (3j).....	64
<i>Figura</i> 18. a) Perfil metabólico obtenido por GC-MS para muestra control de la línea celular HepG2, b) espectro de masas experimental y c) espectro de masas de referencia para el metabolito identificado como ácido L-glutámico (tR=23.3810 min, score de similitud 96.01%).	66
<i>Figura</i> 19. Alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento 12 horas, mediante el uso del software libre XCMS.....	68
<i>Figura</i> 20. Análisis de Componente Principales (PCA, score plot) de los resultados obtenidos por GC-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde).....	69
<i>Figura</i> 21. Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento 12 horas para los datos obtenidos por UPLC-Orbitrap-MS .A) modo de ionización positivo y B) modo de ionización negativo.	74
<i>Figura</i> 22. Análisis de componente principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en modo de ionización. A) modo positivo, B) modo negativo.....	75

- Figura 23.* Rutas metabólicas posiblemente alteradas en la línea celular HepG2 durante la exposición al compuesto FM50. 85
- Figura 24.* Diagramas box-plot de los metabolitos que presentaron valor p menor a 0,05, donde las barras verdes pertenecen al tratamiento y las rojas al control..... 86
- Figura 25.* a) Perfil metabólico obtenido por GC-MS para muestra control de la línea celular HepG2, b) espectro de masas experimental y c) espectro de masas de referencia para el metabolito identificado como ácido palmítico ($t_R=30.3270$ min, score de similitud 97.80%)...... 87
- Figura 26.* Alineamiento y deconvolución de los cromatogramas y espectros del grupo control y grupo tratamiento 24 horas, mediante el uso del software libre XCMS..... 89
- Figura 27.* Análisis de componentes principales (PCA) de los obtenidos por GC-MS después de exposición al compuesto FM50 por un periodo de 24 horas de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde)...... 90
- Figura 28.* Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento 12 horas. Para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS .A) modo de ionización positivo y B) modo de ionización negativo. 93
- Figura 29.* Análisis de componente principales (PCA) de los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en modo de ionización. A) modo positivo, B) modo negativo..... 94
- Figura 30.*** Rutas metabólicas posiblemente alteradas en la línea celular HepG2 durante la exposición al compuesto FM50..... 102
- Figura 31.* Gráfico de barrar del compuesto que presentaron valor p menor a 0,05, donde las barras verdes pertenecen al tratamiento y las rojas al control. 102

Figura 32. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. a) 12 horas modo ion negativo, b) 12 horas modo ion positivo, c) 24 horas modo ion positivo y d) 24 horas modo ion negativo. 104

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndices A. Espectros de masas para la glicina obtenida en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	121
Apéndices B. Espectros de masas para el ácido láctico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	121
Apéndices C. Espectros de masas para el ácido glicólico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	122
Apéndices D. Espectros de masas para el glicerol obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	122
Apéndices E. Espectros de masas para el manitol obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en negro es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	123
Apéndices F. Espectros de masas para el L-asparagina obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en negro es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	124
Apéndices G. Espectros de masas para el ácido l-glutámico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	124
Apéndices H. Espectros de masas para el ácido cítrico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	124

Apéndices I. Espectros de masas para la glucosa obtenida en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en negro es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	125
Apéndices J. Espectros de masas para el ácido palmítico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	125
Apéndices K. Espectros de masas para el Myo-inositol obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	126
Apéndices L. Espectros de masas para el ácido esteárico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	126
Apéndices M. Espectros de masas para el ácido láctico obtenido en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	127
Apéndices N. Espectros de masas para la glicina obtenida en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	127
Apéndices O. Espectros de masas para el ácido oxálico obtenido en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	128
Apéndices P. Espectros de masas para el glicerol obtenido en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.	128

Apéndices Q. Espectros de masas para el ácido palmítico obtenido en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.

..... 129

Abreviaturas

CHC: Carcinoma hepatocelular

OMS: Organización Mundial de la Salud

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

RB: Retinoblastoma

AFB1: Aflatoxina B1

ADN: Ácido desorribonucleico

AS: Argininosuccinato sintetasa

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

PCA: Análisis de componentes principales

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas

UHPLC-Orbitrap-MS: Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a espectroscopia de masas

Glosario

Porfirias: La porfiria es un grupo de enfermedades ocasionadas por la acumulación excesiva de porfirina, una proteína que ayuda a la hemoglobina a transportar el oxígeno en la sangre.

Virus ADN hepatotrófico: Virus que causa la hepatitis B

Esteatosis: Acumulación excesiva de grasa en el hígado

Lipogénesis: es la reacción bioquímica por la cual son sintetizados los ácidos grasos de cadena larga esterificados (unidos con el glicerol) para formar triglicéridos o grasas de reserva.

Células T: Tipo de glóbulo blanco. Las células T son parte del sistema inmunitario y se forman a partir de células madre en la médula ósea. Ayudan a proteger el cuerpo de las infecciones y podrían ayudar a combatir el cáncer. También se llama linfocito T y timocito.

Oncogén: Protooncogén es el gen que participa en el crecimiento normal de las células. Las mutaciones (cambios) en un protooncogén pueden hacer que este se convierta en un oncogén, los oncogenes son genes que participan en el crecimiento de las células normales pero cuando este sufre algún tipo de mutación (cambio). Los oncogenes pueden hacer crecer las células cancerosas. Las mutaciones de los genes que se convierten en oncogenes pueden ser heredadas o pueden resultar de la exposición a sustancias del ambiente que causan cáncer.

Angiogénesis: Formación de vasos sanguíneos. La angiogénesis tumoral es el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos que los tumores necesitan para crecer. Esto ocurre porque el tumor y las células huésped descargan sustancias químicas cerca del tumor.

Metástasis: Diseminación del cáncer de una parte del cuerpo en donde se formó originalmente a otra parte del cuerpo. Cuando ocurre una metástasis, las células cancerosas se separan del tumor original (primario), viajan a través del sistema sanguíneo o linfático y forman un tumor nuevo en otros órganos o tejidos del cuerpo. El nuevo tumor metastásico es el mismo tipo de cáncer que el

tumor primario. Por ejemplo, si el cáncer de mama se disemina al pulmón, las células cancerosas del pulmón son células del cáncer de mama, no son células de cáncer de pulmón. Las formas plural y singular de la palabra metástasis son iguales.

RESUMEN ESPAÑOL

TÍTULO: Estudio de los cambios metabólicos en la línea celular Hep-G2, cáncer hepático, durante la interacción con el compuesto híbrido (*r/s*) 1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il) metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il) pirrolidin-2-ona (FM50).

AUTOR: JOSE LEONARDO GUERRERO NIÑO **

PALABRA CLAVE: Células cancerígenas, Hepatocarcinoma celular (CHC), Metabolómica.

DESCRIPCIÓN:

El carcinoma hepático, ocupa el segundo puesto en mortalidad en todo el mundo. Debido a este alto indicador, en la actualidad, la búsqueda de nuevas estrategias biológicas y/o químicas que sean más efectivas y selectivas contra células cancerígenas, se ha convertido en uno de los grandes desafíos que afronta la ciencia actual. Previos estudios de actividad biológica evaluados para el compuesto híbrido tetrahydroquinolina-isoxazol (FM50) han reportado un alto potencial anticancerígeno contra la línea celular HepG2 y además, una baja actividad citotóxica. Por lo tanto, con el objetivo de profundizar sobre los mecanismos bioquímicos por los cuales este compuesto químico ejerce su actividad biológica, un estudio metabolómico basado en análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas de alta resolución UHPLC-Orbitrap-MS fueron realizados. Se identificaron tentativamente trece (13) metabolitos como los responsables de los cambios metabólicos ocurridos en las células tumorales HepG2 durante la exposición al compuesto FM50, en los dos periodos de tiempo evaluados (12 y 24 horas). El desbalance energético celular al igual que una disminución en la activación de las rutas bioquímicas de proliferación celular fueron encontrados por ser las principales vías alteradas durante el tratamiento con FM50, evidenciando los posibles mecanismos de acción del compuesto sintético a través de la alteración del metabolismo de la glucosa, aminoácidos y la oxidación de lípidos a nivel celular. Los resultados aquí reportados resaltan el potencial biológico del compuesto FM50 como posible candidato terapéutico en tratamiento contra el cáncer hepático. No obstante, futuras investigaciones deben ser dirigidas a fin de determinar la especificidad y selectividad del compuesto objeto de investigación.

RESUMEN INGLÉS

TITLE: Study of the metabolic changes in the Hep-G2 cell line, hepatic cancer, during the interaction with the hybrid compound (*R/S*) 1- (6-chloro-1 - ((3-phenylisoxazol-5-yl) methyl) - 1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-yl) pyrrolidin-2-one (FM50).

AUTHOR: JOSE LEONARDO GUERRERO NIÑO **

KEYWORDS: Cancer cells, hepatocellular carcinoma (CHC), Metabolomic.

DESCRIPTION:

The hepatic carcinoma, it take over the fourth place in mortality worldwide. Due this high indicator, nowadays, the search of new biological strategies or chemistry that will be more effective and selective against carcinogenic cells, it has become one of the great challenges facing current science. Previous studies about biological activity evaluated for the hybrid compound tetrahydroquinoline-isoxazole (FM50) have reported a high anticancer potential against the cell line Hep-G2 and besides, low cytotoxicity activity. Therefore, with the aim of deepening on the biochemical mechanisms by which this compound perform its biological activity, a metabolomic study based on analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS) were performed. Thirteen (13) metabolites were putatively identified as responsible for the metabolic changes that occurred in the HepG2 tumor cells during exposure to the compound FM50, in the two time periods evaluated (12 and 24 hours). The cellular energy imbalance as well as a decrease in the activation of the biochemical pathways of cell proliferation were found to be the main pathways altered during the treatment with FM50, evidencing the possible mechanisms of action of the synthetic compound through the alteration of the metabolism of D-glucose, amino acids and lipid oxidation at the cellular level. The results reported here highlight the biological potential of the compound FM50 as a possible therapeutic candidate in treatment against hepatic cancer. However, future investigations should be conducted in order to determine the specificity and selectivity of the compound under investigation.

Introducción

El cáncer es una afección que presenta la mayoría de sus síntomas cuando este se encuentra en etapas avanzadas, siendo actualmente una de las principales causas de muerte en el mundo. Según datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2018 se reportaron 18.078.957 casos de personas que padecían algún tipo de cáncer a nivel mundial y, una cifra de mortalidad de 9.555.027, respecto a todos los casos de cáncer reportados; de estos, la incidencia en cáncer de pulmón ocupó el primer lugar (11,6%), seguido por el cáncer de mama (11,6%), cáncer de colon (10,2%), próstata (7,1%), estomago (5,7%), hígado (4,7%) y un 50,1% en otros tipos de cáncer. El carcinoma hepático, objeto de estudio de la presente investigación, ocupa el cuarto puesto en mortalidad en todo el mundo; La incidencia de cáncer hepático a nivel mundial es 841.080 y mortalidad de 781.631 según estadísticas reportadas para el año 2018 por la OMS (Bray et al., 2018). Para el año 2018 se reportaron 2.279 casos en Colombia con una mortalidad de 2.216 casos según estadísticas de la OMS (J et al., 2018). En el departamento de Santander, la incidencia de cáncer hepático fue de 57 casos anuales para los años comprendidos entre el 2007-2011 y la mortalidad fue 80 casos de muerte reportadas anualmente, según estadísticas publicadas por el Instituto Nacional de Cancerología (Pardo & Cendales, 2015).

En general, los métodos más usados como tratamiento para el cáncer son terapia quirúrgica, terapia percutánea y locorregional y, terapia sistemática. No obstante, en la actualidad, las investigaciones se han enfocado en el estudio de las terapias sistemáticas, entre las que se encuentran la quimioterapia citotóxica, terapia hormonal, terapia genética y viral, inmunoterapia y terapia molecular dirigida (Sandhu, Tharayil, Lai, & Roberts, 2008). La terapia quirúrgica y

percutánea son usadas en pacientes a los cuales se les ha detectado el cáncer en etapas cuyo tamaño del tumor y área superficial afectada es menor a 2 cm, en estos casos, estos tratamientos son efectivos. El efecto secundario de mayor preocupación que puede tener la aplicación de tales tratamientos se relaciona principalmente con la recurrencia de dicha enfermedad por la no eliminación total de las células afectadas (Blum, 2005). En el caso de la terapia sistemática, más específicamente en la quimioterapia, este tratamiento es usado cuando el tumor ya se ha extendido a otros órganos (metástasis) por cuanto estos agentes quimioterapéuticos han demostrado un efecto significativo en la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, una de las grandes desventajas de estos agentes, es que no afecta únicamente la viabilidad proliferativa de las células cancerígenas, sino también se ven afectadas las células sanas, pues estos fármacos no diferencian entre células sanas y afectadas (baja selectividad) (Masaki, Morishita, Kurokohchi, & Kuriyama, 2006).

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo para el cáncer hepático; los fármacos utilizados con mayor efecto en ese tipo de cáncer son doxorubicina (Adriamicina), 5-fluorouracilo y cisplatino. Sin embargo, estos medicamentos se limitan a una pequeña serie de tumores, y los efectos de estos compuestos a menudo no duran mucho tiempo. Con el fin de buscar nuevas moléculas con potencial actividad anticancerígena y que además, puedan ser aplicadas para el tratamiento del cáncer hepático, el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) junto con el grupo de investigación de Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) dirigieron la síntesis y evaluación del compuesto (*R/S*) 1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il)metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona (FM50), un híbrido tipo tetrahydroquinolina-isoxazol. Previos estudios (en proceso de publicación) realizados por el Grupo de Investigación GIBIM y el cual se encuentra adscrito a la Escuela de Química de la

Universidad Industrial de Santander, mostraron que el compuesto híbrido FM50 (figura 16) induce en la línea celular HepG2 (células de cáncer hepático) muerte celular por apoptosis y, además, la toxicidad de este compuesto no afecta las células sanas, posicionando esta molécula sintética como candidata para futuras investigaciones. Con base en lo anterior, se planteó la necesidad de explorar y/o estudiar las rutas metabólicas afectadas en la línea celular Hep-G2 (células de cáncer hepático) durante la interacción con esta molécula orgánica, objeto de estudio de la presente tesis de grado. Para ello, un estudio metabolómico basado en métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas fueron aplicados para intentar elucidar los posibles mecanismos de acción por los cuales el compuesto FM50 ejerce su actividad antitumoral sobre la línea celular HepG2, cáncer hepático.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Identificar los cambios metabólicos generados en la línea celular HEPG2 por efecto de la interacción con el compuesto híbrido FM50.

1.2 Objetivos Específicos

- ❖ Analizar el perfil metabólico del cultivo celular HEPG2 durante la interacción con el compuesto híbrido FM50.
- ❖ Identificar y cuantificar los metabolitos diferencialmente expresados y/o inhibidos.
- ❖ Proponer las posibles rutas metabólicas afectadas por el tratamiento con el compuesto híbrido FM50.

2. Cuerpo del Trabajo

2.1 Marco Referencial

Cáncer de hígado: Carcinoma hepatocelular (CHC)

2.1.1 Epidemiología. El carcinoma hepatocelular es uno de los tumores malignos más comunes en el mundo; en la mayor parte del mundo, la incidencia de CHC en hombres es de dos a cuatro veces mayor que las incidencias presentadas en las mujeres (Mcglynn, 2005). El CHC ocupa el cuarto puesto en mortalidad a nivel mundial, pues para el año 2018 se reportaron 841.080 nuevos casos, de este total, 596.574 se reportaron en hombres (la incidencia de este cáncer fue 6,3 %) y 244.506 reportados para mujeres (la incidencia de este cáncer fue 2,8%) (Bray et al., 2018). En Colombia, la incidencia de cáncer hepático para hombres es de 1.195 casos y mortalidad de 1.156 casos reportados y para mujeres es de 1.084 y mortalidad de 1.060 (estadísticas tomadas de la OMS para el año 2018) (J et al., 2018). En los continentes donde más se reportaron casos de incidencia por este cáncer fue el Sudeste Asiático, el sur de Europa y Norte América con 31,9, 9,5 y 9,3 casos reportados por cada 100.000 habitantes, respectivamente (Ferlay et al., 2015).

2.1.2 Factores de riesgo de CHC. Entre un 70% y 90% de los casos reportados de CHC están asociados a cirrosis y enfermedades crónicas del hígado. Las causas más comunes de cirrosis en pacientes con CHC incluyen hepatitis B, hepatitis C, enfermedades hepáticas alcohólicas y posiblemente esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Las causas menos comunes incluyen hemocromatosis hereditaria, deficiencia de la α -1 antitripsina, hepatitis autoinmune y algunas porfirias (Serag & Rudolph, 2017). En la figura 1 se relacionan los principales factores etiológicos asociados a CHC, los cuales se describirán en mayor detalle a continuación.

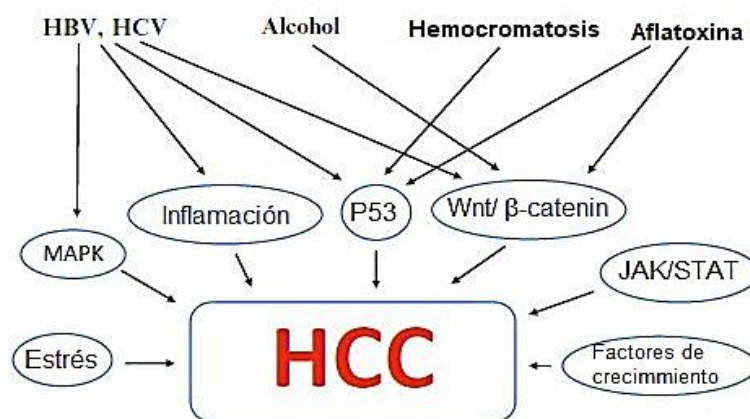


Figura 1. Factores involucrados en el desarrollo del CHC. Fuente: (Aravalli & Steer, 2014)

2.1.2.1 Cirrosis. La cirrosis es el estado final de las enfermedades crónicas del hígado. Esta enfermedad se caracteriza por una alteración en la forma del hígado, ya que se forman nódulos anormales de células hepáticas rodeadas de fibrosis. De acuerdo a Hiroaki Okuda (Okuda, 2007), la cirrosis se clasifica en: micronodular, macronodular y macronodular mixta; la hepatitis crónica viral produce cirrosis macronodular mixta y la cirrosis causada por el alcohol produce cirrosis micronodular.

La mayoría de las personas que presentaban esta enfermedad morían por insuficiencia hepática o hemorragia digestiva, pero estas cifras han disminuido y en la actualidad las personas mueren por consecuencia del desarrollo de carcinoma hepatocelular. Como se mencionó previamente la cirrosis puede llevar a CHC, pero esto depende del grado de fibrosis presente en el hígado (Abou-Alfa, 2006).

2.1.2.2 Hepatitis B (VHB). La hepatitis B es una enfermedad ocasionada por el virus de la hepatitis B (VHB), el cual es un virus de la familia Hepadnaviridae (virus ADN hepatotrófico). En las áreas de alta incidencia, esta enfermedad se transfiere en un 90% de madres infectadas a los hijos y en los países con menor incidencia se presenta en jóvenes y adultos, mediante actividades sexuales o por el uso de jeringas infectadas al momento de inyectarse drogas intravenosas (Kew, 2013).

Este virus es la cuarta causa de muerte en el mundo por enfermedades infecciosas. El sistema inmunológico de estos pacientes atacan el virus de la hepatitis B mediante la inducción de apoptosis y necrosis de los hepatocitos infectados (Vildózola & Salinas, 2009). La infección crónica por hepatitis B puede terminar en CHC; en la figura 2 se muestra el progreso de este virus para llegar hasta CHC. El VHB puede llevar a la carcinogénesis en forma directa o indirecta; el mecanismo directo ocurre cuando el ADN del virus es integrado en el genoma del huésped ocasionando mutaciones e inestabilidad cromosómica, mientras que el efecto indirecto ocurre cuando el sistema inmunológico actúa sobre las células infectadas; a causa de la necrosis y apoptosis ocasionada por el sistema inmunológico ocurre inflamación crónica, estrés oxidativo,

esto dando lugar a lesiones hepáticas crónicas, fibrosis, cirrosis y finalmente al inicio y progresión del tumor (Xu, Yu, & Wong, 2017).

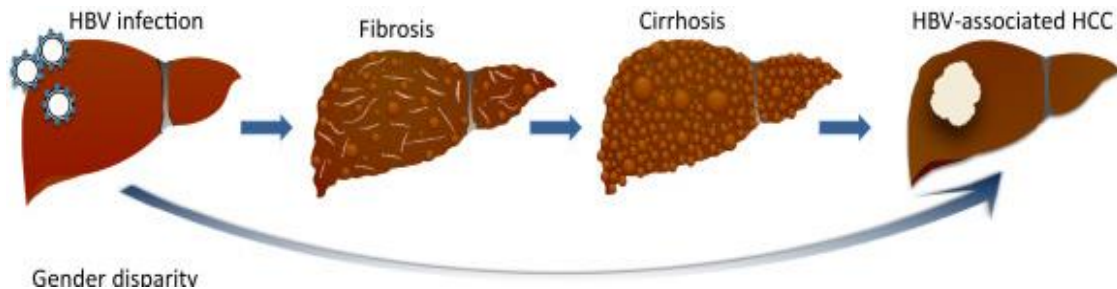


Figura 2. Mecanismos del CHC relacionado con el VHB. Fuente: (Vildózola & Salinas, 2009)

2.1.2.3 Hepatitis C (VHC). El virus de la hepatitis C es un importante factor de riesgo para las enfermedades crónicas de hígado y para el aumento de la incidencia de carcinoma hepatocelular en la mayoría de los países occidentales, en donde aproximadamente el 3% de la población es infectada con este virus (Vescovo et al., 2016). El VHC puede llevar a la carcinogénesis en dos formas, directa e indirecta. En la primera, actúan las proteínas virales del VHC, las cuales inhiben las proteínas del retinoblastoma (Rb) y el supresor de tumores p53. La inhibición de la proteína Rb afecta varios puntos de control en el ciclo celular implicados en el recambio celular y la reparación de ADN, como consecuencia de esto se producirá un crecimiento descontrolado de células mutadas; la proteína p53 también contribuye en la vigilancia y corrección del genoma durante la replicación celular, siendo esta el segundo supresor tumoral más abundante en el hígado. La forma indirecta de este virus, puede llevar al desarrollo de CHC mediante el aumento del daño oxidativo, aumentando la esteatosis, la lipogénesis y el mal ensamblaje de proteínas en el retículo endoplasmático (Tholey & Ahn, 2015).

2.1.2.4 Aflatoxina AFB1. La aflatoxina B1 (AFB1), producida por algunos hongos del género *Aspergillus*, está entre los más potentes carcinógenos conocidos, estas sustancias se pueden encontrar en algunos cereales. Esta molécula presenta dos conformaciones, una Endo y otra Exo, siendo la forma Endo la que posee más poder mutagénico; esta molécula puede conducir al desarrollo de CHC debido a la alta mutagenicidad causada por la conversión de AFB1 en el metabolito electrofílico AFB1-8,9-epóxido, cuyo cambio estructural es producido por las enzimas CYP3A4 y CYP1A2 que intervienen en la formación del Endo-epóxido y Exo-epóxido respectivamente (como se observa en la figura 3). Esta molécula ejerce su efecto tóxico a través de la unión covalente con el nitrógeno N7 de los residuos guanil del ADN (o RNA) mediante la inducción de depuración y escisión de la hebra, lo que puede inducir mutaciones en células somáticas. La formación de estos ligandos se lleva a cabo en regiones abundantes de guanina en el ADN. Con la transversión de guanina a timina; que ocurre en el codón 249 del gen p53 (este gen está implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del ADN), al no ser reparado este daño, esta misma proteína induce apoptosis. Después de la formación de la AFB1-epóxido, pueden formarse dihidrodioles (8,9-dihidro-8,9-dihidroxi-aflatoxina B1) metabolito derivado de la AFB1 que se unen a proteínas celulares mediante la formación de bases de Schiff induciendo daño celular y eventualmente muerte celular. La molécula AFB1 puede causar daños en el hígado debido a la presencia de las enzimas CYP3A4 y CYP1A2, enzimas encargadas de producir el compuesto mutagénico, así generando daños hepáticos crónicos que pueden desarrollar CHC (Novoa & Díaz, 2006).

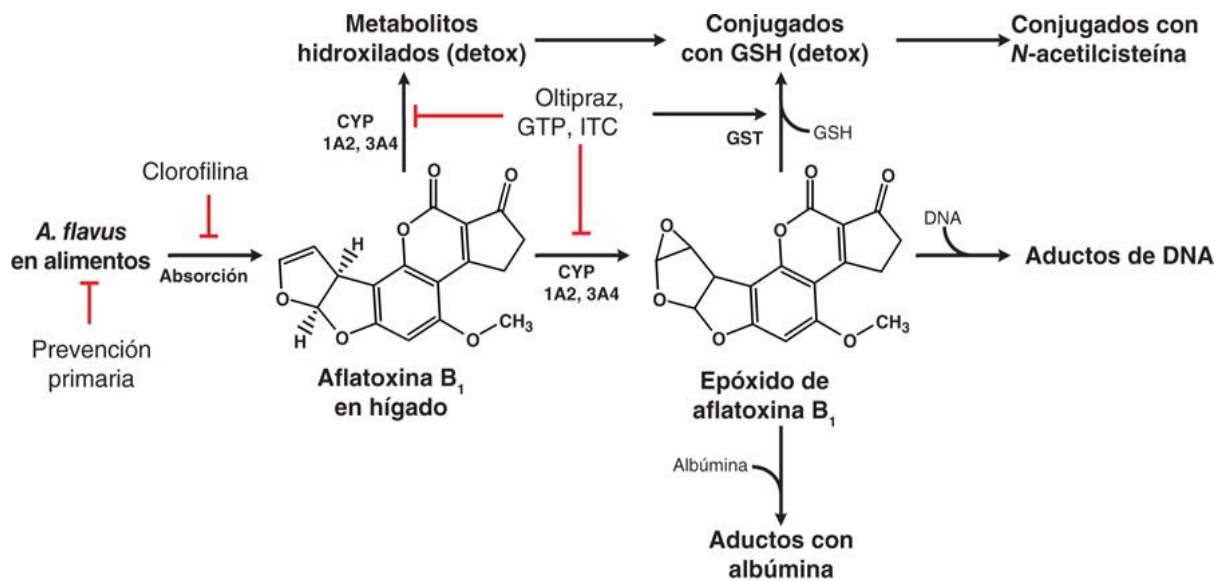


Figura 3. Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B₁.

Fuente: (Byrns & Penning, 2012).

2.1.2.5 Otros factores que pueden llevar a CHC. El consumo excesivo de alcohol, la diabetes mellitus, obesidad, tabaco, hemocromatosis y anticonceptivos orales, son otros factores adicionales que pueden conducir al desarrollo de CHC (Serag & Rudolph, 2017).

2.1.3 Desbalance metabólico y su relación con cáncer. En la actualidad se sabe que el cáncer es una enfermedad que ocurre producto de una replicación descontrolada de las células, generando la formación de bultos conocidos como tumores. Estas células pueden invadir o diseminarse a otra parte del cuerpo, donde esta puede replicarse y así afectar al nuevo huésped. Las células que tiene un crecimiento anormal, no son invasivas ni tampoco ocasionan daños graves al organismo se denominan tumores benignos, al contrario, las que su crecimiento es anormal, descontrolado e invasivo, son malignas.

Estas células son originadas de células normales en las cuales, el ácido desoxirribonucleico (ADN), es dañado por algunos factores externos, y la célula no es capaz de reparar este daño, conduciendo a cambios metabólicos que influyen en el crecimiento, desarrollo, división y envejecimiento celular. (Fadaka et al., 2017).

Previos estudios han demostrado que las células cancerígenas tienen una mayor capacidad de captación de glucosa y generación de lactato, incluso en condiciones aeróbicas, donde se produce un líquido extracelular con pH ácido (6,5 a 6,9 incluso puede llegar a ser más ácido); se sugiere que este pH se limita al microambiente del tejido tumoral, debido a que el nivel de lactato no se ve afectado en la sangre (Kato, Maeda, Suzuki, & Baba, 2018). Se ha evidenciado que todos los tipos de cáncer tienen en común seis capacidades biológicas alteradas durante su desarrollo: señalización proliferativa sostenida, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y activación de la invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2010). Adicional, se han demostrado que las células cancerígenas tienen dos características adicionales: el metabolismo energético reprogramado y la evasión de la destrucción inmunitaria (Hanahan & Weinberg, 2016). En los apartados siguientes se tratarán los eventos metabólicos más relevantes que influyen sobre el metabolismo celular en cáncer.

2.1.3.1 Expresión de los oncogenes MYC, AKT y HIF-1 y supresores de tumor en cáncer. En la mayoría de las células cancerígenas se ven alterado la expresión de genes con el crecimiento y desarrollo celular, tales como AKT, MYC y HIF-1, los cuales son genes que tiene el potencial de originar cáncer. Una de las vías alterada es la vía PI3K-AKT-mTOR, las cuales permiten alcanzar altos niveles de señalización, donde la activación de la vía AKT (conocida como proteína quinasa B), provoca la producción de ATP vía glucolítica, aumento del tamaño celular, incremento de la actividad glucolítica, supervivencia celular e impide la muerte celular por apoptosis (Gogvadze, Zhivotovsky, & Orrenius, 2010). La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) puede regular directamente la ingesta y el metabolismo de glucosa, incluido un aumento de la localización del transportador de glucosa, concretamente GLUT1, en la membrana plasmática y mediante el aumento de actividad de la hexoquinasa (HK), la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) y la fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) y por último los complejos m-TOR (mTORC1 y mTORC2) regulan positivamente la traducción de proteínas, desempeñan funciones en la síntesis de lípidos, el metabolismo de la glucosa y regulan la fosforilación de AKT. La activación de la vía AKT/PI3K/mTOR se produce en aproximadamente 70% de los cánceres de mama (Counihan, Grossman, & Nomura, 2018).

La alteración en la expresión de la molécula oncogénica MYC (familia de protooncogenes), se da por translocaciones cromosómicas, amplificación de genes y polimorfismos de un solo nucleótido. MYC regula la expresión de genes glucolíticos y transportador de glucosa extracelular. Controla las vías glutaminolíticas que promueven la expresión de transportadores de glutamina como el SLC1A5 y la expresión de glutaminasa (GLS), aumenta la síntesis de ácidos grasos, la glutaminólisis, el metabolismo de la serina y el metabolismo mitocondrial (DeBerardinis &

Chandel, 2016; Resendis-Antonio et al., 2015). Aparte de los oncogenes, los genes supresores de tumores como el factor de transcripción p53 puede regular el metabolismo. Se ha demostrado que p53 controla la glucólisis, la fosforilación oxidativa, la glutaminólisis, la oxidación de ácidos grasos y equilibrio redox. La inhibición de p53 lleva a un aumento de la glucólisis, mayor producción de lactato y disminución de la respiración mitocondrial en comparación con las células sanas, lo que sugiere que p53 suprime el efecto Warburg (Lu, Tan, & Cai, 2015).

Una característica de la mayoría de las células cancerígenas, es la capacidad de sobrevivir en ausencia de oxígeno (hipoxia), esta adaptación es debida al factor de transcripción HIF-1, el HIF-1 controla la expresión de varios genes, en los que se encuentran varias enzimas glucolíticas, transportadores de glucosa, lactato deshidrogenasa A, entre otros. En condiciones de hipoxia en donde HIF-1 se encuentra activado y estabilizado (condiciones hipóxicas pero también después de inactivar mutaciones en proteínas supresoras de tumores) aumenta la glucólisis en las células cancerígenas. HIF-1 también activa la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), un regulador negativo del complejo mitocondrial piruvato deshidrogenasa y, por lo tanto, reducirá el flujo de piruvato utilizado por el ciclo Krebs, esto promoviendo el aumento del consumo de glucosa (efecto Warburg) (Muñoz-Pinedo, El Mjiyad, & Ricci, 2012). El esquema de la figura 4 muestra en que partes de las rutas metabólicas estos oncogenes y supresores de tumores las afectan.

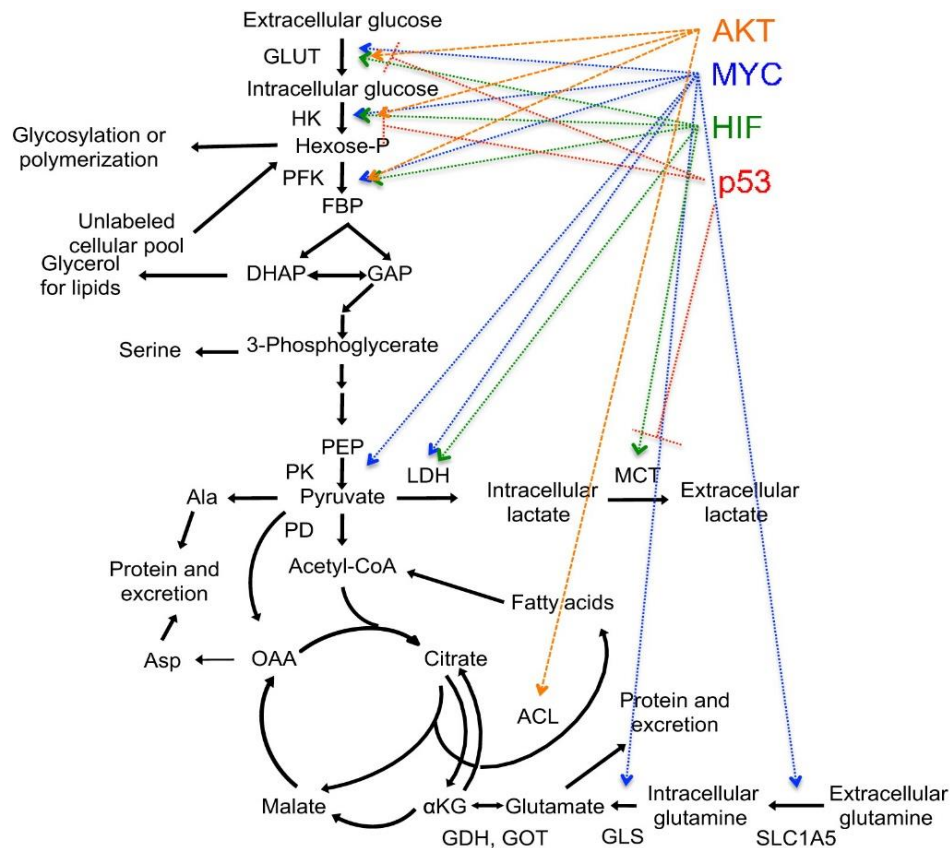


Figura 4. Efectos metabólicos de algunos oncogenes y genes supresores de tumor. En el esquema se puede observar como algunos oncogenes (AKT, MYC y HIF) y genes supresores de tumores (p53) afectan el metabolismo celular, al ser activados o reprimidos. Las flechas (→) indican activación y las barras (—) inhibición. Fuente: (Coller, 2014)

2.1.3.2 Metabolismo de glucosa y efecto Warburg. En 1920, Otto Heinrich Warburg (1883-1970) descubrió que en las células cancerígenas la glucólisis se encontraba sobreactivada, por lo tanto, sugirió que las células cancerosas realizan este ajuste bioenergético para poder mantener la supervivencia bajo condiciones anormales. Este fenómeno se conoce en la actualidad como el efecto Warburg, lo cual le confirió a O. H. Warburg el premio nobel de fisiología y medicina en 1931. Mediante este hallazgo fue posible inferir que las células cancerígenas favorecen la

degradación de la glucosa a través de la vía glucolítica, en donde se presenta la oxidación de la glucosa hacia piruvato y posteriormente, su reducción a lactato; esto indica que las células cancerígenas reprimen la fosforilación oxidativa (Ferreira, 2010; Tekade & Sun, 2017).

Warburg llevo a cabo estudios de metabolismo energético, tomando cortes de tejidos vivos de un tumor, donde observó que en los tejidos normales la producción de lactato ocurre exclusivamente en condiciones de hipoxia (efecto Pasteur, en consideración al trabajo realizado por Louis Pasteur durante el siglo XIX) mientras que en las células tumorales, este metabolito se sintetizaba de forma continua aún en presencia de oxígeno; a partir de estos hallazgos, Warburg concluyó que las células cancerígenas realizan fermentación láctica, incluso en condiciones aeróbicas (Ferreira, 2010).

En las células normales la glucosa proporciona energía a la célula mediante la oxidación completa hasta producir agua y dióxido de carbono, proceso que ocurre en tres rutas metabólicas; en la primera etapa la glucosa pasa a piruvato, seguidamente este piruvato entra al ciclo de Krebs que proporciona los sustratos necesarios para realizar fosforilación oxidativa, donde estos dos últimos pasos (ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa) ocurren en la mitocondria. Este tipo de oxidación proporciona aproximadamente 36 moléculas de ATP. En contraste, en las células cancerígenas no ocurre una oxidación completa de la glucosa, a cambio, se incrementa su captación aproximadamente unas 100 veces más comparada con las células normales, para ser luego oxidadas parcialmente en el proceso de glucólisis y seguido de fermentación láctica (proceso que puede ocurrir en ausencia de oxígeno); el lactato biosintetizado *de novo* es posteriormente excretado. Durante todo este proceso solo produce dos moléculas de ATP, comparadas con las 36

producidas en células normales. Cabe anotar que, no toda la glucosa es utilizada en la fermentación, algunas porciones pasan a citrato; el citrato y otros intermediarios de la vía glucolítica son usados luego para la biosíntesis de nucleótidos, triglicéridos, ácidos grasos y aminoácidos, esenciales para la proliferación celular. La células cancerígenas realizan todas estas alteraciones con en el fin de poder sobrevivir y tener una mayor proliferación. En la figura 5 se muestra una comparación del metabolismo de glucosa en células normales y células cancerígenas (Grunt, 2018; Icard et al., 2018; Lu et al., 2015).

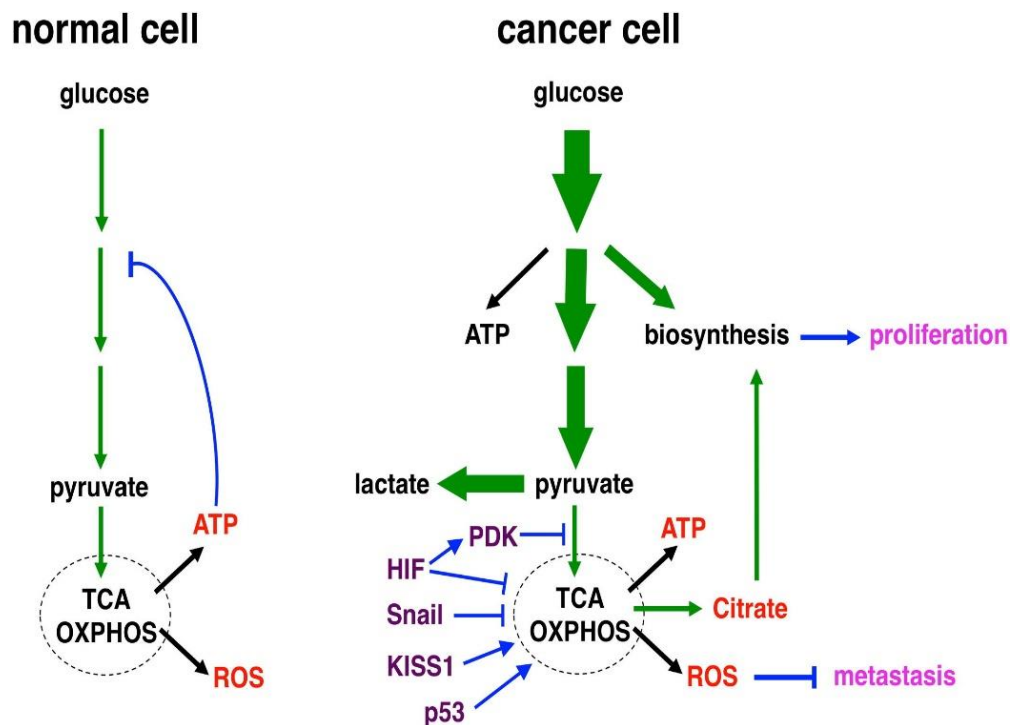


Figura 5. Esquema general del metabolismo de glucosa en células normales y células cancerígenas. Fuente: (Lu et al., 2015)

2.1.3.3 Metabolismo de aminoácidos y su importancia en Cáncer. Los aminoácidos son necesarios para el crecimiento y proliferación celular, ya que a partir de estos se puede suministrar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los aminoácidos también son usados como suministros para el ciclo de Krebs, síntesis de bases nitrogenadas y la regulación del equilibrio redox. Algunos aminoácidos al igual que la glucosa, son fuente para el metabolismo energético y procesos anabólicos.

La **L-glutamina** es uno de los 11 aminoácidos no esenciales, que es usado en las células como fuente alternativa de biosíntesis de macromoléculas, siendo esencial durante el crecimiento rápido u otras condiciones de estrés, lo que significa que la glutamina es necesaria en estas condiciones de estrés en la célula. Al superarse la capacidad de biosíntesis de glutamina por la célula, la célula debe conseguir este suministro exógenamente (de la dieta). La glutamina por ser una fuente rica en nitrógeno y carbono, es usada para la producción de macromoléculas tales como bases nitrogenadas, lípidos y nucleótidos. La glutamina ingresa a la célula mediante transportadores SLC1A5 Y SLC7A5, luego se cataboliza en metabolitos biológicamente importantes, como glutamato, citrato, piruvato, aspartato, alanina y CO₂ (Counihan et al., 2018).

La **L-arginina** es un aminoácido esencial, precursor de muchas sustancias importantes para la célula, principalmente proteínas, óxido nítrico, prolina y creatina, la L-arginina también puede estimular la liberación de la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento tipo insulina 1, la insulina y la prolactina. Las poliaminas (putrescina, espermidina, espermina) en las células sanas son las responsables de su correcto desarrollo y funcionamiento, estas poliaminas pueden ser sintetizadas mediante la ornitina, que a la vez proviene de la L-arginina. El óxido nítrico que

proviene de la arginina es regulado en las células normales y solo se sintetiza en procesos de inflamación (Szefel, Danielak, & Kruszewski, 2019). Algunos tumores animales y humanos, requieren para su crecimiento L-arginina, donde algunas células de melanoma, cáncer de riñón y de carcinoma hepatocelular, no expresan el argininosuccinato sintetasa (AS), enzima necesaria para la síntesis de arginina a partir de Citrulina; por lo tanto, la arginina se obtiene en estas células de forma exógena (es decir de la dieta). La arginina intracelular se puede metabolizar a través de una variedad de rutas metabólicas que pueden estar presentes en la misma célula normales. Algunos estudios sugieren que la regulación de estas rutas metabólicas limita la producción de óxido nítrico (NO) derivado de la L-arginina. En las células cancerígenas estas rutas metabólicas están desregularizadas, por ende la producción de NO aumenta. El NO puede influir en la iniciación, la adhesión de células tumorales, la angiogénesis de la apoptosis, la diferenciación, la quimiosensibilidad, la radiosensibilidad, la promoción y progresión del tumor, y la inmunosupresión inducida por el tumor (Lind, 2004).

La **L-asparagina**, un aminoácido cuya importancia se refleja una vez las concentraciones de L-glutamina intracelular disminuye, puede ser adquirida de forma exógena y al igual que la L-glutamina, contribuye en la sobrevivencia y crecimiento de las células cancerígenas. Se ha encontrado que la L-asparagina es el aminoácido estructuralmente más parecido a la L-glutamina, y puede ser usado como sustrato para la síntesis de proteínas, detener la apoptosis provocada por la disminución de la glutamina y servir como sustrato anaplerótico para el ciclo de Krebs (Pavlova et al., 2018).

La **L-serina** y **L-glicina** son metabolitos esenciales para las células cancerígenas, donde estos dos aminoácidos sirven como precursores para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, cruciales para el crecimiento celular; la glicina es producida a partir de la serina, y esta a su vez es producida por el 3-fosfoglicerato (intermediario glucolítico). En la figura 6 se puede observar un esquema de la síntesis de serina y glicina. A partir de glicina se puede dirigir la síntesis de purinas, mantener el equilibrio redox celular, promover la tumorigénesis y la malignidad, se correlaciona con la proliferación celular, contribuye significativamente a los requisitos biosintéticos de las purinas, ATP y NADPH en células cancerosas (Amelio et al., 2014).

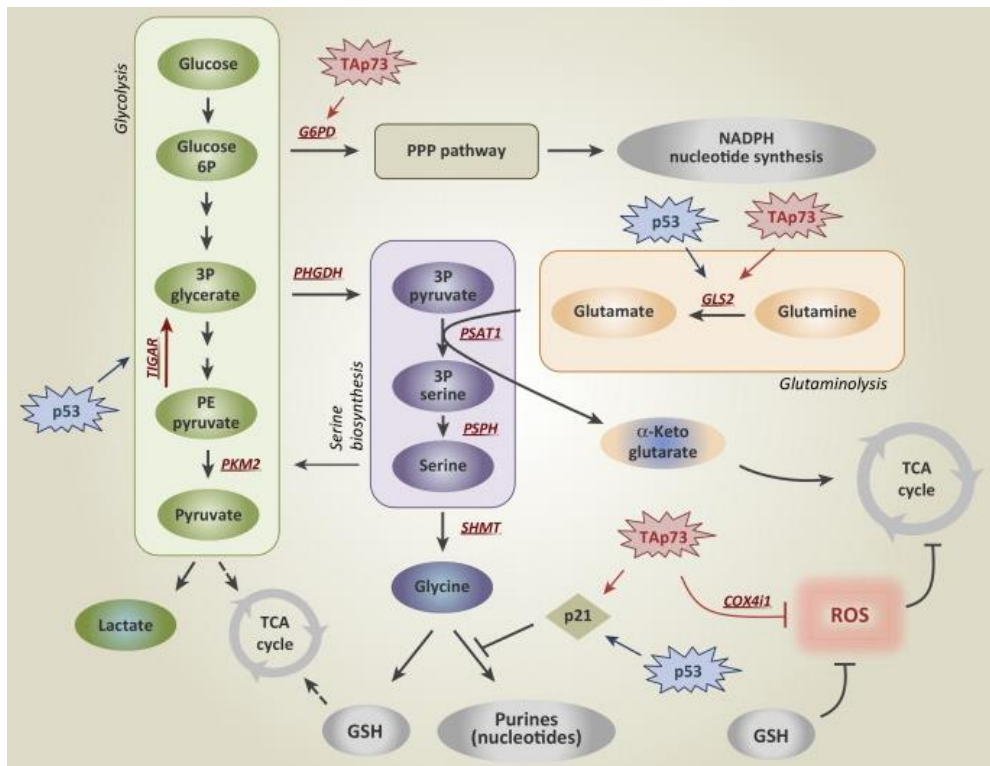


Figura 6. Metabolismo de L-serina y L-glicina en las células cancerígenas. Fuente: (Amelio et al., 2014)

2.1.3.7 Metabolismo de glicerol en cáncer. El metabolismo del glicerol sirve como precursor para la producción de lípidos. El glicerol puede ser convertido a glicerol 3-fosfato, seguidamente convertido en triacilglicerol, el cual es la unidad primaria de almacenamiento de energía en eucariotas. El glicerol 3-fosfato también puede entrar a la vía glucolítica, lo cual puede ser usado como fuente para el crecimiento celular (Xue, Chen, & Jiang, 2017).

2.1.3.8 Metabolismo de ácidos grasos. La alteración de los ácidos grasos también está presente en las células cancerígenas. Los ácidos grasos son necesarios para el almacenamiento, de energía que en condiciones de inanición pueden ser usados para la producción de energía mediante la β -oxidación, la síntesis de membranas y la generación de moléculas señalizadoras (Currie et al., 2013). Los lípidos también pueden servir como moléculas de señalización para regular diversos procesos biológicos, como el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Estos lípidos se obtienen de fuentes dietéticas o por síntesis de novo en el hígado y el tejido adiposo (Y. Chen & Li, 2016).

2.1.4 Tratamientos terapéuticos utilizados para el CHC. El carcinoma hepatocelular (CHC). Es detectado en la mayoría de los portadores cuando este se encuentra en un estado muy avanzado y tiene un alto riesgo de mortalidad; una vez es detectado y dependiendo el estado en que se encuentre el tumor, se procede a usar el tratamiento que mejor se acomode a ese estado (Genco et al., 2013). En las figura 7 y 8 se muestran algunas opciones de tratamientos para CHC.

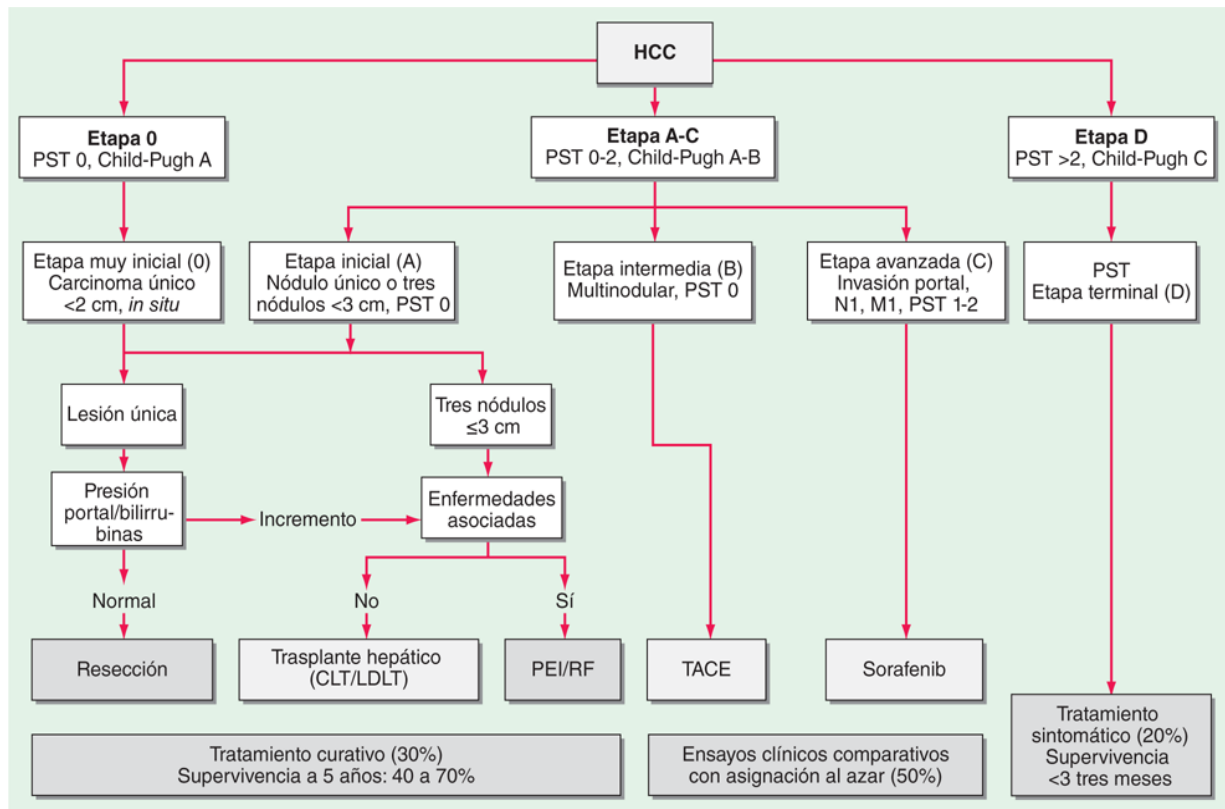


Figura 7. Tratamientos para CHC según su etapa. Fuente:(Brian I. Carr, 2012)

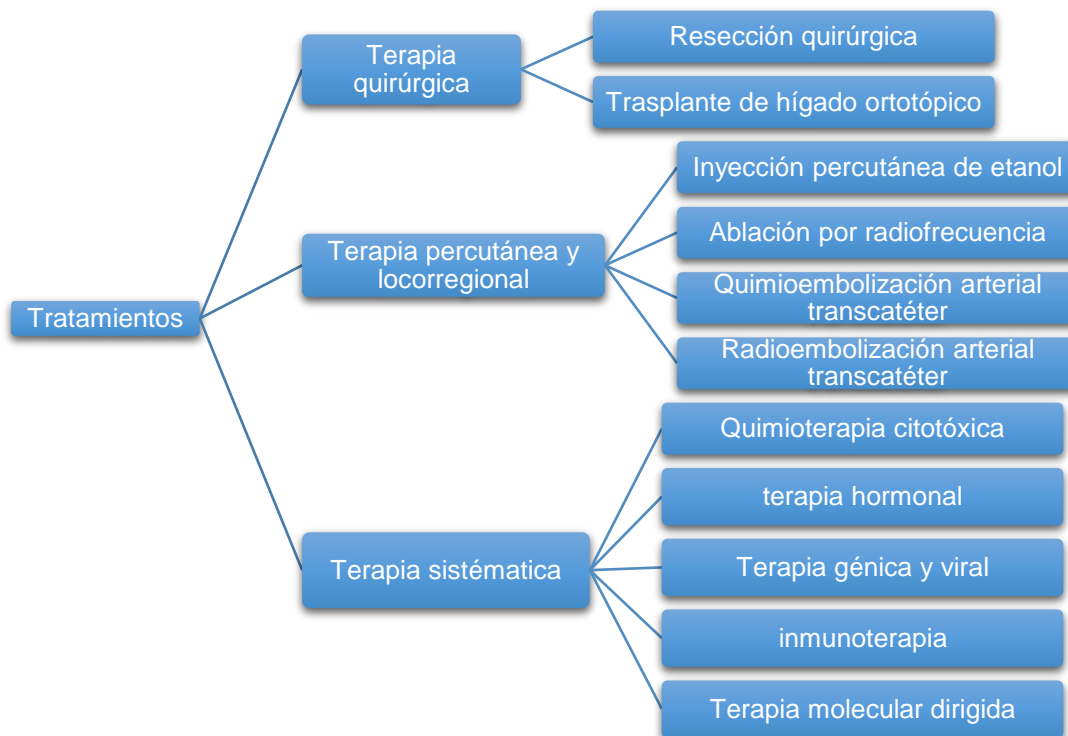


Figura 8. Esquema explicativo para los diferentes Tratamientos para CHC

Las opciones de tratamiento para el CHC son:

2.1.4.1 Terapia quirúrgica. El procedimiento de resección quirúrgica se puede realizar cuando se ha detectado el cáncer en una etapa temprana y el tumor no tiene una gran área superficial. El trasplante de hígado es una buena opción, pero la lista de espera es muy larga y la mayoría de los pacientes mueren debido a la espera del trasplante, la enfermedad avanza y se expande contaminando otros órganos, por ende esta terapia es muy limitada (Tang, 1998).

2.1.4.2 Terapia percutánea y locorregional. Cuando el tumor ya se encuentra en un estado intermedio, donde el tamaño del tumor es mayor a 5 cm o multilnodular y no hay invasión arterial, se aplican estos tratamientos (radioterapia). Uno de los más económicos y efectivos es la inyección de etanol en el nódulo tumoral, este tratamiento produce de un 90-100% de necrosis en tumores de menos de 2 cm, cuando el tumor tiene un mayor tamaño es menos eficiente este método (60-70%) (Genco et al., 2013).

2.1.4.3 Terapia sistemática. Esta terapia es usada en la mayoría de los pacientes con CHC avanzado en la que se incluyen quimioterapia, inmunoterapia y terapia hormonal, pero estos tratamientos no han mostrado grandes avances debido a que los tumores presentan resistencia a la quimioterapia, también se debe a que los pacientes tratados con estas terapias tienen funciones hepáticas graves, lo que los hace propenso a los efectos secundarios tóxicos de estas terapias (Sandhu et al., 2008). En la actualidad las investigaciones están enfocadas en la terapia molecular dirigida donde los compuestos comúnmente usados son: interferón, sorafenib, Erlotinib, Brivanib,

Rapamycin, Nintedanib, Dovitinib entre otros. Estos tratamientos consisten en interferir en las vías de señalización celular y así intervenir en el ciclo celular o inducir algún tipo de muerte celular en dichas células (Aravalli & Steer, 2014; Psyrris, Arkadopoulos, Vassilakopoulou, Smyrniotis, & Dimitriadis, 2012).

2.1.4.4 Quimioterapia. La quimioterapia es un tratamiento usado para CHC avanzado, en el pasado el agente que era usado con mayor frecuencia era la doxorubicina (figura 9), este agente era ineficaz y presentando una tasa de respuesta de 15-20%. Otros agentes quimioterapéuticos usados solos o combinados son: cisplatino, 5-fluorouracilo, y etopósido (Cao, Phan, & Yang, 2012). Sus estructuras químicas se muestran en la figura 9. Los fármacos que se están usando en la actualidad y que han sido aprobados por la FDA son el sorafenib y regorafenib (Food and Drug Administration. FDA, 2017; Gusani et al., 2009).

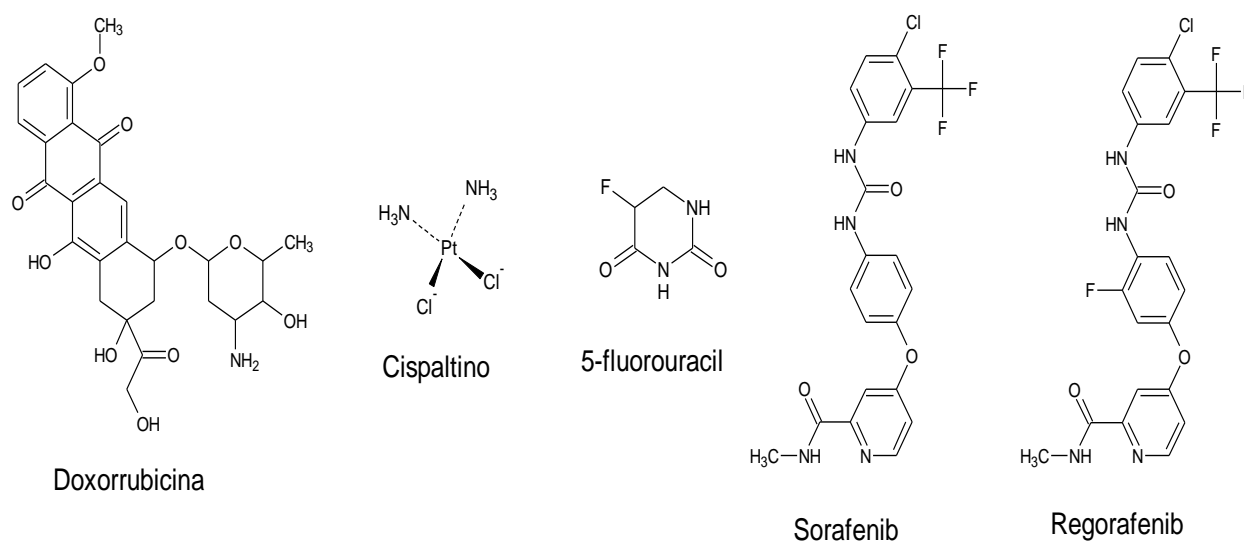


Figura 9. Estructura química de los compuestos usados para el tratamiento de CHC.

A continuación se describe brevemente los mecanismos de acción de algunos agentes quimioterapéuticos comúnmente utilizados contra el cáncer.

a) Mecanismo de acción de Doxorrubicina

La doxorrubicina es uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivos, siendo uno de los más usados en el tratamiento de CHC. Los mecanismos de acción de este compuesto no son conocidos en la actualidad, pero se cree que está involucrado en la generación de especies reactivas de oxígeno, en la inhibición de la enzima topoisomerasa II, interaccionar con el hierro, alterar la actividad de las enzimas oxidantes intracelulares o intramitocondriales. Algunas de sus desventajas son, su alta toxicidad que limita la dosis, la degradación de los órganos, en donde la cardiotoxicidad es uno de los daños más notables por el uso de este tratamiento (Helmy, El-Mesery, El-Karef, Eissa, & El Gayar, 2018; Mitry & Edwards, 2016).

b) Mecanismo de acción del fluorouracilo (5-FU)

El 5-fluorouracilo fue desarrollado en 1957 como un potente agente anti tumoral, siendo uno de los más usados desde ese entonces hasta la actualidad (Parker & Cheng, 1990). El 5-FU al ser un análogo del uracilo, usa el mismo mecanismo de transporte usado por el uracilo para entrar a la célula, el cual, es convertido intracelularmente en varios metabolitos activos: fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP), y fluorouridina trifosfato (FUTP); estos metabolitos afectan la síntesis de ARN y bloquea la enzima Timidilato Sintasa (TS), enzima clave para la reparación y replicación del ADN. Una de las desventajas que tiene este compuesto es que una vez se encuentra en el hígado, un 80% es bloqueado por la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), enzima que es abundante en el hígado (Longley, Harkin, & Johnston, 2003).

c) Mecanismo de acción del Sorafenib

Sorafenib es un inhibidor multiquinasa, aprobado por la FDA para el tratamiento de CHC avanzado, siendo el primer inhibidor multiquinasa oral (Cervello et al., 2012). El Sorafenib inhibe la proliferación del tumor y la oncogénesis, mediante la inhibición de la ruta de las quinasas Raf/ERK/MAP, factores de crecimiento endotelial vascular (VEGFRs) y receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) (Gusani et al., 2009; Moriguchi, Umemura, & Itoh, 2016). Estudios realizados por Ann-lii Cheng y colaboradores, demostraron que la resistencia que han adquirido las células de CHC al Sorafenib, es debido a la activación de la ruta de señalización fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K/Akt) (Chen et al., 2011).

d) Mecanismo de acción del Regorafenib

El regorafenib fue aprobado por la FDA en el 2012 para el tratamiento de cáncer colorrectal y tumores del estroma gastrointestinal avanzado, al ser esta molécula muy similar al Sorafenib se ha encontrado que es eficiente para el tratamiento de CHC, este compuesto es usado en tratamiento en los cuales los pacientes fueron posteriormente tratados con Sorafenib. En estudios realizados por Kuen-Feng Chen y colaboradores se encontró que el regorafenib inhibe el crecimiento celular, induce apoptosis, e inhibe la vía de señalización STAT3 en líneas celulares de CHC (Tai et al., 2014).

2.1.5 Tetrahydroquinolinas y su potencial biológico. Las Tetrahydroquinolinas son moléculas de origen natural o sintético que poseen una amplia actividad antimalárica, antitumoral, antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano entre otras; diversas moléculas polifuncionales de quinolina son usados como agentes anticancerígenos, entre los que se encuentra 4-metoxi-3-

hidroxifenil ó 3-metoxi-4-hidroxifenil, indanocina, (iso) eugenol, entre otras moléculas (Muñoz et al., 2012).

Se ha encontrado que los derivados de 1,2,3,4-tetrahidro-6-sulfonamida modifican moléculas pequeñas de la función hepática de microARN, disminuyendo la propagación del virus de la hepatitis C y también siendo activo como inductores de apoptosis.

En la figura 10 se pueden observar algunas tetrahydroquinolinas con actividad antitumoral. El compuesto 1 tiene actividad citotóxica e inhibe la polimerización de la tubulina. Los compuestos 2, 3, 4 y 5 son inhibidores del cáncer, se conoce que inhiben: la tirosina cinasa IGF-1R, inhibidores de caspasas, antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$, inhibidor del tromboxano A2 sintetasa (P450 TxA₂) y la enzima aromataasa, respectivamente, para cada uno de los compuestos nombrados anteriormente. Los compuestos 6, 7 y 8 han mostrado citotoxicidad in vitro en células de cáncer de mama (MCF7) (Sridharan, Suryavanshi, & Menéndez, 2011), pero su mecanismo de acción no ha sido reportado. También se ha descubierto que los derivados de 2-metiltetrahydroquinolina como el compuesto 9, tienen una alta o moderada actividad moduladora en resistencia en múltiples fármacos, el cual es uno de los mayores obstáculos en mayoría de tratamientos quimioterapéuticos (Sridharan et al., 2011).

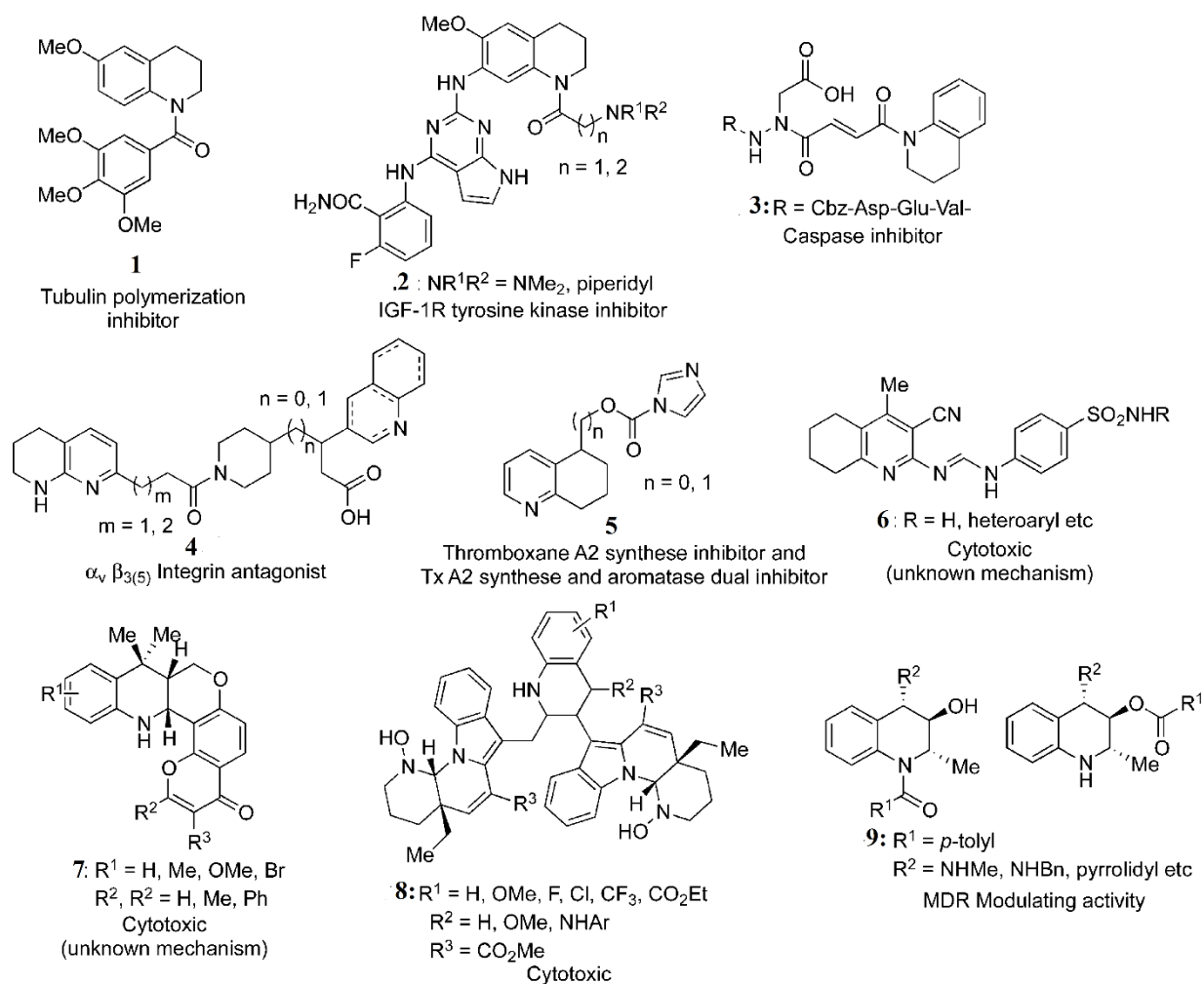


Figura 10. Tetrahidroquinolinas con actividad anticancerígena. Fuente: (Sridharan et al., 2011)

2.1.6 Isoxazoles. Los Isoxazoles son farmacóforos críticos para la actividad biológica. Estos compuestos han adquirido gran importancia en las recientes investigaciones, ya que estos compuestos presentan un gran potencial anticancerígeno, neuroprotector, antiobesidad, antidepresivo, insecticida, antidiabético y antiinflamatorio (Chouaïb et al., 2016).

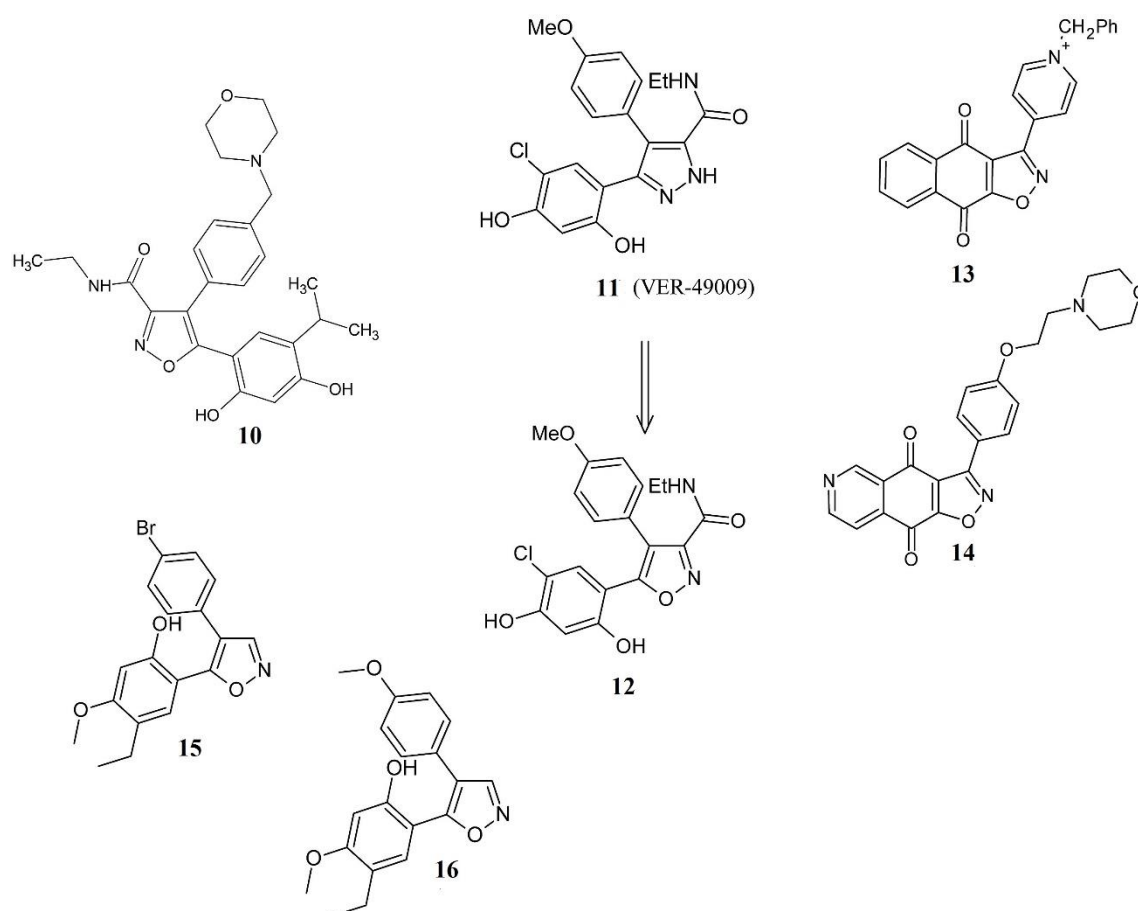


Figura 11. Isoxazoles con actividad anticancerígena. Fuente: (Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017)

Varios estudios preclínicos demostraron que la inhibición de la proteína chaperona Hsp90 (proteína de choque térmico 90 kDa) produce efectos anticancerígenos, esta proteína es la encargada de la correcta conformación, plegamiento y estabilización de polipéptidos. Además los inhibidores de Hsp90 son únicamente tóxicos contra células cancerosas, estos no afectan las células sanas. Debido a los beneficios de inhibir esta proteína las investigaciones se han enfocado en buscar nuevos inhibidores de Hsp90. En la figura 11 se puede observar algunos Isoxazoles con actividad anticancerígena. El compuesto **10** tiene la capacidad de bloquear la proteína Hsp90 de

humanos, inhibe la proliferación células tumorales por inducción de G1-G2 y apoptosis, este compuesto es activo para una gran cantidad de líneas celulares, en especial en la línea de cáncer de mama. Los compuestos **11-14** son inhibidores de Hsp90, el compuesto **15** inhibe la migración y la invasión de la línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231 IC₅₀=50nM) y el compuesto **16** con actividad antimigratoria y bloqueo de la proteína Hsp27 (se cree que esta proteína aumenta el potencial metastásico de las células cancerígenas, esta proteína se encuentra sobreexpresada en células cancerígenas) (Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017).

2.1.7 Metabolómica

2.1.7.1 Fundamento teórico. La metabolómica es el estudio, identificación y cuantificación de compuestos de bajo peso molecular. Estos estudios son realizados en células, tejidos o fluidos biológicos, uno de sus principales objetivos consiste en identificar cambios metabólicos de sistemas biológicos, a diferentes estados fisiológicos o patológicos (Fernández-Lainez, Vela-Amieva, & Ibarra-González, 2009). Este estudio es de gran importancia, ya que puede ser usado como complemento para estudios en expresión genética y proteica (genómica y proteómica). Para la determinación de los metabolitos o perfiles metabólicos, es necesario el uso de técnicas tales como: la cromatografía acoplada a espectrometría de masas y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, importantes en esta nueva técnica debido a que son requeridas medidas simultaneas de un gran número de metabolitos (Tomita & Nishioka, 2005).

2.1.7.2 Aplicaciones. Con la metabolómica se puede determinar marcadores de diagnóstico para ciertas enfermedades o resultados de tratamiento. Una de las aplicaciones de la metabolómica es el estudio de rutas metabólicas cruciales en el desarrollo de cáncer y respuesta al tratamiento.

A continuación se van a presentar algunos análisis metabolómico para compuestos con actividad anticancerígena (Halama, 2014).

- a) Wang y colaboradores sintetizaron el compuesto derivado de acridona (la figura 12 muestra la estructura molecular), hidrocloreto de 2-aminoacetamido-10-(3,5-dimetoxi)-bencil-9(10*H*)-acridona (llamado **8a**); este compuesto mostró una potente actividad antitumoral. Para el análisis metabolómico se trataron células de leucemia CCRF-CEM con el compuesto **8a** y como control se usaron células tratadas con DMSO, los análisis se realizaron con UPLC/Q-TOF MS (cromatografía de ultra alta resolución/ espectrometría de masas de tiempo de vuelo: cuadrupolo). Al comparar el tratamiento con el control se encontraron 23 metabolitos implicados en 5 rutas metabólicas, los niveles de glutatión (GSH) y la relación reducción /oxidación del glutatión (GSH / GSSG) disminuyeron, L-cisteinil-glicina (L- Cys-Gly) y el glutamato aumentaron, el metabolismo del glicerofosfolípido disminuyó, los productos oxidativos lisofosfatidilcolinas (LPC) aumentaron, también se encontraron un aumento especies reactivas de oxígeno (ROS) y el producto de peroxidación lipídica malondialdehído (MDA) (Y. Wang et al., 2013).

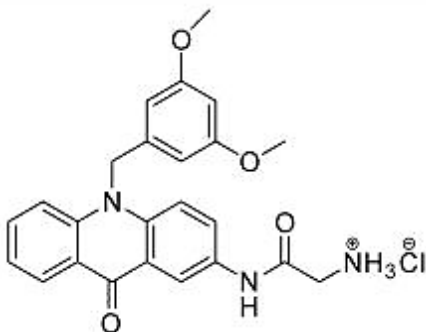


Figura 12. Estructura química del derivado de acridona, hidrocloreto de 2-aminoacetamido-10-(3,5-dimetoxi)-bencil-9(10*H*)-acridona (**8a**)

realizaron estudios en la respiración mitocondrial, internalización de la diferentes nanopartículas y estudio del metabolismo, a partir de estos resultados se pudo observar que las nanopartículas alteran la respiración mitocondrial, disminuyeron la concentración de metabolitos intracelulares, posible pérdida de la integridad de membrana y alteraciones en la concentración de ATP, para la cual se observó que las nanopartículas recubiertas con PVP se internalizaron más y causaron alteraciones en el metabolismo, se observó que las nanopartículas recubiertas con poli y citrato disminuyeron la producción de ATP. Lo que sugiere que independientemente el recubrimiento de las nanopartículas se observó una disminución en los metabolitos intracelulares, sugiriendo la unión de cierto metabolitos a las nanopartículas (Lindeque et al., 2018).

- d) Zhang y colaboradores realizaron un estudio del efecto del hexabromociclododecano (HBCD) (la estructura se muestra en la figura 14) en la línea celular HepG2 usando análisis de UHPLC/Q-trap-MS. Se observó que la exposición de las células a HBCD afectó la homeostasis metabólica y el estrés oxidativo inducido, el perfil metabólico y análisis multivariado demostraron que las principales rutas metabólicas afectadas por el HBCD incluían metabolismo de los aminoácidos, la biosíntesis de proteínas, el metabolismo de los ácidos grasos y el metabolismo de los fosfolípidos. HBCD redujo la captación de aminoácidos, inhibiendo la proteína de transporte de membrana Na^+/K^+ ATPasa, también se presentó una baja regulación de la glucólisis y β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, causando una disminución en la producción de ATP. Adicional, HBCD también afectó el aumento de fosfolípidos totales (F. Wang et al., 2016).

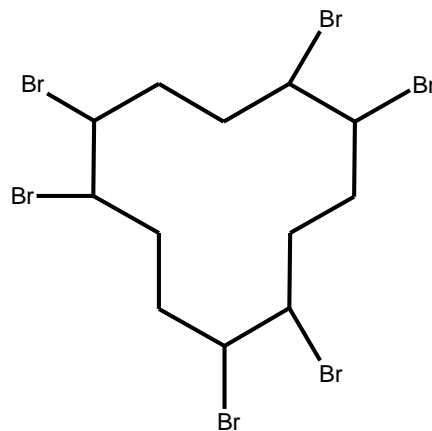


Figura 14. Estructura molecular del hexabromociclododecano (HBCD) fuente: Autor

- e) Geng y colaboradores estudiaron el efecto que tiene las parafinas cloradas de cadena corta (PCCC) en la línea celular HepG2, para lo cual se realizaron ensayos de viabilidad y perfil metabólico, la concentración de PCCC usada fue menor a 100g/L, encontrándose que un aumento en la concentración de PCCC disminuye la viabilidad celular. También se observó que a un periodo de exposición de 48 horas a un PCCC C₁₀, se produjo una reducción significativa de la viabilidad al compararlo con 24 horas, incluso a una concentración de 1µg/L. Las PCCC aumento la β-oxidación de acidos grasos insaturados y de cadena larga, altero la glucólisis y el metabolismo de aminoácidos y aumento la regulación de glutamato y ciclo de la urea. Los efectos tóxicos de las PCCC pueden alterar la producción de energía, biosíntesis de proteínas, metabolismo de acidos grasos y reciclaje de amoniaco (Geng et al., 2015).
- f) Li Gao y colaboradores usando resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ¹H) detectaron los cambios metabólicos presentados en la línea celular de carcinoma

hepatocelular (CHC) por la interacción con el compuesto (-)-5-hidroxi-equol (su estructura se muestra en la figura 15), un metabolito de isoflavona obtenido por biotransformación microbiana. Se observó que ese compuesto puede inhibir significativamente la proliferación, migración, invasión de las células de carcinoma hepatocelular humano (SMMC-7721) e inhibir la proliferación de la línea celular HepG2. Se detectaron 17 metabolitos que fueron modificados dentro y fuera de la célula después del tratamiento con el compuesto, relacionados con el metabolismo de aminoácidos y metabolismo energético. A una concentración de $30\mu\text{M}$ del compuesto, disminuyó la concentración de piruvato, glutamato y glucosa. Análisis proteómicos y enzimáticos, revelaron que el (-)-5-hidroxi-equol en CHC inhibe las actividades de la hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, y la expresión de la piruvato quinasa M2 (L. Gao et al., 2018).

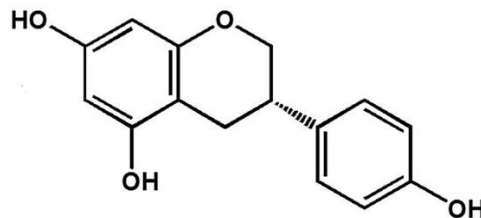


Figura 15. Estructura química del (-)-5-hidroxi-equol fuente:(L. Gao et al., 2018)

2.2 Metodología

La presente investigación es de tipo explicativo. A continuación se describe los métodos experimentales empleados en la ejecución del proyecto de investigación.

2.2.1 Cultivo celular. Cabe mencionar que esta línea celular (HepG2) fue donada por el laboratorio de oxidaciones biológicas de la Universidad Federal de Paraná, quienes a su vez la obtuvieron comercialmente de la ATCC (del inglés *American Type Culture Collection*), entidad que tiene más de 85 años de experiencia en el aislamiento, identificación y comercialización de células en cultivo.

Esta línea celular fue cultivada en botellas de plástico con medio EMEM (pH 7,3) suplementado con estreptomycin 100 µg/mL y penicilina 50 u/mL, 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂ para su adhesión, crecimiento y replicación hasta obtener 3 millones de células. Los subcultivos se realizarán usando una solución de tripsina-EDTA (pH 7,3).

2.2.2 Preparación de la muestra. Se plaqueron en cajas de Petri 3,0×10⁶ células/6ml, las células fueron resuspendidas en medio que contenía: 25µM del compuesto híbrido FM50 (la estructura química se muestra en la figura 16), 0,1 % Dimetilsulfóxido (DMSO) y medio de cultivo; las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ por 12 y 24 horas, este tratamiento se usó en la línea celular HePG2, se realizó un control que fueron las mismas células solo con DMSO y medio. Los cultivos celulares se utilizaron para la extracción de los metabolitos. Una vez pasado el tiempo de tratamiento, se procedió a realizar un baño de hielo a las cajas de petri, seguidamente el medio de cultivo fue retirado y almacenada a -20°C. Los cultivos celulares se lavaron dos veces con 2 mL de agua tipo I (milliQ), posterior al lavado se adicionó 1mL de solución que contenía metanol al 20% y 10µg/mL de ribitol, seguidamente se realizó el raspado celular, la suspensiones celulares obtenidas fueron transferidas a crioviales de 2.0 mL, para poder obtener los metabolitos

celulares, se procedió a realizar lisis celular por choques térmicos y ultrasónico, lo cual consistió en sumergir las suspensiones celulares en nitrógeno líquido, descongelarlas y seguidamente realizar ultrasonido por un minuto en baño de hielo, este procedimiento de lisado se realizó 3 veces. Los residuos celulares fueron removidos por centrifugación (13000 x g, 4°C, 5 min), se tomó el sobrenadante (extracto metabólico) y se almaceno a -20°C, para luego ser usado en los respectivos análisis.

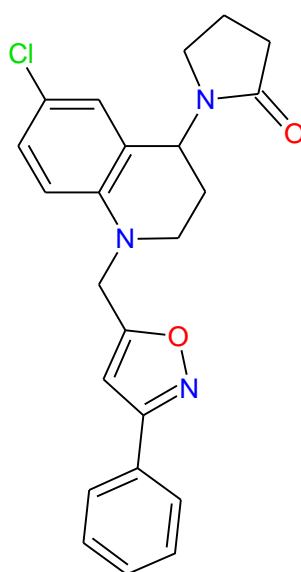


Figura 16. Estructura química del compuesto (*R/S*) 1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il) metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il) pirrolidin-2-ona (FM50).

2.2.3 Derivatización de los extractos metabólicos. La metodología reportada por Lindeque fue empleada con algunas modificaciones. Brevemente se tomó 50µL de extracto metabólico, previamente liofilizado en un equipo con serpentín de enfriamiento por 24 horas a -79°C y a una presión de -0,200 mbar. Se adicionaron 30µL de metoxiamina (5mg/mL de piridina) al liofilizado, esta solución se sónico por 1 hora a 40°C, pasado este tiempo se dejó que las muestras tomaran temperatura ambiente por 15 min. Seguidamente se adicionó 60µL de N,O-

Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSFTA), se sónico por 1 hora a 50°C, esta solución se dejó reposar hasta temperatura ambiente. Posteriormente esta solución se transfirió a un vial de 2mL que contenía un inserto de 150µL, para su posterior análisis por GC-MS.

2.2.4 Análisis GC-MS. Se inyectó 1µL de muestra al cromatógrafo de gases marca Bruker EVOQ Scion 436-GC, triple cuádrupolo con una columna Rxi®-5sil MS (15m, 0,25 mmID y 0,25µm), en modo split/splitless; radio Split 10, se realizó 3 lavados a la jeringa con solvente (hexano) y 3 lavados con la muestra antes de la inyección. Las condiciones de corrida fueron las siguientes, el puerto de inyección permaneció a 250°C durante toda la inyección, la temperatura del horno empezó a 60°C se mantuvo por 1min, seguidamente se fue aumentando a una velocidad de 4°C/min hasta 95°C, se mantuvo por 3min, luego se aumentó a una velocidad de 8°C/min hasta 120°C, se mantuvo por 3 min, y se llevó a una temperatura final de 275°C a una velocidad de 10°C/min, esta temperatura se mantuvo por 3min. Una vez obtenidos los cromatogramas y los espectros de masas se procedió a realizar los respectivos análisis.

2.2.5 Procesamiento y análisis estadístico de datos obtenidos por GC-MS. Para el procesamiento se usó el software libre XCMS (versión 3.7.1), este software se usó para realizar alineamiento y deconvolución de los datos, esto mediante la comparación de cada uno de los espectros de masas, ya que por cada pico en el cromatograma, se presenta un espectro de masas para dicho compuesto, con la deconvolución se busca poder identificar los diferentes espectros de masa que se encuentre solapados, antes de realizar los anteriores procesamiento de datos, se realizó la normalización de cada una de las áreas de las características de relación masa/carga (m/z) detectadas en cada replica tanto para el grupo control y grupo tratamiento, para esto se realizó la

sumatoria de todas al áreas de las características detectadas en cada replica y con está sumatoria se procedió a normalizar cada una de las áreas de las características masa/carga (*mz*) detectadas, esto se realiza con el fin de disminuir el error entre la comparación del grupo control y grupo tratamiento, y así realizar una comparación más precisa entre el grupo control y tratamiento, debido que el grupo tratamiento va a presentar menos intensidad en sus picos cromatográficos (metabolitos) comparado con el grupo control ya que el compuesto FM50 inhibe la proliferación celular, por ende el grupo control va a tener mayor intensidad en su picos cromatográficos con respecto al grupo tratamiento. Al realizar esta normalización se mitiga dicho error. una vez se obtuvieron estos datos se procedió a realizar los análisis estadísticos, usando el software libre MetaboAnalyst (versión 4.0), el cual se usó para normalizar los datos, mediante el área del estándar interno, seguidamente se realizó transformación logarítmica y un escalado de los datos auto scaling para cada réplica de grupo control y tratamiento. Posteriormente se determinó la variable “veces de cambio” (Fold change, FC), t-test y análisis de componentes principales (PCA). Una vez se obtuvieron las masas que presentaron diferencia entre los datos y las que fueron estadísticamente significativas, se procedió a la identificación tentativa de los metabolitos correspondientes a cada una de las masas (relación masa/carga) encontradas; esto se realizó mediante el uso de la base de datos NIST MS (Versión 2.0, Faircom Corporation). Posteriormente se determinó las rutas metabólicas posiblemente implicadas por la alteración de los metabolitos identificados, con ayuda del software MetaboAnalyst (versión 4.0). El cálculo de Fold change es realizado para obtener una cuantificación relativa de los metabolitos, donde el Fold change muestra una relación de medida de una muestra con tratamiento versus el control de referencia, cuyos valores de 0-0,5 corresponden a metabolitos que presentaron una aumento en la concentración y valores mayores a 2 (umbral del 75%) indican metabolitos que presentaron disminución en la concentración. A

continuación se aplicó \log_2 de los valores obtenidos en FC, donde los valores negativos del cálculo indican metabolitos con aumento en la concentración y valores positivos, metabolitos con disminución en la concentración. Seguidamente se realizó el segundo análisis (T-test), con este análisis se puede determinar si las medidas de dos grupos varían, para esto se calcula el valor t y seguidamente con dicho valor se calcula el valor p . Obtenido el valor- p se determina si la diferencia presentada en los grupos es estadísticamente significativa, donde los valores- p menores a 0,05 fueron estadísticamente significativos. Aparte de los dos análisis univariados también se determinó el FDR, que nos determina cuál de los datos son falsos descubrimientos, para el cálculo del FDR se usan los valores- p , donde en este caso se tomaron los valores- p menores a 0,05. El análisis FDR toma todos los valores- p menores a 0,05 y los ordena de menor a mayor, inmediatamente se ajustan los valores- p con la siguiente fórmula: $FDR = \text{valor-}p * (\# \text{ total de valor-}p / \text{rango del valor-}p \text{ medido})$, a partir de estos datos se obtiene nuevos valores- p (FDR). Un metabolito es considerado estadísticamente significativo si su valor- p y FDR es menor a 0,05, de lo contrario son falsos descubrimientos. (Storey, 2011)

2.2.6 Análisis UHPLC-Orbitrap-MS. Una alícuota de 500 μL de muestra filtrada se usó para ser analizadas por el equipo UHPLC-Orbitrap-MS DionexTM UltimateTM 3000 (Thermo scientific, Germering), equipado con un desgasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG-3400RS), un inyector automático (WPS-300TRS) y una unidad termostataada para columna (TCC-3000RS). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Hypersil GOLDTM aQ (Thermo scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.) de 100 x 2,1 mm d.i., 1.9 μm de tamaño de partícula. La unidad termostataada se mantuvo a 30 °C. La fase móvil fue ácido fórmico al 0,2% en agua (A) y ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo (B). La condición inicial de gradiente fue la siguiente:

100% de A cambiando linealmente a 100% de B en 8 min, se mantuvo constante 4 min, se regresó a 100% A en 1 min y se mantuvo en equilibrio durante 3 min. Los flujos fueron de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el volumen de inyección 1 μL . El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas OrbitrapTM Exactive plus (Thermo scientific, Bremen, Alemania) a través de una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), operada en modo positivo, a 350 °C. El nitrógeno (>99%) para la HESI-II se obtuvo de un generador NM32LA (Peak Scientific, Scotland, Reino Unido). La temperatura del capilar fue de 320 °C y el voltaje del nebulizador fue de 3,5 kV. Los flujos de nitrógeno usados como gas sheath y gas auxiliar se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. La resolución del detector de masas Orbitrap, para el modo barrido completo (Full MS Scan), se ajustó a 70000 (Full-Width-at-Half-Maximum, a m/z 200, R_{FWHM}), usando un control de ganancia automático (AGC) de 3×10^6 y un tiempo de inyección en la cámara C-trap de 200 ms. Para estudiar los patrones de identificación, los iones se enviaron a la celda de colisiones HCD (High-Energy Collisional Dissociation) usando a diferente energía (20, 30, 40 y 50 eV) en el modo de barrido por pasos (Stepped Scan). Los espectros de masa se registraron en el modo AIF (All-Ion fragmentation) para cada energía de colisión, a una resolución R_{FWHM} de 35000, usando AGC de 3×10^6 y un tiempo de inyección en la cámara C-trap de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango m/z 80-1000. Antes de la adquisición, el detector Orbitrap se calibró en modo positivo con una solución de referencia, preparada en el laboratorio, que contenía n-butilamina, dodecilsulfato de sodio, taurocolato de sodio hidratado, cafeína, acetato de Met-Arg-Phe-Ala y una solución estándar UltramarkTM 1621 Mass Spec. La solución de calibración se preparó en acetonitrilo:metanol:agua con ácido acético (1%), siguiendo el procedimiento descrito en el manual de operaciones del OrbitrapTM Exactive plus (Thermo Fisher

Scientific, P/N 1323060, Revisión A, 2012). Esta misma metodología se usó para el modo de ionización negativo.

2.2.7 Procesamiento y análisis estadístico de datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. Para el procesamiento se usó el software libre XCMS (versión 3.7.1), este software se usó para realizar alineamiento y deconvolución del grupo control, tratamiento y blanco (fase móvil acetonitrilo ACN), una vez se obtuvieron estos datos se procedió a realizar los análisis estadísticos, usando el software libre MetaboAnalyst (versión 4.0), lo primero que se realizó fue una normalización por la suma total de áreas, transformación logarítmica y un escalado de los datos mean centering para cada réplica de grupo control y tratamiento. Posteriormente se determinó la variable “veces de cambio (Fold change, FC), t-test y análisis de componentes principales (PCA), una vez se obtuvieron las masas que presentaron alguna diferencia entre los datos y las que fueron estadísticamente significativas, se procedió a la identificación tentativa de los metabolitos correspondientes a cada una de las masas (relación masa/carga) encontradas; esto se hizo mediante el uso del software online CEU mass mediator (versión 1.0), que cuenta con bases de datos como Metlin, MINE, Lipid Maps, KEGG y HMDB. Posteriormente se determinó las rutas metabólicas posiblemente implicadas por la alteración de los metabolitos identificados, con ayuda del software MetaboAnalyst (versión 4.0). Fold Change, T-test y FDR, se determinaron siguiendo un procedimiento similar al descrito en la sección 3.2.5.

2.3 Resultados y discusión.

La concentración utilizada para el compuesto FM50 en los ensayos previamente realizados en la línea celular HepG2, fue determinada en la tesis doctoral de Yenny Bueno, mediante el uso del

ensayo de viabilidad, donde a una concentración de 25 μM se presentó la concentración mínima inhibitoria (MIC 70 y 90). En la figura 17 se muestran los ensayos de viabilidad, de los cuales fue determinada la concentración previamente mencionada.

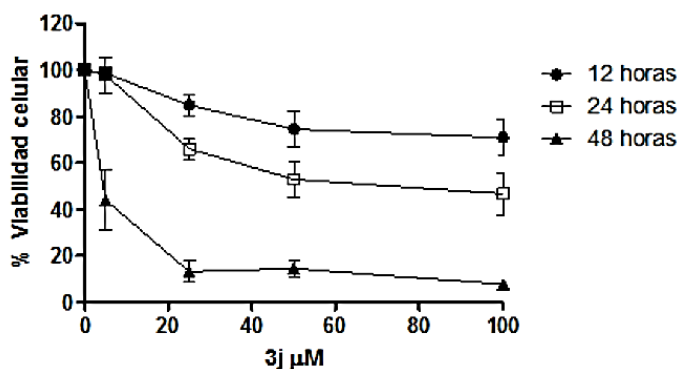


Figura 17. Ensayo de viabilidad en la línea celular HepG2, usando diferentes concentraciones del compuesto híbrido FM50 (3j).

2.3.1 Análisis de los extractos metabólicos usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), después de la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 12 horas. Los extractos metabólicos de la línea celular HepG2 una vez obtenidos y analizados por GC-MS, se procedió a realizar la identificación de cada uno de los picos (señales cromatográficas) en el cromatograma con la ayuda de la base de datos NIST, en cada cromatograma se identificó un total de 30 señales y de estas, 11 fueron asignadas a metabolitos con algún tipo de alteración en su concentración, presencia o ausencia. Posteriormente se procedió a realizar tratamiento de datos para lo cual lo primero que se realizó fue la normalización, seguido de alineamiento y deconvolución de cada uno de las muestras; seguido se realizó cuantificación relativa de cada una de los metabolitos identificados mediante Fold Change (FC). Seguidamente se realizó análisis de componentes principales (PCA) y T-test, una vez se determinó cuales masas

fueron estadísticamente significativas se procedió a realizar una deducción de las rutas metabólicas que se ven afectadas por la alteración de dicho metabolitos.

2.3.1.1 Perfil metabólico e identificación tentativa usando la base de datos NIST. En la figura 18, se observa el cromatograma de una de las réplicas del grupo control, donde cada uno de los picos pertenece a la relación masa/carga (m/z) de cada uno de los espectros generados por el detector del equipo, para la identificación de cada uno de los espectros obtenidos se procedió a usar la base de datos NIST, donde esta base compara los espectros de masa obtenidos experimentalmente de cada una de las moléculas que se pudieron separar por cromatografía con los espectros de referencia reportados en la base de datos espectral. En la imagen se muestra una comparación entre el espectro experimental (rojo) y el espectro de referencia (verde) del ácido L-glutámico presentando una probabilidad de semejanza entre los espectros de 91.06%, lo que nos indica que el espectro de masas detectado en el tiempo de retención de aproximadamente 23.3810min podría pertenecer al ácido L-glutámico (derivatizado). Este mismo procedimiento se realizó para cada uno de los picos en los cromatogramas, cuyos espectros de masas se encuentran reportados en la sección de anexos.

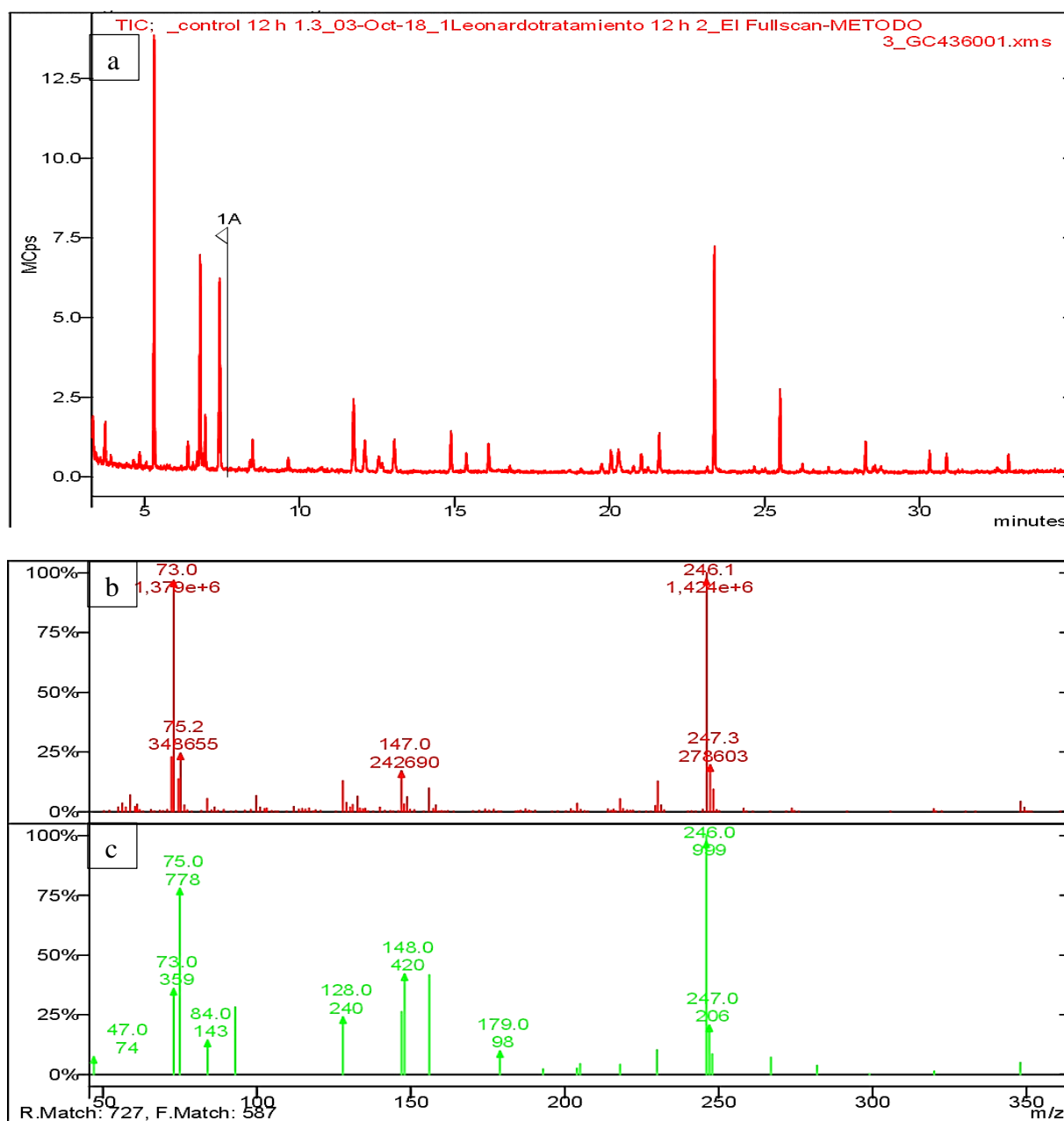


Figura 18. a) Perfil metabólico obtenido por GC-MS para muestra control de la línea celular HepG2, b) espectro de masas experimental y c) espectro de masas de referencia para el metabolito identificado como ácido L-glutámico (tR=23.3810 min, score de similitud 96.01%).

En la tabla 1 se muestran los metabolitos que fueron identificados tentativamente con la base de datos NIST-MS, donde podemos observar que en algunos metabolitos identificados la probabilidad es relativamente baja, pero al hacer una comparación con sus espectros de masas se puede observar más similitud en sus fragmentos formados, estos espectros se encuentran la sección de anexos la comparación se encuentra en la tabla 3.

Tabla 1.

Metabolitos tentativamente identificados con la base de datos NIST MS.

Metabolito	Tr	m/z (Exp)	Probabilidad (%)
Ácido láctico	5.309	90.6323	52,6
Ácido glicólico	7.426	73.6096	65,5
Glicerol	12.098	91.6053	37,5
Manitol	16.784	172.8368	16,2
L-asparagina	20.049	143.926	23,5
Ácido L-glutámico	23.383	146.5349	90,4
Ácido cítrico	27.060	192.7569	10,4
D-glucosa	28.254	178.3777	16,0
Ácido palmítico	30.323	255.9692	94,3
Myo-inositol	30.868	173.6531	61,2
Ácido esteárico	32.863	283.9723	92,2

Nota. tR: Tiempo de retención.

2.3.1.2 Tratamientos de datos, análisis estadístico y relación de expresión metabólica de los datos obtenidos por GC-MS. En la figura 19, se observa el alineamiento de cada uno de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento, para alinear los tiempos de retención de cada uno de los grupos de datos, aparte del alineamiento se realizó la deconvolución con el fin de eliminar el solapamiento de algunos picos mediante la comparación de cada uno de los espectros de masas, ya que por cada pico en el cromatograma, presenta un espectro de masas para dicho compuesto.

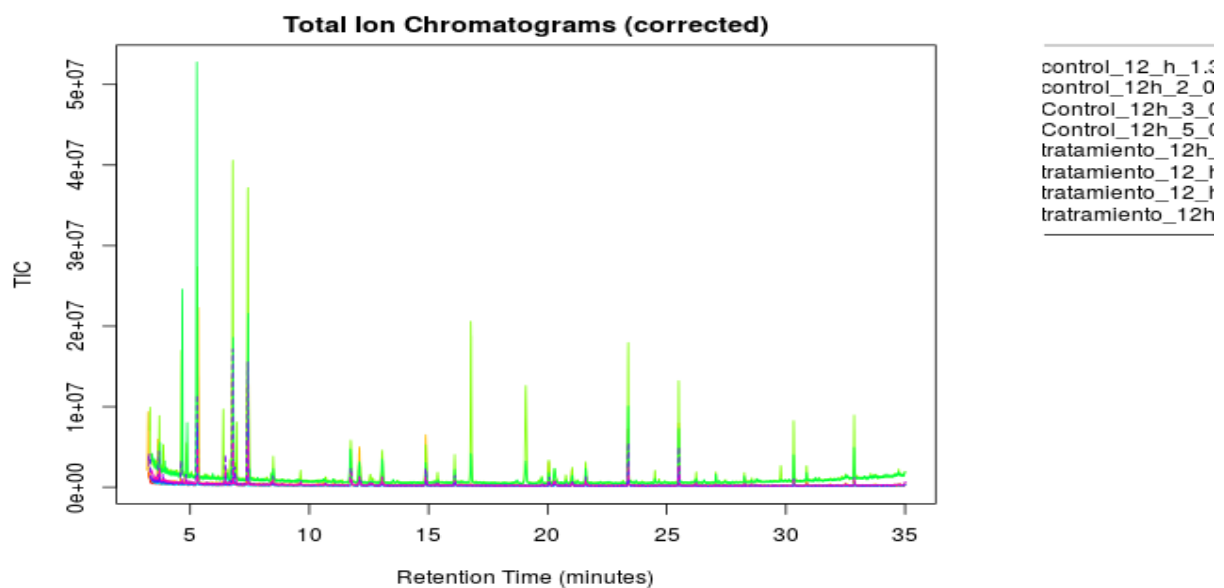


Figura 19. Alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento 12 horas, mediante el uso del software libre XCMS.

En la figura 20, se muestra el PCA score plot, el cual nos muestra una separación dimensional de dos grupos, como se puede observar en el componente principal 2 (PC 2) se muestra una ligera separación entre los dos grupos con una varianza explicada de los datos correspondiente al 22,7%; mientras que en el componente principal 3 (PC 3), existe una ligera separación entre cada una de las réplicas del grupo control y grupo tratamiento con una varianza explicada de 13,8%. Con estos

datos se podría indicar que existe una diferencia entre los datos del grupo control y grupo tratamiento, en este caso sería el grupo control y tratamiento, aunque no sea una separación notoria. A partir de este análisis permite visualizar los datos de una forma global, explicando la mayor variabilidad de los mismos; evidencia de ello es la separación de los grupos en las dos componentes analizadas, sugiriendo que existen diferencias entre los dos grupos, por ende indicando algún tipo de alteración de los datos del grupo tratamiento al ser comparados con los datos del grupo control (López-Roldán & Fachelli, 2016).

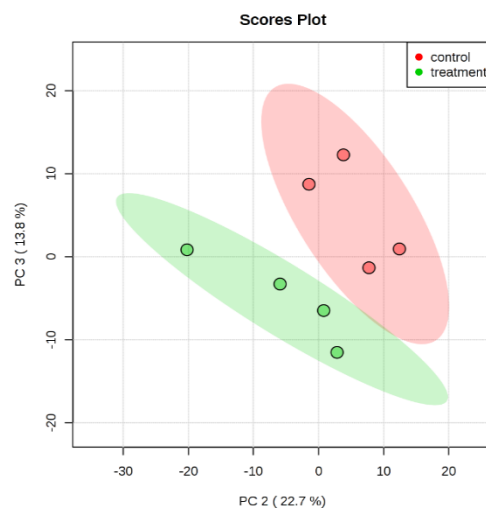


Figura 20. Análisis de Componente Principales (PCA, score plot) de los resultados obtenidos por GC-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde).

En la tabla 2 y 4 se muestran los resultados del análisis estadístico univariados con base en los cambios de variación metabólica (Fold Change), donde el primer análisis compara el valor absoluto entre dos promedios de grupo; en este caso la comparación sería entre el grupo control y grupo tratamiento, donde se tomaron los metabolitos que presentaron un Fold change mayor a 2,

presentándose 11 metabolitos, posteriormente se procedió a identificar tentativamente estos metabolitos donde la probabilidad de semejanza variaba de 16% a 98%. Seguidamente para los metabolitos que presentaron un error relativo mayor a 0,8% se compararon los iones de fragmentación del espectro experimental y el espectro de referencia (NIST), estos datos se observan en la tabla 3 y sus espectros se relacionan en la sección de anexos (B. J. Xia, 2012).

Tabla 2.

Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 12h.

Metabolito	tR	m/z (Exp)	m/z (Calc)	%ER	FC	Log2(FC)
Ácido láctico	5.309	90.6323	90.0800	0.6131	8.504	3.0881
Ácido glicólico	7.426	73.6096	76.0500	3.2089	2.309	1.2071
Glicerol	12.098	91.6053	92,094	0.5307	2.031	1.0223
Manitol	16.784	172.8368	182.1720	5.1244	21.936	4.4552
L-asparagina	20.049	143.926	132.1200	8.9358	2.060	1.0425
Ácido L-glutámico	23.383	146.5349	147.1300	0.4045	2.395	1.2602
Ácido cítrico	27.060	192.7569	192.124	0,3294	2.371	1.2455
D-glucosa	28.254	178.3777	180.1560	0.9871	2.102	1.0717
Ácido palmítico	30.323	255.9692	256.4000	0.1680	3.397	1.7641
Myo-inositol	30.868	173.6531	180.1600	3.6117	2.781	1.4756
Ácido esteárico	32.863	283.9723	284.4800	0.1785	2.190	1.1311

Nota. tR: Tiempo de retención, ER: Error Relativo, FC= Fold Change (veces de cambio). En la tabla superior se presentan los metabolitos que presentaron cambios con respecto al control después de la exposición por un periodo de 12 horas con el compuesto FM50, el valor entre 0-0.5 en Fold Change (FC) representa los metabolitos sobre-

expresados (inducidos o que se encuentran en mayor cantidad) y valor mayores que 2 representa los metabolitos inhibidos.

Tabla 3.

Análisis comparativo de los iones de fragmentación para los espectros teóricos y experimentales

Metabolito	tR	Iones producto (m/z, exp.)	Iones producto (m/z) de referencia - base de datos NIST
Ácido glicólico	7.426	59.0, 73.0	59.0, 73.0
Manitol	16.784	55.6, 73.1, 89.4, 96.0, 103.0, 114.7, 132.1,	56.0, 73.0, 91.0, 97.0, 103.0, 115.0, 133.0
L-asparagina	20.049	73.0, 116.9	73.0, 116.0
Ácido cítrico	27.060	72.8, 74.5, 116.9, 147.0, 275.3	73.0, 75.0, 117.0, 275.0
D-glucosa	28.254	73.0, 102.8, 117.0, 160.0	73.0, 103.0, 119.0, 163.0
Myo-inositol	30.868	73.2, 146.8	73.0, 147.0

Nota: tR: Tiempo de retención. En la tabla superior se realiza una comparación entre los iones fragmento obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS y los iones producto (referencia base de datos NIST), para los metabolitos que presentaron porcentajes de error superiores a 0.9%.

Tabla 4.

Análisis estadístico univariado T-test del grupo control con respecto al grupo tratamiento 12 horas

Metabolito	tR	m/z(Exp)	Valor p	FDR
Ácido láctico	5.309	90,6323	0.040521*	0.6551
Ácido glicólico	7.426	73,6096	0.23001	0.66827

Glicerol	12.098	91,6053	0.097489	0.6551
Manitol	16.784	160,930	0.12775	0.6551
L-asparagina	20.049	143,926	0.005*	0.670
Ácido L-glutámico	23.383	146,5349	0.18649	0.6551
Ácido cítrico	27.060	200,7848	0.15711	0.6551
D-glucosa	28.254	205.004	0.13836	0.6551
Ácido palmítico	30.323	255,9692	0.054069	0.6551
Myo-inositol	30.868	173,6531	0.12209	0.6551
Ácido esteárico	32.863	269,0572	0.24284	0.67109

Nota. tR: tiempo de retención, **FDR:** Tasa de descubrimientos falsos (False Discovery Rate). Datos identificados con asterisco (*) representan metabolitos estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

A partir de los datos obtenidos previamente para el análisis de los extractos metabólicos de 12 horas de tratamiento analizados por GC-MS, se pudo observar una alteración en los perfiles metabólicos del grupo tratamiento al ser comparados con el grupo control, donde con la base de datos se pudo identificar tentativamente cuales fueron los metabolitos que presentaron dicha alteración. En la tabla 2 se observa que las masas moleculares de los metabolitos identificados (myo-inositol, D-glucosa, L-asparagina, manitol y ácido glicólico) con los reportados teóricamente presentaron un error relativo mayor a 0,9%, para mitigar este error y acercarse más en la identificación de los metabolitos, se comparó los iones de fragmentación obtenidos experimentalmente con los reportados en la base de datos. Al realizar la comparación se observó que en al menos 2 o más fragmentos para cada una de las masas coincidían con el de referencia, en la tabla 3 se observa dicha comparación, lo cual con estos datos podríamos tener un poco más

de certeza en la identificación. En la tabla 4 se observan los metabolitos que presentaron un valor p menor a 0,05, considerándose estadísticamente significativos; sin embargo, el FDR obtenido fue mayor a 0,05, indicando así que corresponden a posibles falsos descubrimiento. Los resultados anteriores evidencian que el compuesto FM50 genera una ligera alteración en la concentración de algunos metabolitos (ácido láctico y L-asparagina) de la línea celular HepG2, los cuales presentaron valores Fold Change 8.504 y 2.060, respectivamente, indicando aumento en la concentración de dichos metabolitos con respecto al control.

2.3.2 Análisis de los extractos metabólicos usando cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-Orbitrap-MS), después de la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 12 horas. En esta sección se presentan los análisis de los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS, a los cuales se les realizó deconvolución y alineamiento, detectándose 886 y 432 características de relación masa/carga (mz) en modo de ionización positiva y negativa, respectivamente. Seguidamente se realizó una cuantificación relativa usando “las veces de cambio (FC)” como variable de comparación, donde se pudo determinar alteración en 15 y 10 señales de los cromatogramas obtenidos en modo de ionización positivo y negativo, respectivamente. Posteriormente se procedió a identificar cada una de las masas usando el software CEU mass mediator (versión 1.0). Una vez determinadas las masas que presentaban alguna diferencia en abundancia, se procedió a determinar si existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para luego correlacionar tales metabolitos con las rutas metabólicas posiblemente alteradas.

2.3.2.1 Análisis estadístico y relación de expresión metabólica de los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. En la figura 21, se observa el alineamiento de cada uno de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento, esto con el fin de alinear los tiempos de retención de cada uno de los grupos, aparte del alineamiento se realizó la deconvolución con el fin de eliminar el solapamiento de algunos picos, en la sección 3.2.5 se explica el procedimiento utilizado.

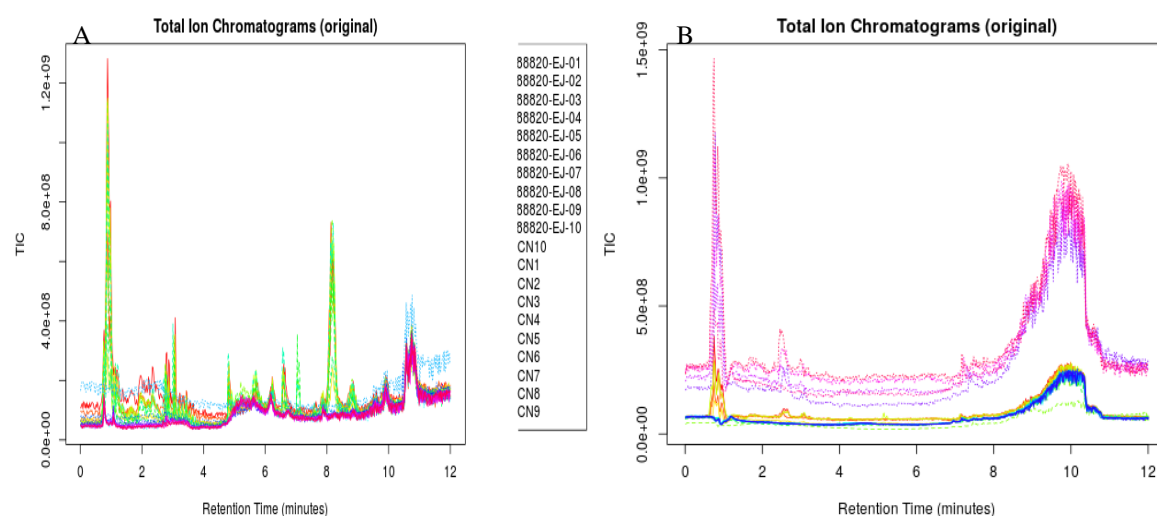


Figura 21. Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento 12 horas para los datos obtenidos por UPLC-Orbitrap-MS .A) modo de ionización positivo y B) modo de ionización negativo.

En la figura 22, se ilustran los análisis de componentes principales con un nivel de confianza del 95%, en la figura 21A se observa el PCA score plot para los análisis obtenidos en modo de ionización positiva, el cual muestra una explicación de la varianza de los datos de aproximadamente 50%. En la componente 1 (PC1), se muestra una buena separación de los datos, indicando que existe una diferencia entre los datos del grupo control y grupo tratamiento,

relacionadas con posibles alteraciones en dichas características. En figura 21B se observa el PCA score plot, para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS en modo de ionización negativo, en el componente 1 PC1, existe una ligera separación en cada una de las réplicas del grupo control y grupo tratamiento con una varianza explicada de 38,5%. Con estos datos se podría indicar que existe una diferencia entre los datos del grupo control y grupo tratamiento, en este caso sería la componente control y tratamiento. A partir de este análisis se puede inferir que características de relación masa/carga (m/z) presentan diferencias en la abundancia relativa entre el grupo control y el grupo tratamiento (exposición al compuesto FM50) (López-Roldán & Fachelli, 2016)

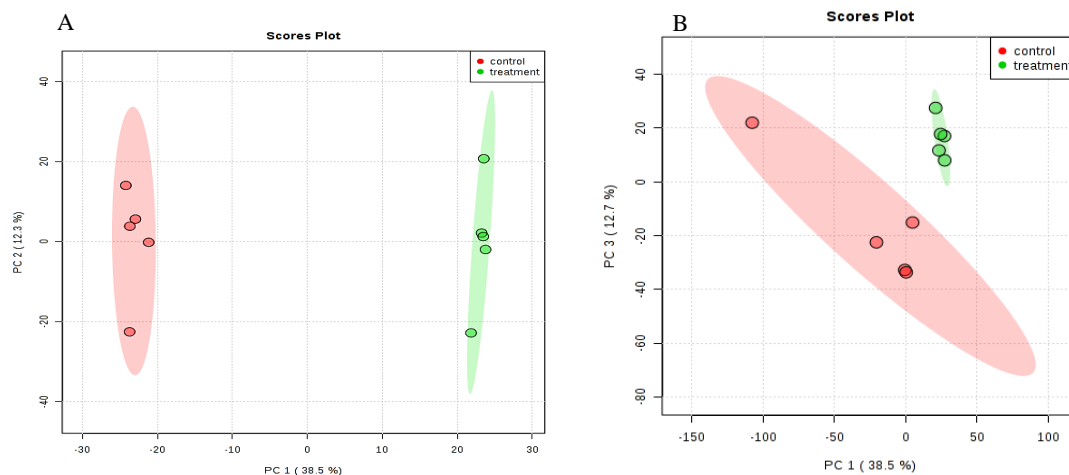


Figura 22. Análisis de componente principales (PCA) de los resultados obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en modo de ionización. A) modo positivo, B) modo negativo.

En la tabla 5 y 6 se muestran los resultados del análisis estadístico univariados con base en los cambios de variación metabólica (Fold Change), donde el primer análisis compara el valor

absoluto entre dos promedios de grupo; es decir, entre el grupo control y el grupo tratamiento, donde se tomaron los metabolitos que presentaron un Fold change mayor a 2 y menores a 0,5, presentándose 24 metabolitos, de los cuales 16 presentaron un aumento en la concentración en el grupo tratamiento al ser comparados con el grupo control. Posteriormente se procedió a identificar tentativamente estos metabolitos, una vez identificados, se realizó una comparación de las masas moleculares obtenidos con las masas teóricas de cada uno de los metabolitos; de los cuales 6 metabolitos presentaron error relativo superior al 0.1%. (B. J. Xia, 2012) Seguidamente se realizó el segundo análisis (T-test), con este análisis se puede determinar si las medidas de dos grupos varían, para esto se calcula el valor t y seguidamente con dicho valor se calcula el valor p . Obtenido el valor- p se determina si la diferencia presentada en los grupos es estadísticamente significativa, este análisis se realizó a los datos obtenidos por el análisis UHPLC-Orbitrap-MS del grupo control con respecto a los obtenidos en el grupo tratamiento, donde los valores- p menores a 0,05 fueron estadísticamente significativos. De los 24 metabolitos identificados, 7 presentaron valor p menor a 0,05 (J. Xia, Psychogios, Young, & Wishart, 2009). Aparte de los dos análisis univariados también se determinó el FDR, procedimiento similar al descrito en la sección 3.2.5. Un metabolito es considerado estadísticamente significativo si su valor- p y FDR es menor a 0,05, de lo contrario son falsos descubrimientos. (Storey, 2011)

Tabla 5.

Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 12h

Metabolito	m/z(Exp)	m/z(Calc)	Aducto	%ER	FC	Log2(
			Exp.			FC)
L-isoleucina	132.0766	132.1808	M+H	0.0795	0.471	-1.085

Ácido piroglutámico	146.1126	146.1213	M+H ₂ O- H	0.0247	0.318	-16.539
Pirofosfato	174.9187	174.9198	M+H	0.0007	0.281	-18.339
L-Triptófano	207.2808	206.2409	M+2H	0.3854	29.811	15.759
Ácido 8,11,14- eicosatrienoico	305.1585	305.49824	M+H- H ₂ O- NH ₄	0.1033	1.34E-4	-12.867
Citrulina	214.0579	214.1940	M+K	0.0777	20.104	10.075
Arginina	231.1494	231.3146	M+K+H ₂ O	0.0948	0.0003	-11.797
5'-Deoxy-5'- fluoroadenosina	270.1010	270.1003	M+H	0.0003	0.412	-12.802
Asparaginil-Arginina	271.1539	271.1473	M- H ₂ O+H	0.0023	43.112	21.081
Pentadecanal	303.1495	303.5867	M+2K-H	0,1188	0.0002	-12.115
Citidina difosfato	420.2485	421.2145	M+NH ₄	0.2396	0.0002	-12.536
Desconocido	427.1622	-	-	-	0.4216	-1.246
LysPE(16:1(9Z)/0:0)	434.2645	434.2625	M+H- H ₂ O	0.0004	0.0002	-12.014
Desconocido	442.3490	-	-	-	31.849	16.713
Desconocido	584.4745	-	-	-	21.385	10.966

Ácido cítrico	157.0144	157.0044	M- H+2H ₂ O	0.0052	5.551	2.473
Glucosa	179.0537	179.1481	M-H	0,0524	5.37E-9	-27.474
Ácido Pantoténico	218.1012	218.1028	M-H	0.0007	0.457	-1.129
L-Formilquinurenina	235.0717	236.0797	M-H	0.0000 4	0.431	-1.213
Nicotinate ribonucleoside	239.0769	239.0748	M- H+H ₂ O	0.0008	0.490	-1.029
Ácido Neuramínico	266.0856	266.2253	M-H	0.0523	0.483	-1.051
Desconocido	337.0420	-	-	-	0.485	-1.045
Ácido Eicosadienoico	307.0593	307.4907	M-H	0.1398	2.175	1.121
4'- fofopantotenoilcistein a	441.0472	440.1766	M+K-H	0.1489	3.580E 8	28.415

Nota. ER: Error Relativo, FC= veces de cambio (Fold Change). En la tabla superior se presentan los metabolitos que presentaron cambios con respecto al control después de la exposición por un periodo de 12 horas con el compuesto FM50, el valor entre 0-0.5 en Fold Change (FC) representa los metabolitos sobre-expresados (inducidos o que se encuentran en mayor cantidad) y valor mayores que 2 representa los metabolitos inhibidos.

Tabla 6.

Análisis estadístico univariado T-test del grupo control con respecto al grupo tratamiento 12 horas

Metabolito	m/z	Valor p	FDR	Modo de ionización
L-isoleucina	132.0766	0.1414	0.9866	+

Ácido piroglutámico	146.1126	0.0454	0.9866	+
Pirofosfato	174.9187	0.0518	0.9866	+
L-Triptófano	207.2808	0.0615	0.9866	+
Ácido 8,11,14-eicosatrienóico	305.1585	2.63E-06*	2.79E-04	+
Citrulina	214.0579	0.9556	0.9992	+
Arginina	231.1494	7.26E-03*	3.08E-01	+
5'-Deoxy-5'-fluoroadenosina	270.1010	0.1475	0.9866	+
Asparaginil-Arginina	271.1539	0.0853	0.9866	+
Pentadecanal	303.1495	5.07E-07*	7.16E-05	+
Citidina difosfato (CDP)	420.2485	3.31E-03*	1.56E-01	+
LysoPE(16:1(9Z)/0:0)	434.2645	2.97E-07*	7.16E-05	+
Ácido cítrico	157.0144	0.8146	0.9408	-
L-Formilquinurenina	235.0717	0.2704	0.6422	-
Nicotinate D-ribonucleoside	239.0769	0.1796	0.6422	-
Ácido Neuramínico	266.0856	0.4156	0.6540	-
Ácido Eicosadienóico	307.0593	0.0343	0.6422	-
4'-fofopantotenoilcisteina	441.0472	2.30E-11*	2.407E-9	-
Glucosa	179.0537	1.95E-11*	2.16E-09	-

Nota. LysoPE (16:1(9Z)/0:0): 1- (9Z-hexadecenoyl) -glicero-3-fosfoetanolamina, FDR: Tasa de descubrimientos falsos (False Discovery Rate). Datos identificados con asterisco (*) representan metabolitos estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

2.3.3 Análisis de rutas metabólicas afectadas en la línea celular HepG2 por la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 12 horas. Para el análisis de las rutas metabólicas afectadas se emplearon aquellos metabolitos con valor p y FDR menor a 0,05. Para este análisis se utilizaron en conjunto los metabolitos identificados tanto por GC-MS y UHPLC-Orbitrap-MS.

En tabla 7, se muestran 8 rutas metabólicas posiblemente afectas en la línea células HepG2, por la exposición al compuesto FM50, donde los hits son la cantidad de metabolitos de estudio que se encuentran involucrados en cada una de las rutas metabólicas.

Tabla 7.

Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 12h.

Rutas metabólicas	Total	Hits	Metabolitos
Metabolismo Aspartato	30	2	L-arginina y L-asparagina
Metabolismo Arginina y Prolina	47	1	L-arginina
Pantotenato y Biosíntesis de CoA	19	1	4'-fofopantotenoilcisteina
Ácido alfa linolénico y metabolismo del ácido linoleico	17	1	Ácido 8,11,14- Eicosatrienoico
Ciclo Urea	25	1	L-arginina
Glicolisis	23	1	D-Glucosa
Metabolismo de pirimidina	52	1	CDP
Efecto Warburg	52	1	D-Glucosa

Nota. En la tabla se muestran aquellos metabolitos que presentaron variación en concentración durante el tratamiento ($p < 0.05$, $FDR < 0.05$) y su relación con las rutas de biosíntesis posiblemente alteradas, tanto para los análisis realizados por GC-MS y UHPLC-Orbitrap-MS.

En la figura 23 se muestra un panorama general de las rutas metabólicas afectadas, entre las que se resalta la glucólisis, debido que la célula presenta acumulación de glucosa acompañado de disminución del ácido láctico (producto mayoritario de la glicolisis (efecto Warburg)), probablemente debido a una disminución en el metabolismo de la glucosa por la célula, siendo esta la principal fuente de energía en las células cancerígenas (Fadaka et al., 2017). La célula al no poder metabolizar la glucosa como lo hace en condiciones normales, podría activar el metabolismo del ácido linoleico; y por ende, activar la β -oxidación de ácidos grasos que se produce en la mitocondria y en el peroxisoma; sin embargo, puesto que los resultados muestran una acumulación del Ácido 8,11,14-Eicosatrienoico durante el tratamiento celular con el compuesto FM50, podría sugerir una posible inhibición o alteración (parcial o total) de la oxidación de ácidos grasos (Zhang, Ibrahim, Sun, & Tang, 2015). Otra alternativa que la célula podría usar para la obtención de energía, es el uso de aminoácidos, en este caso a través del metabolismo de la L-asparagina, aminoácido que es metabolizado y que previene la muerte celular por apoptosis cuando el metabolismo de la L-glutamina (aminoácido necesario en líneas cancerígenas para la biosíntesis de macromoléculas) está alterado o inhibido. La L-asparagina sirve para mantener el ciclo de Krebs, ya que puede pasar a oxaloacetato, que a su vez pasa a citrato, metabolito esencial para la biosíntesis de lípidos y ácidos grasos respectivamente, y así poder mantener la supervivencia y la proliferación celular (Pavlova et al., 2018). Como se observa en la figura 23, la concentración de L-asparagina tiende a reducirse durante el tratamiento,

soportando la hipótesis de una activación acelerada en el metabolismo de este aminoácido o también, a causa de la inhibición en el sistema transportador de aminoácidos. El aumento en la biosíntesis de pentadecanal y LysoPE(16:1(9Z)/0:0), se asume que provienen de la L-asparagina, debido a que este metabolito es precursor de lípidos y ácidos grasos, aunque no se ha reportado en estudios previos estos hallazgos, en el presente estudio se observó aumento en la concentración de estos dos metabolitos y una disminución de la L-asparagina, posiblemente confirmando lo anteriormente planteado. La conversión de oxaloacetato en citrato, una reacción bioquímica involucrada en el ciclo de Krebs, requiere la participación de Coenzima A (CoA). Como puede apreciarse en los resultados, el metabolito 4'-fosfopantotenoilcisteína, precursor en la biosíntesis de CoA, tiene una tendencia a disminuir en la célula durante la exposición al tratamiento, resaltando un posible aumento en la biosíntesis de CoA o posiblemente debido a la inhibición en alguna etapa de la biosíntesis de dicho metabolito (Zhang et al., 2015). Se pudo confirmar la disminución en la concentración de la CoA, ya que la citidina difosfato (CDP), se encontró que después del tratamiento presentó aumento en su concentración, cabe recalcar que este metabolito es precursor en la biosíntesis de CoA, se ha reportado que la CDP es precursor en la síntesis de ARN y replicación de ADN (Counihan et al., 2018); otra alteración notoria es la acumulación de L-arginina. La L-arginina es un aminoácido que no puede ser sintetizado en las células cancerígenas debido a la inhibición de la enzima arginosuccinasa sintasa (enzima encargada de sintetizar la L-arginina a través de la Citrulina); por ende, la célula lo adquiere exógenamente. La L-arginina es esencial en las células cancerígenas, ya que sirve como sustrato para la síntesis de óxido nítrico (NO), donde puede estar involucrado en la inhibición de la muerte celular programada, crecimiento celular, proliferación celular y estimulación de los factores de crecimiento angiogénicos. Como se evidencia en los resultados, se presenta una acumulación de L-arginina

indicando la posible inhibición del ciclo de la ornitina y la producción de NO (Szeffel et al., 2019). En consecuencia, este último es esencial en la inhibición de muerte celular programada, crecimiento y proliferación celular, de acuerdo a lo anterior posiblemente esto llevaría a un efecto negativo sobre la proliferación celular. Otra posible causa de acumulación de L-arginina, es la reducción en la captación de aminoácidos en la célula, inhibiendo las proteína de transporte de membrana (Lind, 2004). Es así como, mediante los resultados obtenidos previamente, es posible inferir que la célula realiza dichas alteraciones como mecanismo de defensa para regular la concentración de ATP y su correcto funcionamiento; sin embargo, a causa del déficit de sustratos para la producción de ATP debido a la afección del metabolismo de la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos, los esfuerzos de supervivencia celular no son suficientes, pues sus fuentes mayoritarias de energía están inhibidas. La L-asparagina, la única fuente de energía disponible, sería incapaz de suministrar las grandes cantidades de energía necesarias en las células cancerígenas para poder crecer y proliferar, en consecuencia muy probablemente cuando la concentración de este aminoácido disminuya en la célula o no pueda ser captada del medio, esta podría activar algún tipo de muerte celular (Pavlova et al., 2018), en este caso apoptosis, como fue reportado en ensayos realizados anteriormente por la estudiante de doctorado Yenny Bueno Duarte, indicando muerte celular por apoptosis en la línea celular HepG2 por el uso del compuesto FM50 (Duarte, 2018).

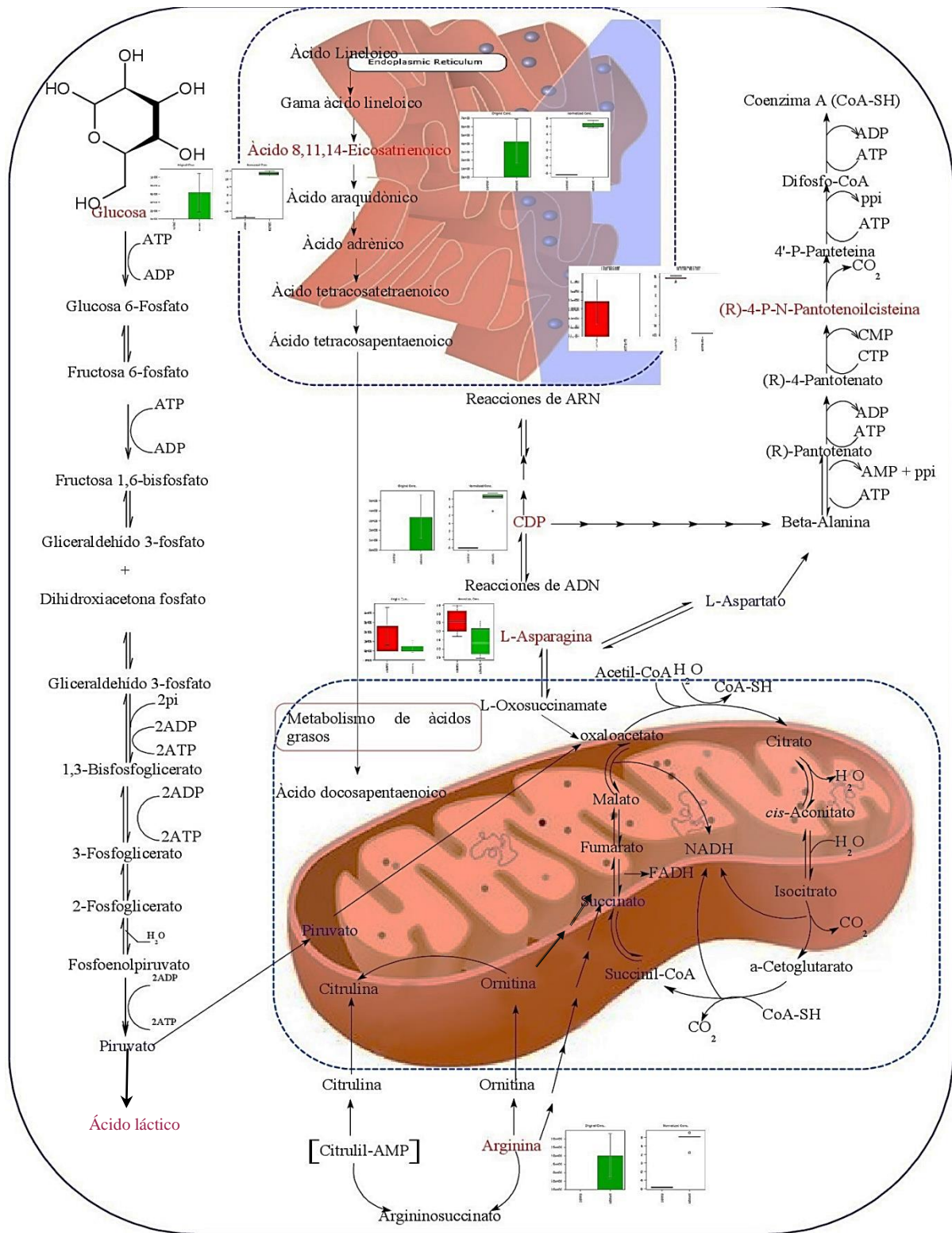


Figura 23. Rutas metabólicas posiblemente alteradas en la línea celular HepG2 durante la exposición al compuesto FM50.

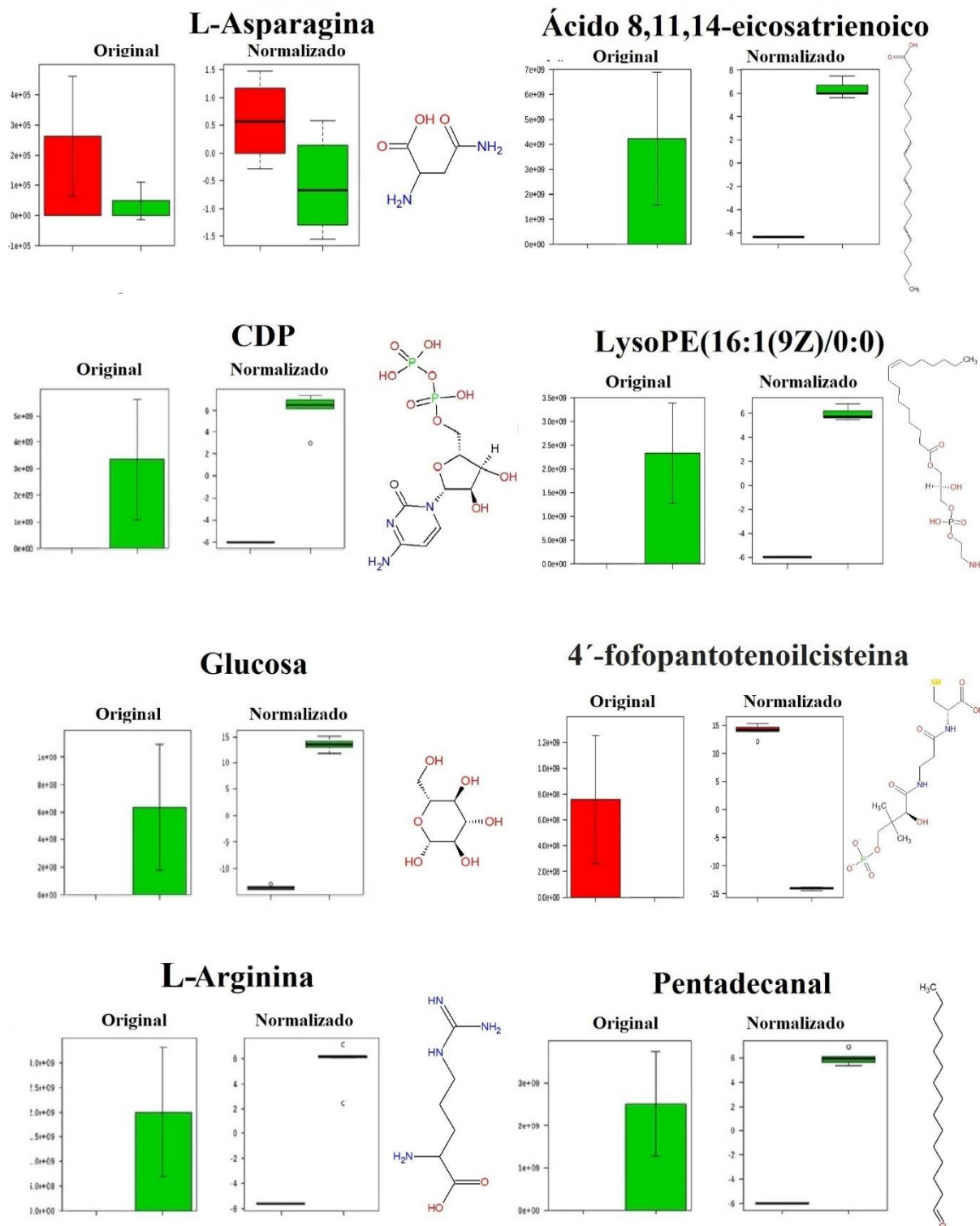


Figura 24. Diagramas box-plot de los metabolitos que presentaron valor p menor a 0,05, donde las barras verdes pertenecen al tratamiento y las rojas al control.

2.3.4 Análisis de los extractos metabólicos usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), después de la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 24 horas. En cada cromatograma se pudo identificar aproximadamente 30 señales y de estas, 5 fueron asignadas a metabolitos con algún tipo de alteración en su concentración, presencia o ausencia. Los tratamientos de datos para esta sección se explican detalladamente en la sección 3.3.1

2.3.4.1 Perfil metabólico e identificación tentativa usando la base de datos NIST. En la figura 25 se observa el cromatograma de una de las réplicas del grupo control del tratamiento de 24 horas, donde cada uno de los picos pertenece a una masa detectada por el equipo, el procedimiento de la identificación se realizó al igual que en la sección 3.3.1 (a). En la imagen se muestra una comparación entre el espectro experimental (rojo) y el espectro de referencia (verde) del ácido palmítico, presentando una probabilidad de semejanza entre los espectros de 97,80%, lo que nos indica que la relación masa/carga (m/z) detectada en el tiempo de retención 30,327 min, posiblemente pertenece al ácido palmítico. Este mismo procedimiento se realizó para cada uno de los picos en los cromatogramas, cuyos espectros de masas se relacionan en la sección de anexos.

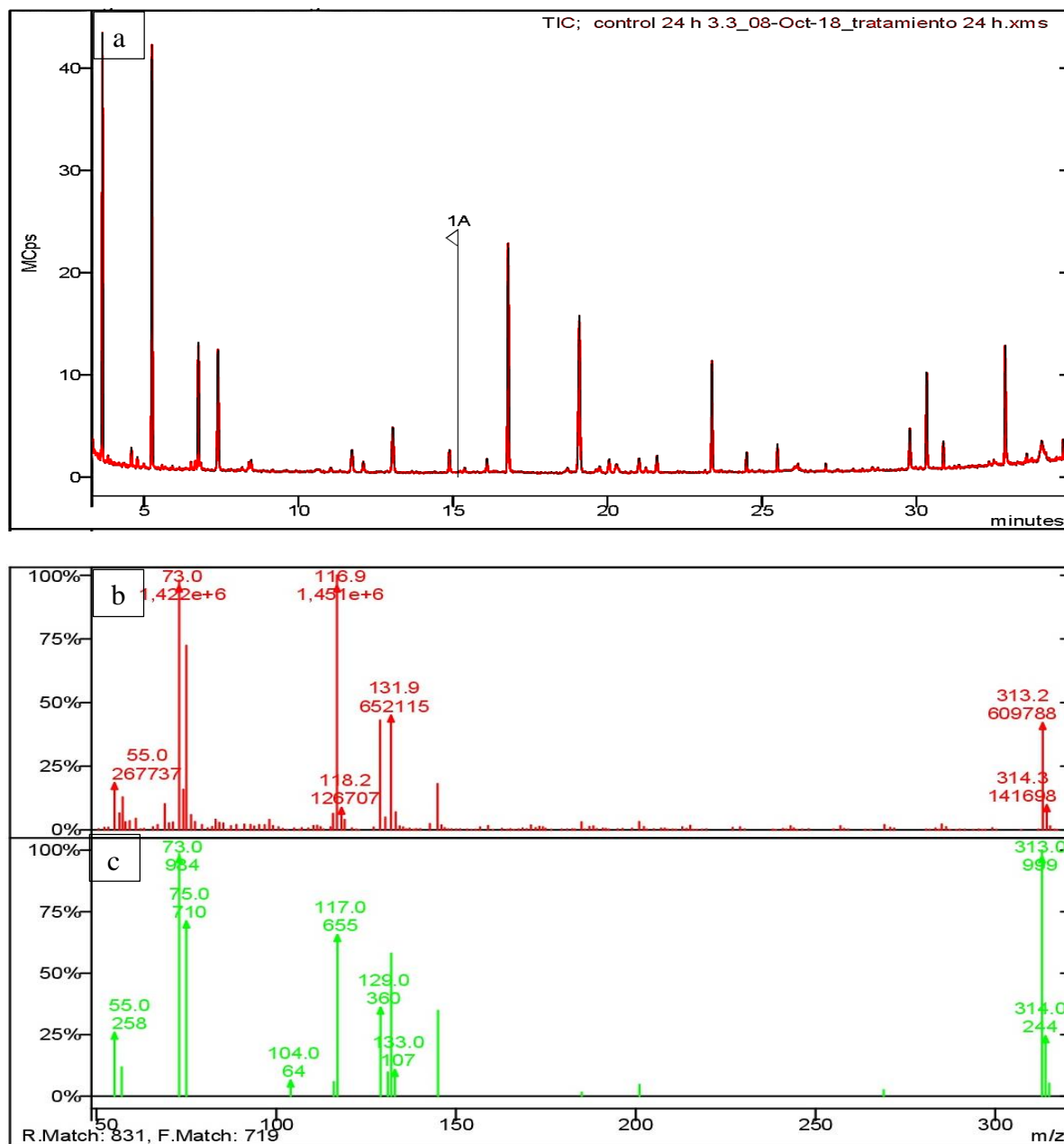


Figura 25. a) Perfil metabólico obtenido por GC-MS para muestra control de la línea celular HepG2, b) espectro de masas experimental y c) espectro de masas de referencia para el metabolito identificado como ácido palmítico ($t_R=30.3270$ min, score de similitud 97.80%).

Tabla 8

Metabolitos tentativamente identificados en el tratamiento de 24 horas, con la base de datos NIST MS

Metabolito	tR	m/z (Exp)	Probabilidad (%)
Ácido láctico	5,2649	90,6323	52,6
Glicina	6,6199	75,9438	77,9
Ácido oxálico	7,4112	90,5974	11,1
Glicerol	12,1079	91,7347	37,5
Ácido palmítico	30,3247	255,9547	94,3

Nota. tR: Tiempo de retención. En las tablas posteriores se realiza comparaciones entre las masas calculadas y encontradas.

2.3.4.2 Tratamiento de datos, análisis estadístico y relación de expresión metabólica de los datos obtenidos por GC-MS. En la figura 26 se observa el alineamiento de cada uno de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento, el procedimiento de alineamiento y deconvolución se explica en la sección 3.3.1, antes de realizar las transformaciones anteriores, los datos fueron normalizaron con respecto al estándar interno (ribitol), esto con el fin de poder realizar comparaciones más precisas entre el grupo control y grupo tratamiento.

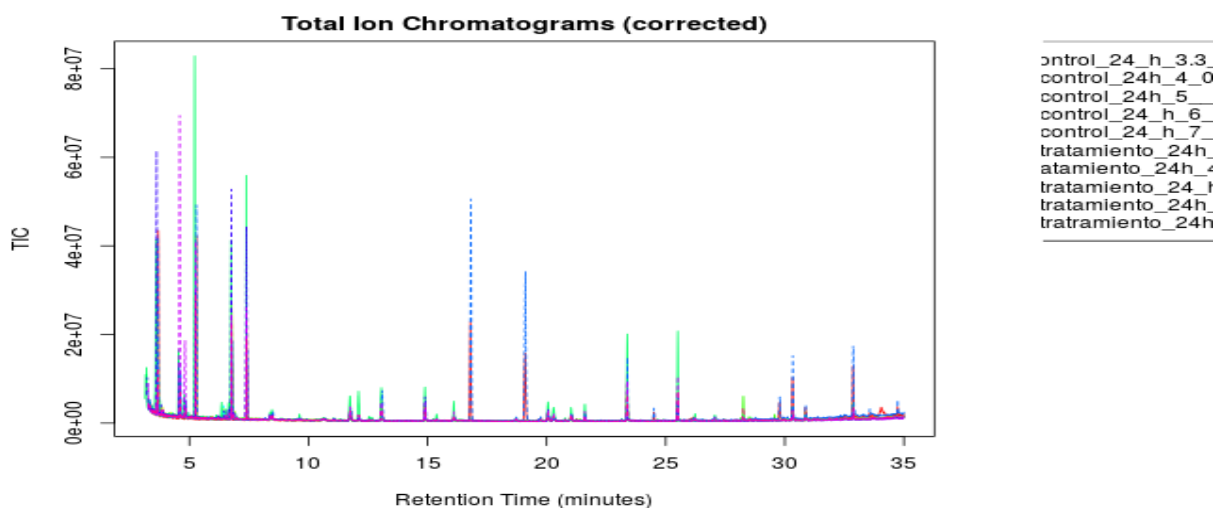


Figura 26. Alineamiento y deconvolución de los cromatogramas y espectros del grupo control y grupo tratamiento 24 horas, mediante el uso del software libre XCMS.

En la figura 27 se observa el análisis de componentes principales realizado a los datos obtenidos por GC-MS, se puede observar en el cuadrante -10 a 0 en el componente principal PC3 del gráfico, que dos de las réplicas del grupo control y grupo tratamiento presenta similitudes entre ellas, a partir de esto se podría deducir que esas réplicas no presentan alteración en sus características de relación masa-carga (m/z), pero a pesar de que estas 2 réplicas no presentaron alteración, se pudieron diferenciar 3 réplicas con alteración en sus características, como se observa en el componente principal 3 (PC3), existe una ligera separación entre cada una de las réplicas del grupo control y grupo tratamiento con una varianza explicada de 11.9%. Con estos datos se puede determinar la existencia de dos grupos correspondientes a control y tratamiento. En análisis posteriores solo se incluirán las 3 réplicas que presentaron patrones diferenciales, para comprobar si hay alteración en algunas de las características m/z (López-Roldán & Fachelli, 2016).

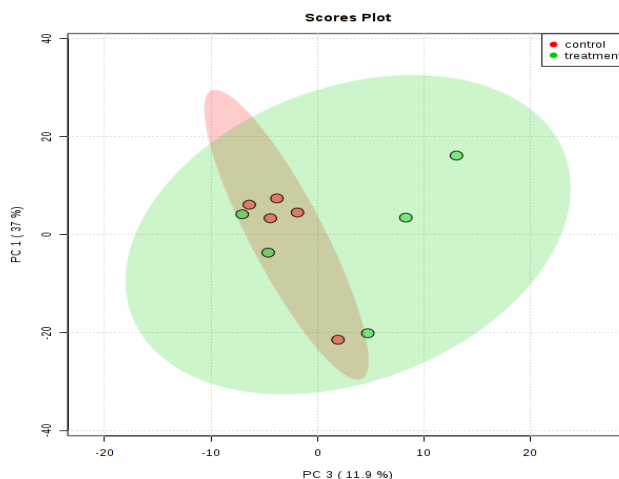


Figura 27. Análisis de componentes principales (PCA) de los obtenidos por GC-MS después de exposición al compuesto FM50 por un periodo de 24 horas de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde).

En la tabla 9 y 11 se muestran los resultados del análisis estadístico univariado con base en los cambios de variación metabólica (Fold Change), donde el primer análisis compara el valor absoluto entre dos promedios de grupo; en este caso la comparación se realizó entre el grupo control y grupo tratamiento, empleando los metabolitos que presentaron un Fold change mayor a 2 y menores a 0,5, presentándose 5 metabolitos, donde en 3 se observa aumento de la concentración en el grupo tratamiento, posteriormente se procedió a identificar tentativamente estos metabolitos donde la probabilidad de semejanza variaba de 16% a 95%. Una vez identificados se comparó con las masas teórica de cada uno de los metabolitos, presentando únicamente metabolitos con error relativo superior al 1%, donde para confirma la identificación, se realizó una comparación de los iones de fragmentación obtenidos con respecto a los iones de fragmentación de referencia (NIST), estos datos se observan en la tabla 10 y sus respectivos espectros se encuentran en la sección de anexos (B. J. Xia, 2012).

Tabla 9.

Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 24h.

Metabolito	Tr	m/z (Exp)	m/z (Calc)	%ER	FC
Ácido láctico	5.2649	90,6323	90.0779	0.6155	0.46093
Glicina	6.6199	75.9438	75,065	1.1707	0.33825
Ácido oxálico	7.4112	90.5974	90.035	0.6246	0.39531
Glicerol	12.1079	91,7347	92.0938	0.3899	3.6873

Ácido palmítico	30.3247	255.9547	256,424	0.1830	3.004
-----------------	---------	----------	---------	--------	-------

Nota. tR: Tiempo de retención, ER: Error Relativo, FC= Fold Change (veces de cambio). En la tabla superior se presentan los metabolitos que presentaron cambios con respecto al control después de la exposición por un periodo de 24 horas con el compuesto FM50, el valor entre 0-0.5 en Fold Change (FC) representa los metabolitos sobre-expresados (inducidos o que se encuentran en mayor cantidad) y valor mayores que 2 representa los metabolitos inhibidos.

Tabla 10.

Análisis comparativo de los iones de fragmentación para los espectros teóricos y experimentales

Metabolito	tR	Iones producto (m/z, exp.)	Iones producto (m/z) de referencia - base de datos NIST
Glicina	6.6199	59.0, 73.0	59.0, 73.0

Nota: tR: tiempo de retención. En la tabla superior se realiza una comparación entre los iones fragmento obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS y los iones producto (referencia base de datos NIST).

Tabla 11.

Análisis estadístico univariado T-test del grupo control con respecto al grupo tratamiento 24h

Metabolitos	tR	m/z	Valor p	FDR
Ácido láctico	5.2649	86.9359	0.5846	0.9990
Glicina	6.7689	132.4087	0.0308*	0.049
Ácido oxálico	7.4112	103.1281	0.7563	0.9990
Glicerol	12.1078	204.9227	0.0362*	0.018
Ácido palmítico	30.3247	144.8985	0.1945	0.9990

Nota. tR: tiempo de retención, **FDR:** Tasa de descubrimientos falsos (False Discovery Rate). Datos identificados con asterisco (*) representan metabolitos estadísticamente significativos (p<0.05).

A partir de los datos obtenidos previamente para el análisis de los extractos metabólicos analizados por GC-MS en 24 horas de tratamiento, es posible observar una alteración en los perfiles metabólicos del grupo tratamiento al ser comparados con el grupo control, donde se identificó tentativamente cuáles fueron los metabolitos que presentaron dicha alteración mediante la base de datos NIST. En la Tabla 9 se observa que la glicina presentó un error relativo mayor a 1% al ser comparada su masa teórica con la experimental, para mitigar este error y confirmar la identificación de los metabolitos, se comparó los iones producto del correspondiente metabolito con los reportados en la base de datos. Al realizar la comparación se observaron dos fragmentos (59.0 y 73.0 m/z), tal como se indica en la Tabla 10, confirmando con mayor certeza la identificación tentativa de dicho metabolito. En la tabla 11 se observa que la L-glicina y glicerol presentaron un valor p menor a 0,05, lo que indica que estos metabolitos fueron estadísticamente significativos, al ser comparado con el resto de metabolitos. Los resultados anteriores nos podrían indicar que el compuesto FM50 altera la concentración de algunos metabolitos de la línea celular HepG2 al ser expuesto por un periodo de 24 horas a dicho compuesto.

2.3.5 Análisis de los extractos metabólicos usando cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a masas (UHPLC-ORBITRAP-MS), después de la exposición al compuesto FM50 por un periodo de 24 horas. En esta sección se presentan los análisis de los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS, a los cuales se les realizó deconvolución y alineamiento, detectándose 363 y 359 características de relación masa/carga (m/z) en modo de ionización positiva y negativa, respectivamente. Mediante una relación cuantitativa utilizando la variable de respuesta FC, fue posible observar la alteración de 12 señales en modo de ionización

positivo con respecto al control; mientras que en modo de ionización negativo no se determinó alteración alguna sobre las características de relación masa/carga del grupo control vs. tratamiento. A continuación, se procedió a identificar cada una de dichas masas y su posterior efecto sobre el metabolismo de la línea celular Hep-G2.

2.3.5.1 Análisis estadístico y relación de expresión metabólica de los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. En la figura 28 se observa el alineamiento de cada uno de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento 24 horas, el procedimiento de alineamiento y deconvolución se explica en la sección 3.3.5

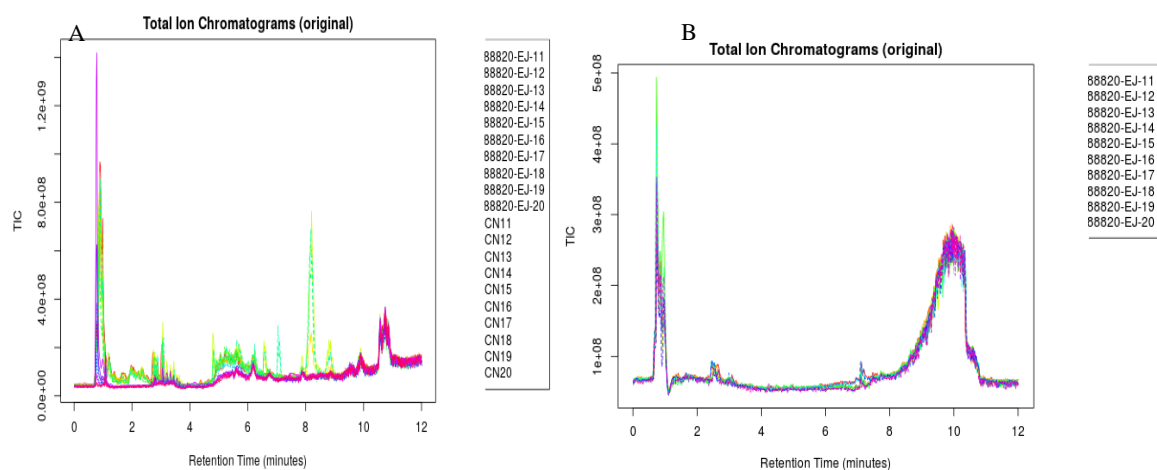


Figura 28. Resultados de alineamiento y deconvolución de los cromatogramas del grupo control y grupo tratamiento 12 horas. Para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS .A) modo de ionización positivo y B) modo de ionización negativo.

En la figura 29, se muestran los análisis de componentes principales con un nivel de confianza del 95%, en la figura A se observa el PCA score plot para los análisis obtenidos en modo de

ionización positiva, el cual relaciona una varianza explicada de aproximadamente 66%. Como se observa en el eje x en PC1, se logra observar una separación de los datos, esto nos indica que existe una diferencia entre los datos del grupo control y grupo tratamiento, indicando posibles alteraciones en dichas características. En figura B se observa el PC score plot, para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS en modo ion negativo, como se observa en el eje x PC1 no se muestra separación, esto nos indica que en dichas características no presentó ninguna diferencia. (López-Roldán & Fachelli, 2016)

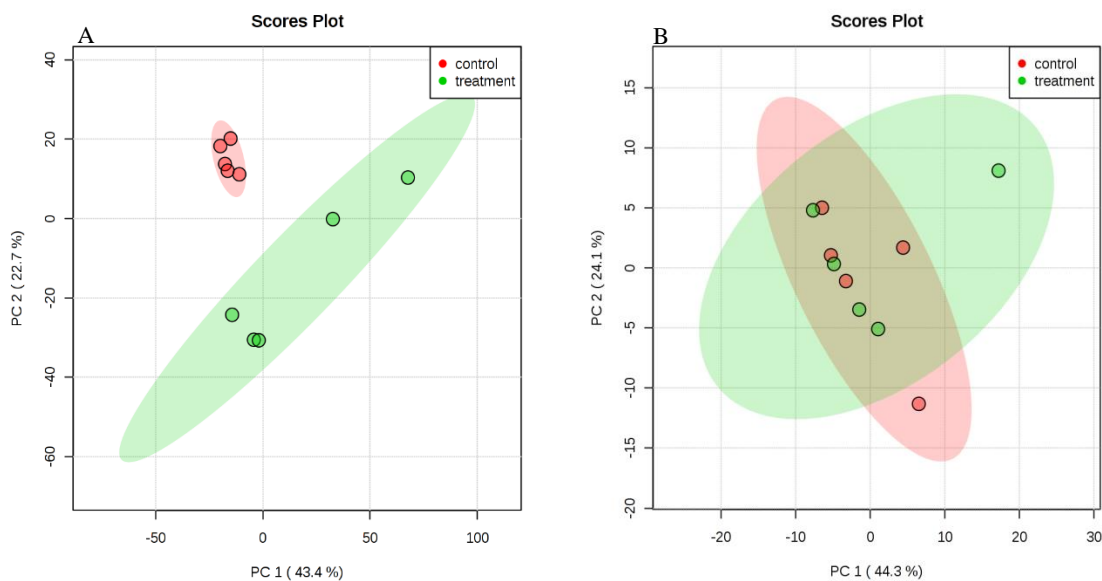


Figura 29. Análisis de componente principales (PCA) de los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de muestras control (círculos en rojo) versus muestras con tratamiento (círculos en verde) en modo de ionización. A) modo positivo, B) modo negativo.

En las tablas 12 y 13 se muestran los resultados del análisis estadístico univariado con base en los cambios de variación metabólica (Fold Change), donde el primer análisis compara el valor

absoluto entre dos promedios de grupo; en este caso la comparación corresponde entre el grupo control y grupo tratamiento, identificando 10 metabolitos, donde 4 presentaron una sobreexpresión en el tratamiento. Posteriormente, se procedió a identificar estos metabolitos, se comparó con las masas teóricas, y se encontró únicamente un metabolito con error relativo superior al 0,1% (B. J. Xia, 2012). De los 10 metabolitos identificados, 4 presentaron valor p menor a 0,05. Aparte de los dos análisis univariados también se determinó el FDR, procedimiento similar al descrito en la sección 3.2.5.

Tabla 12.

Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 24h

Metabolitos	m/z(Exp)	m/z(Calc)	Aductos	%ER	FC
22R-hidroxicolesterol	202.1802	202.1828	2M+2H	0.0013	2.4845
N-Decanoilglicina	212.1646	212.1605	M+H-H ₂ O	0.0018	157.84
7 alfa-Hidroxi-3-oxo-4-colestenoato	216.1595	216.1621	2M+2H	0.0012	351.45
Vitamina K1	226.1800	226.1828	2M+H	0.0013	15.116
Arginina	231.1493	231.3146	M+K+H ₂ O	0.0949	0.00182
Valerilcarnitina	246.1703	246.1706	M+H	0.0001	2.3507
5-Hidroxi-L-triptofano	303.1452	303.1927	M+2ACN +H	0.0216	0.20922
Lipoillisina	317.1333	317.1312	M+H-H ₂ O	0.0006	0.00041

Adenosina tiamina difosfato (ADP)	338.0756	338.0735	2M+2H	0.0006	0.49959
-----------------------------------	----------	----------	-------	--------	---------

Nota. ER: Error Relativo, FC= veces de cambio (Fold Change). En la tabla superior se presentan los metabolitos que presentaron cambios con respecto al control después de la exposición por un periodo de 24 horas con el compuesto FM50, el valor entre 0-0.5 en Fold Change (FC) representa los metabolitos sobre-expresados (inducidos o que se encuentran en mayor cantidad) y valor mayores que 2 representa los metabolitos inhibidos.

Tabla 13.

Análisis estadístico univariado T-test del grupo control con respecto al grupo tratamiento 12 horas

Metabolito	m/z	Valor p	FDR
22R-hidroxicolesterol	202.1802	0.13326	0.99172
N-Decanoilglicina	212.1646	0.0057426	0.16035
7 alfa-Hidroxi-3-oxo-4-colestenoato	216.1595	7.15E-07*	9.83E-05
Vitamina K1	226.1800	0.040304	0.97536
L-Arginina	231.1493	2.46E-06*	0.0001787
Valerilcarnitina	246.1703	0.21127	0.99172
5-Hidroxi-L-triptofano	303.1452	0.22137	0.99172
Lipoillisina	317.1333	9.86E-11*	3.58E-08
Adenosina tiamina difosfato (ADP)	338.0756	0.049182*	0.04972

Nota. FDR: Tasa de descubrimientos falsos (False Discovery Rate). Datos identificados con asterisco (*) representan metabolitos estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

2.3.6 Análisis rutas metabólicas afectadas después de 24 horas de exposición al compuesto

FM50. El análisis de las rutas metabólicas afectadas, se realizó mediante el uso de los metabolitos que presentaron p-valor y FDR menor a 0,05. Para este análisis se van a usar en conjunto los metabolitos obtenidos tanto por GC-MS y UHPLC-Orbitrap-MS.

En tabla 14 se muestran las rutas metabólicas afectas en las células HepG2, por la exposición al compuesto FM50, donde los hits son la cantidad de metabolitos de estudio que se encuentran involucrados en cada una de las rutas metabólicas, para tal análisis se usaron 6 metabolitos.

Tabla 14.

Relación de los cambios metabólicos identificados en la línea celular HepG2 durante el tratamiento a 24h

Rutas metabólicas	Total	Hits	Metabolitos
Metabolismo de L-arginina y L-prolina	47	2	L-Arginina y L-glicina
Metabolismo de L-glicina y L-serina	52	2	L-arginina y L-glicina
Biosíntesis de ácidos biliares	61	2	7 α -hidroxi-3-oxo-4-colestenoato y L-glicina
Metabolismo de glicerolipidos	24	1	L-glicerol
Ciclo de la urea	25	1	L-arginina
Glucólisis	23	1	ADP
Ciclo de Krebs	27	1	ADP
Efecto Warburg	52	1	ADP

Nota. En la tabla se muestran aquellos metabolitos que presentaron variación en concentración durante el tratamiento ($p < 0.05$, $FDR < 0.05$) y su relación con las rutas de biosíntesis posiblemente alteradas, tanto para los análisis realizados por GC-MS y UHPLC-Orbitrap-MS.

En la figura 30, se puede observar un panorama general de las rutas metabólicas que posiblemente se encuentran afectadas, entre las que se resalta el ciclo del ácido cítrico y la glucólisis (principales rutas metabólicas usadas en las células cancerígenas, para la proliferación y producción de energía ATP) (Muñoz-Pinedo et al., 2012). En la actualidad se conoce que las células cancerígenas no oxidan completamente la glucosa a CO_2 y agua, ya que en dichas células, la fosforilación oxidativa mitocondrial presenta alteraciones; por ende, el único mecanismo de producción de ATP en la célula se obtiene a partir de la glucólisis, con una contribución de 50 al 70%, y la glutaminólisis, como segunda fuente más abundante de energía en las células cancerígenas (J. Q. Chen & Russo, 2012). En efecto, cuando la síntesis de ATP mitocondrial se altera, la alteración ATP/ADP disminuye drásticamente, lo cual estimula notablemente la glucólisis para generación de ATP (Maldonado & Lemasters, 2014). Como se puede observar en la Figura 29, la concentración de ADP se incrementa, lo que sugiere que la producción de ATP está siendo inhibida (carga energética baja en la célula) y como se mencionó antes, las células cancerígenas usan la glucólisis como su principal productor de ATP (Ferreira, 2010). Cuando en las células se encuentra inhibida la glucólisis, se activa la gliceroneogénesis, el glicerol pasa a glicerol-3-fosfato que puede ingresar a la vía glucolítica o a la síntesis de lípidos, cuando ingresa a la vía glucolítica puede ser usado como sustrato para la producción de ATP. Donde se observó que el glicerol estaba a bajas concentraciones después del tratamiento, resultado de un posible

mecanismo de sobrevivencia de la célula para la producción de energía (ya que la glucólisis podría estar inhibida); otra alternativa es la acumulación de glicerolipidos biosintetizados a partir del glicerol, usado como fuente alternativa de energía o para la proliferación (Xue et al., 2017). Además, también se puede observar una sobre expresión en la lipoillisina, coenzima que participa en el complejo piruvato deshidrogenasa, esta enzima permite la conversión de piruvato a acetil-CoA y por lo tanto, el ingreso en el ciclo de Krebs; así, altas concentraciones de lipoillisina, indican una alteración en la piruvato deshidrogenasa (Khanna et al., 1998); por ende, el piruvato no puede servir como sustrato para el ciclo de Krebs, produciéndose una inhibición en dicha ruta. Otra alteración notoria es la acumulación de L-arginina, su posible acumulación (explicada detalladamente en la sección 3.3.3) indica inhibición del ciclo de la ornitina y la producción de NO (Szefel et al., 2019), el cual es esencial en la inhibición de muerte celular programada, crecimiento y proliferación celular. En consecuencia, esto se traduce como un posible efecto negativo sobre la proliferación celular (Lind, 2004). La concentración de 7α -hidroxi-3-oxo-4-colestenoato y glicerol se encuentran disminuidos pero al contrario, la concentración de glicina se encuentra aumentada; en consecuencia, la célula a pesar de estar con déficit de energía aún podría tener la necesidad de replicarse, por eso aumenta la producción de glicina, aminoácido esencial para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que son cruciales para el crecimiento de las células cancerosas (Xue et al., 2017). La célula proporciona la glicina a través de la gliceroneogénesis y la síntesis de colesterol, donde de la primera reacción el glicerol pasa de 3-foglicerato a L-serina y la L-serina pasa L-glicina (Amelio et al., 2014). En la segunda reacción, el colesterol pasa por una reacción de varios pasos hasta llegar a 7α -hidroxi-3-oxo-4-colestenoato y seguidamente a glicina, de esta manera la célula suministra la glicina necesaria para el crecimiento de la célula (Xue et al., 2017), pero como se observa la concentración de glicina se

encuentra aumentada, por ende la célula no puede sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, necesarios para su crecimiento y proliferación (Amelio et al., 2014; Vaz & Ferdinandusse, 2017). A partir de los resultados obtenidos, es posible inferir que los esfuerzos de la célula por regular la concentración de ATP y de seguir creciendo y replicándose no son suficientes, ya que el compuesto FM50 podría inhibir las diferentes fuentes de energía y de replicación de la célula. Según ensayos previamente realizados por la estudiante de doctorado Yenny Bueno, en su tesis doctoral, la línea celular Hep-G2, activa dos diferentes tipos de muerte celular, dependiendo el tiempo de exposición al compuesto FM50, primero se activaría apoptosis, seguida de necrosis. Con los datos anteriores se podría confirmar la muerte por necrosis, ya que, la concentración de ATP está siendo disminuida en la célula (alteración característica en muertes celulares por necrosis) (Duarte, 2018).

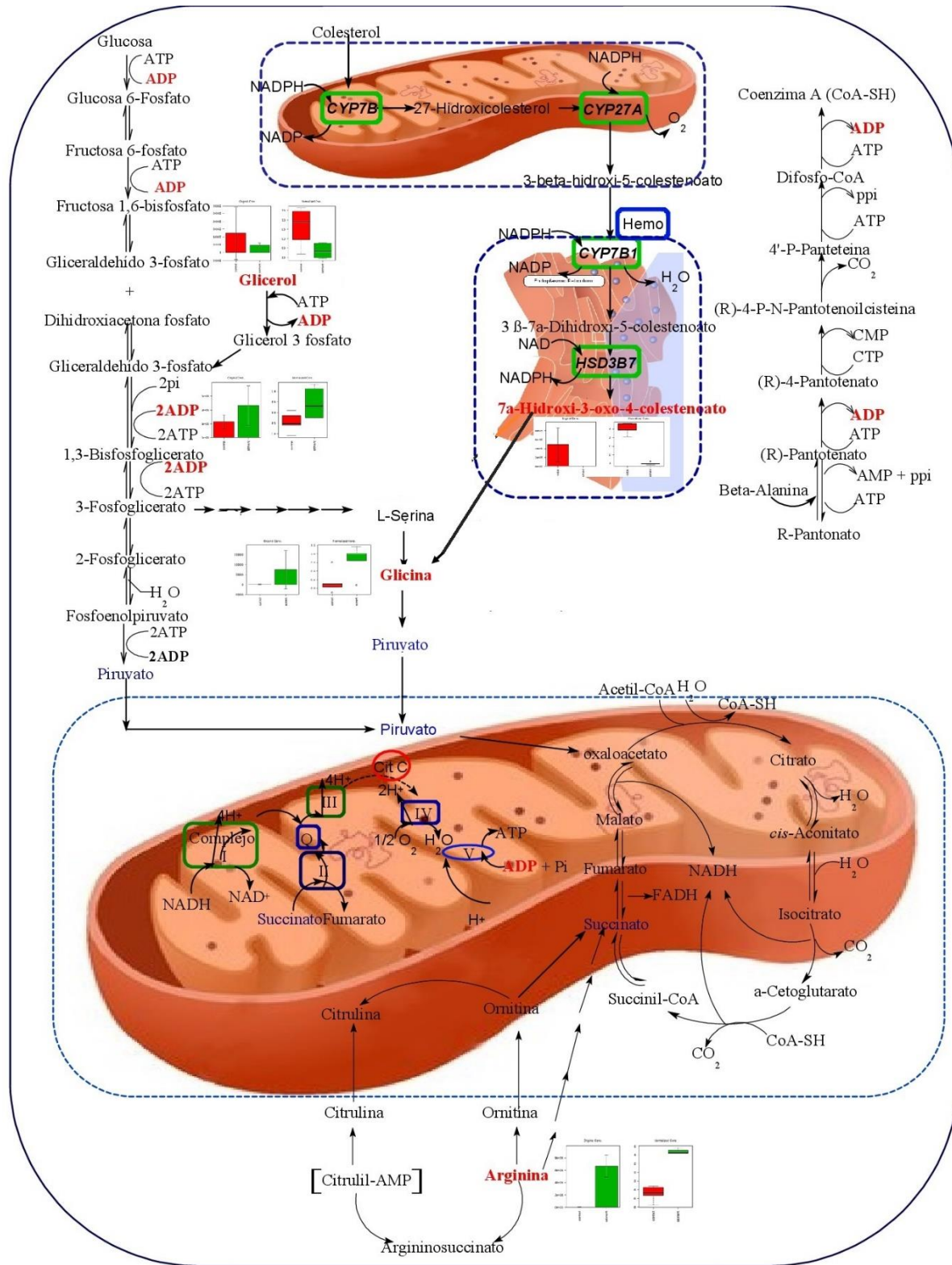


Figura 30. Rutas metabólicas posiblemente alteradas en la línea celular HepG2 durante la exposición al compuesto FM50.

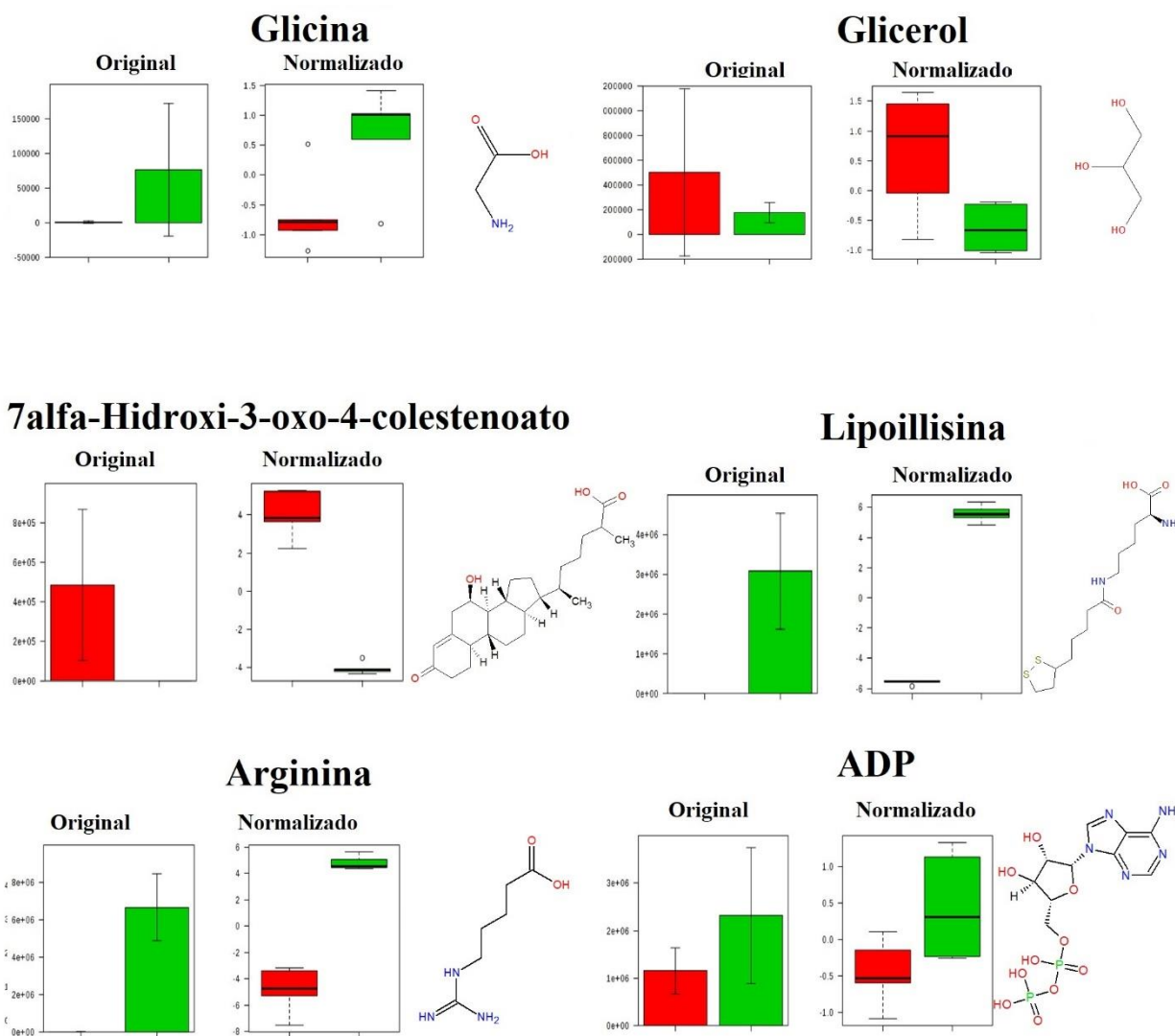


Figura 31. Gráfico de barras del compuesto que presentaron valor p menor a 0,05, donde las barras verdes pertenecen al tratamiento y las rojas al control.

2.3.7 Análisis de componentes principales para los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS para 12 y 24 horas de tratamiento, tanto en modo ion positivo y negativo. En la figura 32, se observa los análisis de componentes principales con un nivel de confianza del 95%, como se observa en el PCA score plot se puede identificar 4 grupos de datos bien definidos, como se observa en el en *eje x* en PC1, hay 3 grupos de datos, los que se encuentran en el cuadrante -5 a 10, son los datos obtenidos para el tratamiento de 24 horas, donde no se logra una separación entre los grupos de datos en modo de ionización positivo y negativo; ocurriendo lo contrario para el grupo de datos obtenidos en el tratamiento 12 horas en modo ion negativo y positivo. En el *eje y* (*PC3*), se observa la separación del grupo de datos obtenidos para el tratamiento de 24 horas, identificándose separaciones entre los grupos de datos obtenidos en modo ion positivo y negativo, lo contrario ocurre para el grupo de datos del tratamiento de 12 horas, donde en PC3 no se observa separación de los grupos. A partir de estos datos se puede observar que tanto los datos obtenidos para los tratamientos de 12 y 24 horas, son dos grupos de datos. Observándose una discrepancia para los datos en modo ion positivo y negativo, tanto para 12 y 24 horas.

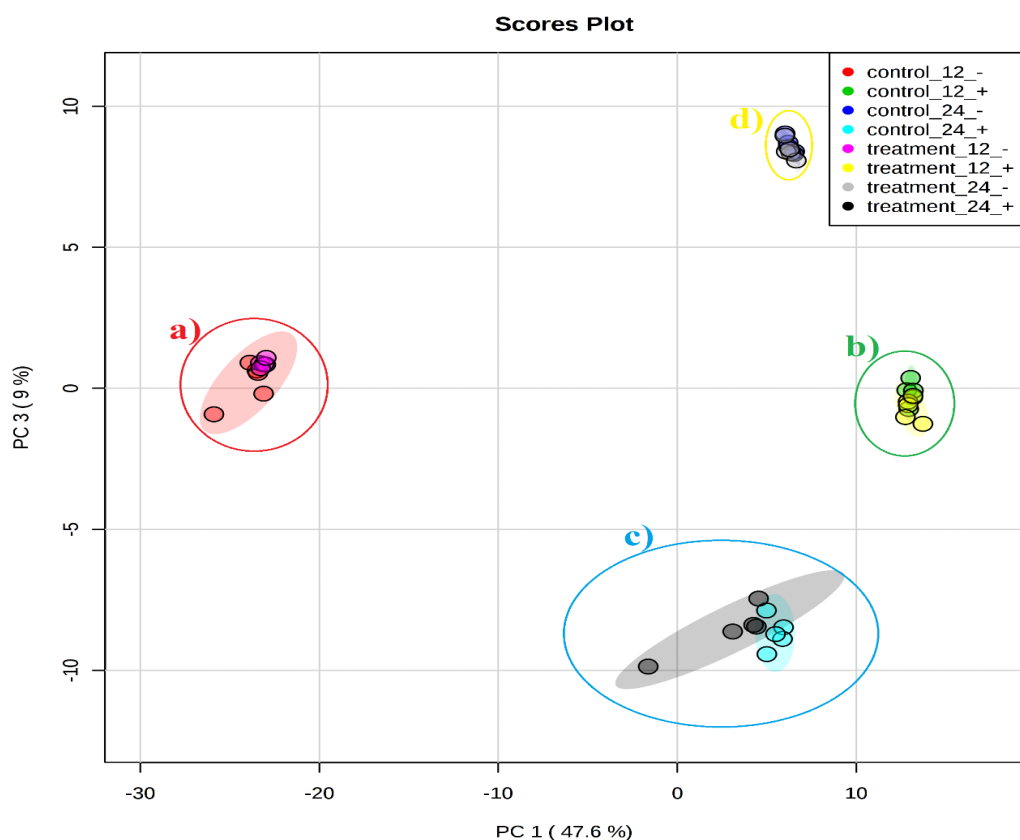


Figura 32. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS. a) 12 horas modo ion negativo, b) 12 horas modo ion positivo, c) 24 horas modo ion positivo y d) 24 horas modo ion negativo.

2.3.8 Análisis rutas metabólicas afectas después de 12 y 24 horas de exposición al compuesto FM50. Cabe recalcar que en la línea celular Hep-G2, la fosforilación oxidativa se encuentra alterada, más específicamente el complejo I, debido a esto la producción de ATP, es a través de la vía glucolítica (Wiśniewski, Vildhede, Norén, & Artursson, 2016). De los datos obtenidos del tratamiento de 12 horas y 24 horas, es posible suponer que el metabolismo de glucosa se está siendo alterado, ya que, en el tratamiento de 12 horas se presentó una acumulación de glucosa y en el tratamiento de 24 horas se presentó una acumulación de ADP; esto sugiere que la principal ruta metabólica energética de las células cancerígenas se encuentra inhibida. También

se observó que la concentración de L-arginina se encuentra aumentada, tanto para el tratamiento de 12 y 24 horas, a partir de lo anterior se podría inferir que la muerte celular programada (apoptosis) está siendo activada, debido a que la célula se encuentra con una carga energética baja (disminución de glucosa y aumento de ADP). Otra característica a resaltar tanto en el tratamiento de 12 y 24 horas, es el intento de la célula de regular su energía celular, crecimiento y posterior replicación mediante el uso de aminoácidos (Counihan et al., 2018). En el tratamiento de 12 horas, se ve afectado el metabolismo de glucosa, pero muy probablemente la concentración de ATP fue regulada por la célula, debido al posible uso de fuentes alternativas para la producción de energía (aminoácidos y ácidos grasos). Como fue reportado en ensayos realizados anteriormente por la estudiante de doctorado Yenny Bueno Duarte, indicando muerte celular por apoptosis en determinado tiempo, que luego llevaría a necrosis, en la línea celular Hep-G2. A partir de lo anterior, es posible inferir que en un periodo a 12 horas de exposición al compuesto FM50, la célula programaría muerte celular por apoptosis, que seguidamente podría ser inhibida debido a la posible regulación de la concentración de ATP; por ende, regular su proliferación. Pero a las 24 horas de exposición al compuesto FM50, se presentó una disminución en la concentración de ATP (alteración característica en muerte celular por necrosis) (Radogna, Dicato, & Diederich, 2015), posiblemente llevando a necrosis. Con lo dicho previamente, es posible concluir que el compuesto FM50 induce muerte celular por necroptosis (muerte celular necrótica regulada), como fue reportado en ensayos realizados anteriormente por la estudiante de doctorado Yenny Bueno.

3. Conclusiones

- ❖ La exposición de la línea celular Hep-G2 al compuesto FM50 generó cambios metabólicos remarcables a nivel celular. Estos cambios (tanto a 12 y 24h) estuvieron correlacionados con la alteración de los principales mecanismos de proliferación celular reportados para este tipo de células tumorales.
- ❖ Los metabolitos L-asparagina, D-glucosa, L-arginina, pentadecanal, Ácido 8,11,14-Eicosatrienoico, Citidina difosfato (CDP), 4'-fofopantotenoilcisteína y LysoPE(16:1(9Z)/0:0), fueron tentativamente identificados como los responsables de los primeros cambios metabólicos encontrados en la línea celular Hep-G2 durante el tratamiento a 12 horas. Con base en lo anterior, fue posible establecer ocho posibles rutas metabólicas afectadas en las células durante el tratamiento, entre las que se encuentran, la glucólisis, efecto Warburg, metabolismo de pirimidina, ciclo de la urea, metabolismo de L-arginina y L-prolina, metabolismo de ácidos grasos, Pantotenato y Biosíntesis de CoA y el ciclo de Krebs.
- ❖ Los metabolitos 7alfa-hidroxi-3-oxo-4-colestenoato, L-arginina, glicerol, L-glicina, lipoilisina y adenosina tiamina difosfato (ADP), fueron tentativamente identificados como los responsables de los primeros cambios metabólicos encontrados en la línea celular Hep-G2 durante el tratamiento a 24 horas. Con base en lo anterior, fue posible establecer ocho posibles rutas metabólicas afectadas en las células durante el tratamiento, entre las que se encuentran, metabolismo de L-arginina y L-prolina, metabolismo de L-glicina y L-serina,

metabolismo de glicerolipidos, biosíntesis de ácidos biliares, ciclo de la urea, ciclo de Krebs, glucólisis y efecto Warburg.

- ❖ Como conclusión general, el compuesto FM50 parece ejercer su actividad biológica sobre la línea celular Hep-G2 a través de un arsenal de vías metabólicas afectadas que involucran el metabolismo de glucosa, los canales catiónicos de transporte de aminoácidos, la β -oxidación de ácidos grasos y metabolismo de aminoácidos, inhibiendo de esta forma, los mecanismos de proliferación celular y por tanto, finalizando en la activación de procesos de muerte celular programada (necroptosis), como los reportados en estudios previos.

4. Recomendaciones

Se recomienda realizar análisis MS/MS, para poder identificar con mayor precisión los compuestos que se encuentran involucrados en dichas alteraciones, realizar análisis enzimáticos de las rutas metabólicas que se encuentran afectadas para poder determinar que enzimas están siendo afectadas y por último se recomienda realizar análisis metabólico in vivo para determinar cómo se afecta el hígado y riñones al ser tratados por dicho compuesto y determinar el LD50 de dicho compuesto en ratones.

Referencias Bibliográficas

- Abou-Alfa, G. K. (2006). Hepatocellular Carcinoma: Molecular Biology and Therapy. *Seminars in Oncology*, 33(SUPPL. 11), 79–83.
- Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M., & Melino, G. (2014). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 191–198.
- Aravalli, R. N., & Steer, C. J. (2014). *Hepatocellular Carcinoma: Cellular and Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Strategies*. (Springer, Ed.). Minneapolis, USA.
- Blum, H. E. (2005). Treatment of hepatocellular carcinoma. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 19(1 SPEC. ISS.), 129–145.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, S., 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*, 107(11), 394–424.
- Brian I. Carr. (2012). Tumores del hígado y vías biliares. In McGraw-Hill Global Education (Ed.), *Principios de medicina interna* (19th ed.).
- Byrns, M. C., & Penning, T. M. (2012). *Toxicología ambiental: cancerígenos y metales pesados*. (McGraw-Hill Medical, Ed.) (12th ed.). Mexico.
- Cao, H., Phan, H., & Yang, L. (2012). Improved Chemotherapy for Hepatocellular Carcinoma, *1386*, 1379–1386.
- Cervello, M., Bachvarov, D., Lampiasi, N., Cusimano, A., Azzolina, A., McCubrey, J. A., & Montalto, G. (2012). Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. *Cell Cycle*, 11(15), 2843–2855.

- Chen, J. Q., & Russo, J. (2012). Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1826(2), 370–384. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.004>
- Chen, K.-F., Chen, H.-L., Tai, W.-T., Feng, W.-C., Hsu, C.-H., Chen, P.-J., & Cheng, A.-L. (2011). Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase / Akt Signaling Pathway Mediates Acquired Resistance to Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(1), 155–161. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.175786.in>
- Chen, Y., & Li, P. (2016). Fatty acid metabolism and cancer development. *Science Bulletin*, 61(19), 1473–1479. <https://doi.org/10.1007/s11434-016-1129-4>
- Chouaïb, K., Romdhane, A., Delemasure, S., Dutartre, P., Elie, N., Touboul, D., ... Ali Hamza, M. (2016). Regiospecific synthesis, anti-inflammatory and anticancer evaluation of novel 3,5-disubstituted isoxazoles from the natural maslinic and oleanolic acids. *Industrial Crops and Products*, 85, 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.024>
- Coller, H. A. (2014). Is cancer a metabolic disease? 9582978472. *American Journal of Pathology*, 184(1), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.07.035>
- Counihan, J. L., Grossman, E. A., & Nomura, D. K. (2018). Cancer Metabolism: Current Understanding and Therapies. *Chemical Reviews*, 118(14), 6893–6923. review-article. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00775>
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., Farese, R. V., & Jr. (2013). Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Actas Espanolas de Psiquiatria*, 41(5), 263–268.

<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.05.017>

DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2, 1–18. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>

Duarte, Y. B. (2018). *Evaluación de la actividad citotóxica de compuestos orgánicos híbridos de tetrahydroquinolinas e isozaxoles en líneas tumorales y su mecanismo de acción.*

Fadaka, A., Ajiboye, B., Ojo, O., Adewale, O., Olayide, I., & Emuowhochere, R. (2017). Biology of glucose metabolization in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*, 3(2), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.06.002>

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

Fernández-Lainez, C., Vela-Amieva, M., & Ibarra-González, I. (2009). Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr Mex*, 30(5), 258–263.

Ferreira, L. M. R. (2010). Cancer metabolism: The Warburg effect today. *Experimental and Molecular Pathology*, 89(3), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.08.006>

Food and Drug Administration. FDA. (2017). Highlights of Prescribing Information. Regorafenib, 1–28. Retrieved from https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/203085s0071bl.pdf

Gao, D., Wang, Y., Xie, W., Yang, T., Jiang, Y., Guo, Y., ... Liu, H. (2016). Metabolomics study

- on the antitumor effect of marine natural compound flexibilide in HCT-116 colon cancer cell line. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1014, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.003>
- Gao, L., Wang, K. X., Zhang, N. N., Li, J. Q., Qin, X. M., & Wang, X. L. (2018). ¹H Nuclear Magnetic Resonance Based Metabolomics Approach Reveals the Metabolic Mechanism of (-)-5-Hydroxy-equiol against Hepatocellular Carcinoma Cells in Vitro. *Journal of Proteome Research*, 17(5), 1833–1843. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00853>
- Genco, C., Cabibbo, G., Maida, M., Brancatelli, G., Galia, M., Alessi, N., ... Cammà, C. (2013). Treatment of hepatocellular carcinoma: Present and future. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(4), 469–479. <https://doi.org/10.1586/era.13.21>
- Geng, N., Zhang, H., Zhang, B., Wu, P., Wang, F., Yu, Z., & Chen, J. (2015). Effects of short-chain chlorinated paraffins exposure on the viability and metabolism of human hepatoma HepG2 cells. *Environmental Science and Technology*, 49(5), 3076–3083. <https://doi.org/10.1021/es505802x>
- Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2010). The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(1), 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.12.004>
- Grunt, T. W. (2018). Interacting Cancer Machineries: Cell Signaling, Lipid Metabolism, and Epigenetics. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(2), 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.003>
- Gusani, N. J., Jiang, Y., Kimchi, E. T., Staveley-O'Carroll, K. F., Cheng, H., & Ajani, J. A. (2009).

- New pharmacological developments in the treatment of hepatocellular cancer. *Drugs*, 69(18), 2533–2540. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2165/11530870-000000000-00000>
- Halama, A. (2014). Metabolomics in cell culture - A strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 564, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.09.002>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2010). The Hallmarks of Cancer. *Netherlands Heart Journal*, 18(9), 399. <https://doi.org/10.1007/BF03091804>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2016). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(1), E41–E46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Helmy, S. A., El-Mesery, M., El-Karef, A., Eissa, L. A., & El Gayar, A. M. (2018). Chloroquine upregulates TRAIL/TRAILR2 expression and potentiates doxorubicin anti-tumor activity in thioacetamide-induced hepatocellular carcinoma model. *Chemico-Biological Interactions*, 279(November 2017), 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.009>
- Icard, P., Shulman, S., Farhat, D., Steyaert, J. M., Alifano, M., & Lincet, H. (2018). How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? *Drug Resistance Updates*, 38(March), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.03.001>
- J, F., M, E., F, L., M, C., L, M., M, P., ... F, B. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Retrieved January 31, 2019, from <https://gco.iarc.fr/today>
- Kato, Y., Maeda, T., Suzuki, A., & Baba, Y. (2018). Cancer metabolism: New insights into classic characteristics. *Japanese Dental Science Review*, 54(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.08.003>

- Kew, M. C. (2013). Hepatitis viruses (other than hepatitis B and C viruses) as causes of hepatocellular carcinoma: An update. *Journal of Viral Hepatitis*.
<https://doi.org/10.1111/jvh.12043>
- Khanna, S., Atalay, M., Lodge, J. K., Laaksonen, D. E., Roy, S., Hanninen, O., ... Sen, C. K. (1998). Skeletal muscle and liver lipoyllysine content in response to exercise, training and dietary alpha-lipoic acid supplementation. *Biochem Mol Biol Int*, 46(2), 297–306. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9801798
- Lind, D. S. (2004). Arginine and cancer. *The Journal of Nutrition*, 134(10 Suppl), 2837S–2841S; discussion 2853S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2837S>
- Lindeque, J. Z., Matthyser, A., Mason, S., Louw, R., Johannes, C., Taute, F., ... Taute, F. (2018). Metabolomics reveals the depletion of intracellular metabolites in HepG2 cells after treatment with gold nanoparticles. *Nanotoxicology*, 0(0), 1–12.
<https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1432779>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338.
<https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- López-Roldán, P., & Fachelli, S. (2016). METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN SOCIAL CUANTITATIVA. *Metodología de La Investigación Social Cuantitativa*, 140. Retrieved from <http://ddd.uab.cat/record/142928>
- Lu, J., Tan, M., & Cai, Q. (2015). The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial

- oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters*, 356(2), 156–164.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.001>
- Maldonado, E. N., & Lemasters, J. J. (2014). ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect. *Mitochondrion*, 19(Part A), 78–84.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.09.002>
- Masaki, T., Morishita, A., Kurokohchi, K., & Kuriyama, S. (2006). Multidisciplinary treatment of patients with hepatocellular carcinoma, 1377–1385.
- Mcglynn, K. A. (2005). Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma, 19(1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2004.10.004>
- Mitry, M. A., & Edwards, J. G. (2016). Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart and Vasculature*, 10, 17–24.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.11.004>
- Moriguchi, M., Umemura, A., & Itoh, Y. (2016). Current status and future prospects of chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 9(4), 184–190. <https://doi.org/10.1007/s12328-016-0670-7>
- Muñoz-Pinedo, C., El Mjiyad, N., & Ricci, J. E. (2012). Cancer metabolism: Current perspectives and future directions. *Cell Death and Disease*, 3(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2011.123>
- Muñoz, A., Peticara, M., Sojo, F., Merchan Arenas, D. R., Bello Forero, J. S., Suarez, A., & Benaim, G. (2012). Tetrahydroquinolinas : Compuestos de origen sintéticos con propiedades antitumorales sobre líneas de cáncer humano. *Memorias Del Instituto de Biología Experimental*, 6(June 2016), 77–80.

- Novoa, J. R. U., & Díaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*, *54*, 10.
- Okuda, H. (2007). Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis, *21*(1), 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2006.07.002>
- Pardo, C., & Cendales, R. (2015). *Incidencia, mortalidad y prevalencia de Cáncer en Colombia 2007-2011*. Instituto Nacional De Cancerologia (Primera ed, Vol. 1). Bogotá. D.C. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyw075>
- Parker, W., & Cheng, Y. (1990). Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacology & Therapeutics*, *48*(3), 381–395. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90056-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90056-8)
- Pavlova, N. N., Hui, S., Ghergurovich, J. M., Fan, J., Intlekofer, A. M., White, R. M., ... Zhang, J. (2018). As Extracellular Glutamine Levels Decline, Asparagine Becomes an Essential Amino Acid. *Cell Metabolism*, *27*(2), 428–438.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.006>
- Psyrris, A., Arkadopoulou, N., Vassilakopoulou, M., Smyrniotis, V., & Dimitriadis, G. (2012). Pathways and targets in hepatocellular carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *12*(10), 1347–1357. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L366401892>
- Radogna, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2015). Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochemical Pharmacology*, *94*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.018>

- Resendis-Antonioa, O., González-Torresa, C., Jaime-Muñoz, G., Hernandez-Patño, C. E., & Salgado-Muñoz, C. F. (2015). Modeling metabolism: A window toward a comprehensive interpretation of networks in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 30, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.003>
- Sandhu, D. S., Tharayil, V. S., Lai, J.-P., & Roberts, L. R. (2008). Treatment options for hepatocellular carcinoma. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2(1), 81–92. <https://doi.org/10.1586/17474124.2.1.81>
- Serag, H. B. E. L., & Rudolph, K. L. (2017). Reviews in basic and clinical gastroenterology, (Figure 1), 2557–2576. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
- Sridharan, V., Suryavanshi, P. A., & Menéndez, and J. C. (2011). Advances in the Chemistry of Tetrahydroquinolines. *American Chemical Society*, 50(11), 7157–7259. <https://doi.org/10.1070/RC1981v050n11ABEH002738>
- Storey, J. (2011). THE POSITIVE FALSE DISCOVERY RATE: A BAYESIAN INTERPRETATION AND THE q-VALUE. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(1), 373–376. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.10.135>
- Sysak, A., & Obmińska-Mrukowicz, B. (2017). Isoxazole ring as a useful scaffold in a search for new therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 292–309. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.002>
- Szefel, J., Danielak, A., & Kruszewski, W. J. (2019). Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Advances in Medical Sciences*, 64(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2018.08.018>
- Tai, W. T., Chu, P. Y., Shiau, C. W., Chen, Y. L., Li, Y. S., Hung, M. H., ... Chen, K. F. (2014).

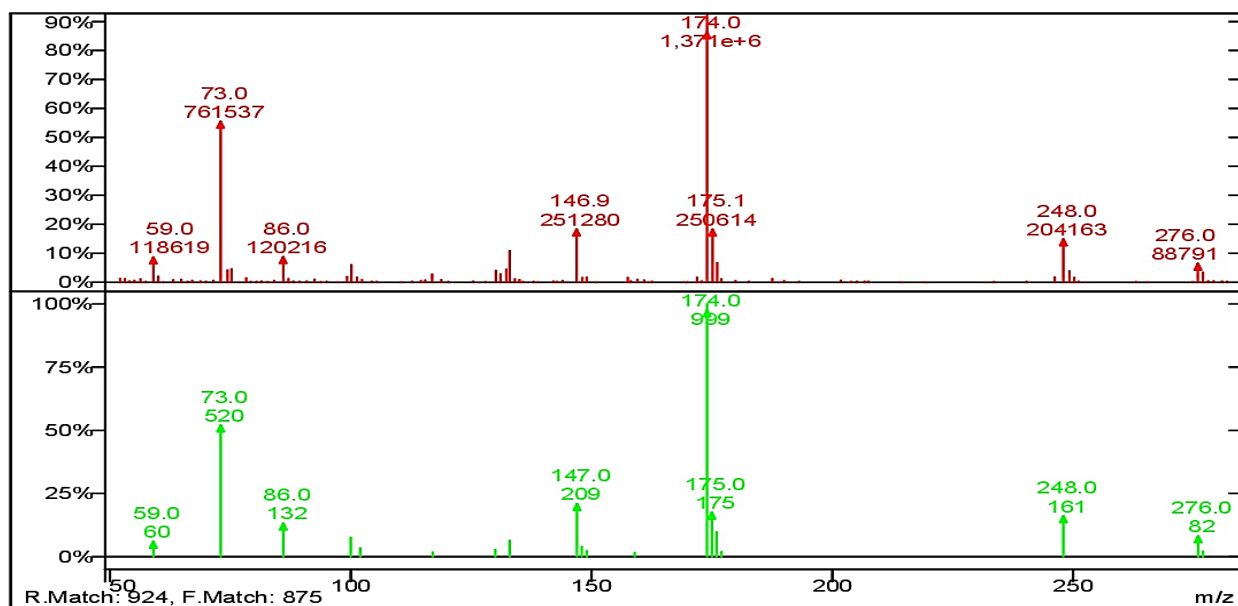
- STAT3 mediatesregorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20(22), 5768–5776. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0725>
- Tang, Z.-Y. (1998). Treatment of hepatocellular carcinoma. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 59(5), 556–562. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L39585737%0Ahttp://limo.libis.be/resolver/?&sid=EMBASE&issn=10928472&id=doi:&atitle=Treatment+of+hepatocellular+carcinoma&stitle=Curr.+Treat.+Options+Gastroenterol.&title=Current+Trea>
- Tekade, R. K., & Sun, X. (2017). The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. *Drug Discovery Today*, 22(11), 1637–1653. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.003>
- Tholey, D. M., & Ahn, J. (2015). Impact of Hepatitis C Virus Infection on Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology Clinics of North America*, 44(4), 761–773. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.07.005>
- Tomita, M., & Nishioka, T. (2005). *Metabolomics: The frontiers of systems biology*. (Springer, Ed.). New York.
- Vaz, F. M., & Ferdinandusse, S. (2017). Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 56, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.003>
- Vescovo, T., Refolo, G., Vitagliano, G., Fimia, G. M., & Piacentini, M. (2016). Molecular mechanisms of hepatitis C virus e induced hepatocellular carcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(10), 853–861. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.019>
- Vildózola, H., & Salinas, J. (2009). Historia Natural de la Infección Crónica por el Virus Hepatitis

- B. *Rev. Gastroenterol*, 29(2), 147–157.
- Wang, F., Zhang, H., Geng, N., Zhang, B., Ren, X., & Chen, J. (2016). New Insights into the Cytotoxic Mechanism of Hexabromocyclododecane from a Metabolomic Approach. *Environmental Science and Technology*, 50(6), 3145–3153. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03678>
- Wang, Y., Gao, D., Chen, Z., Li, S., Gao, C., Cao, D., ... Jiang, Y. (2013). Acridone Derivative 8a Induces Oxidative Stress-Mediated Apoptosis in CCRF-CEM Leukemia Cells: Application of Metabolomics in Mechanistic Studies of Antitumor Agents. *PLOS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063572>
- Wiśniewski, J. R., Vildhede, A., Norén, A., & Artursson, P. (2016). In-depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes. *Journal of Proteomics*, 136, 234–247. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.016>
- Xia, B. J. (2012). *High-throughput Processing and Analysis of LC-MS Spectra*.
- Xia, J., Psychogios, N., Young, N., & Wishart, D. S. (2009). MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2), 652–660. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp356>
- Xu, W., Yu, J., & Wong, V. W. S. (2017). Mechanism and prediction of HCC development in HBV infection. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.04.011>
- Xue, L. L., Chen, H. H., & Jiang, J. G. (2017). Implications of glycerol metabolism for lipid production. *Progress in Lipid Research*, 68(February), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.07.002>

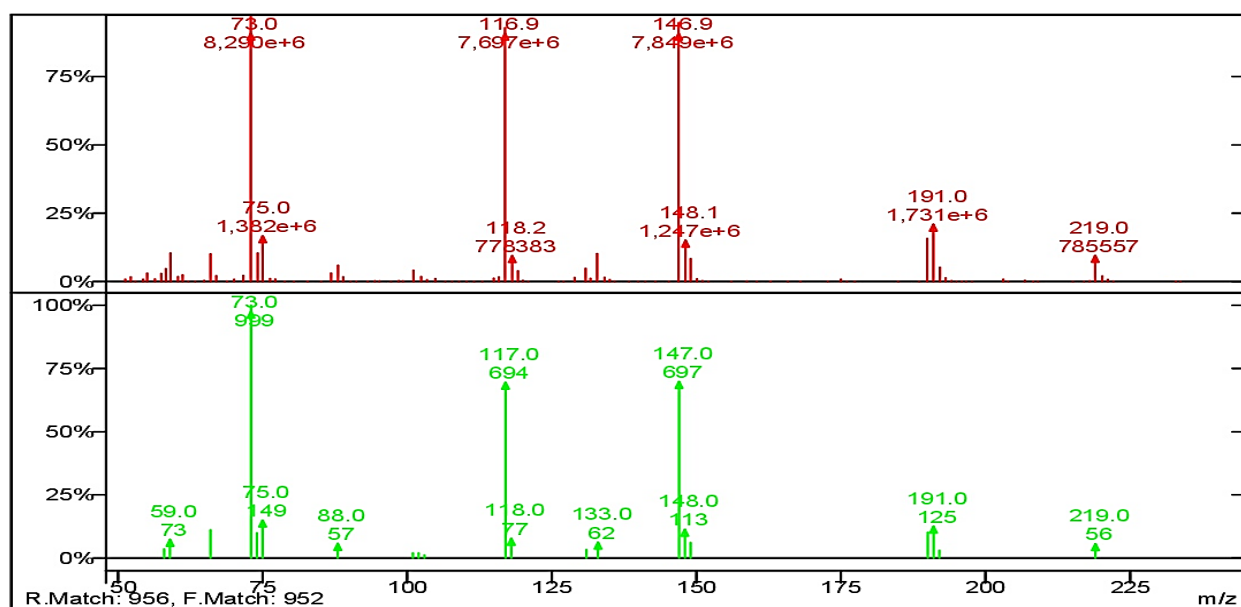
Zhang, J., Ibrahim, M. M., Sun, M., & Tang, J. (2015). Enoyl-coenzyme A hydratase in cancer.

Clinica Chimica Acta, 448, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.020>

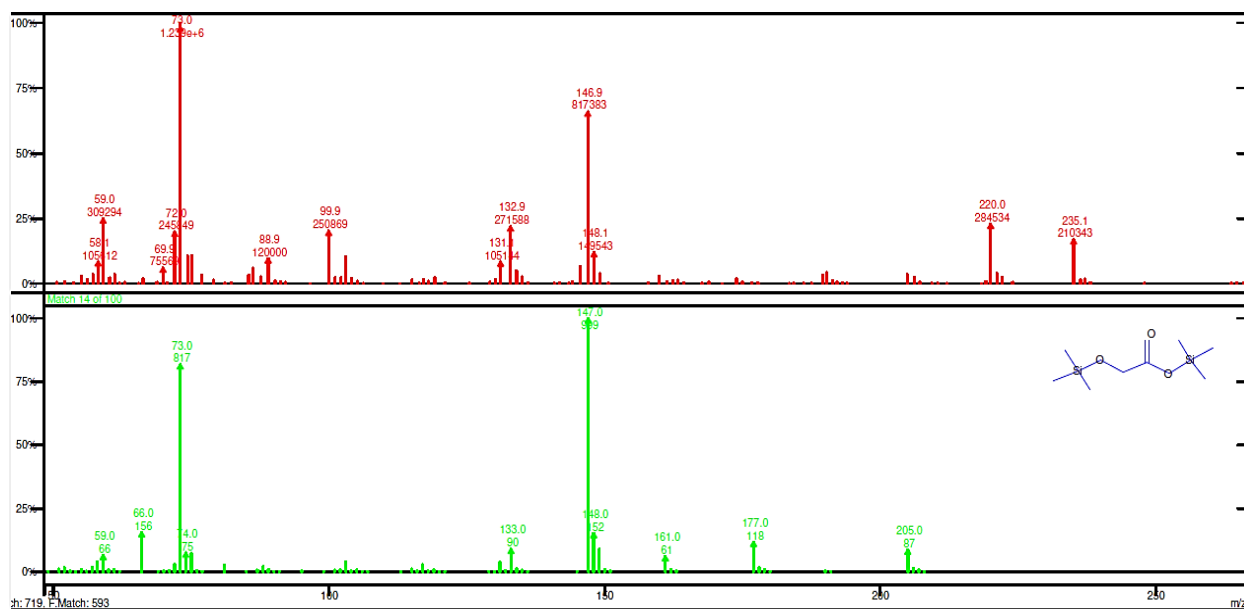
Apéndices



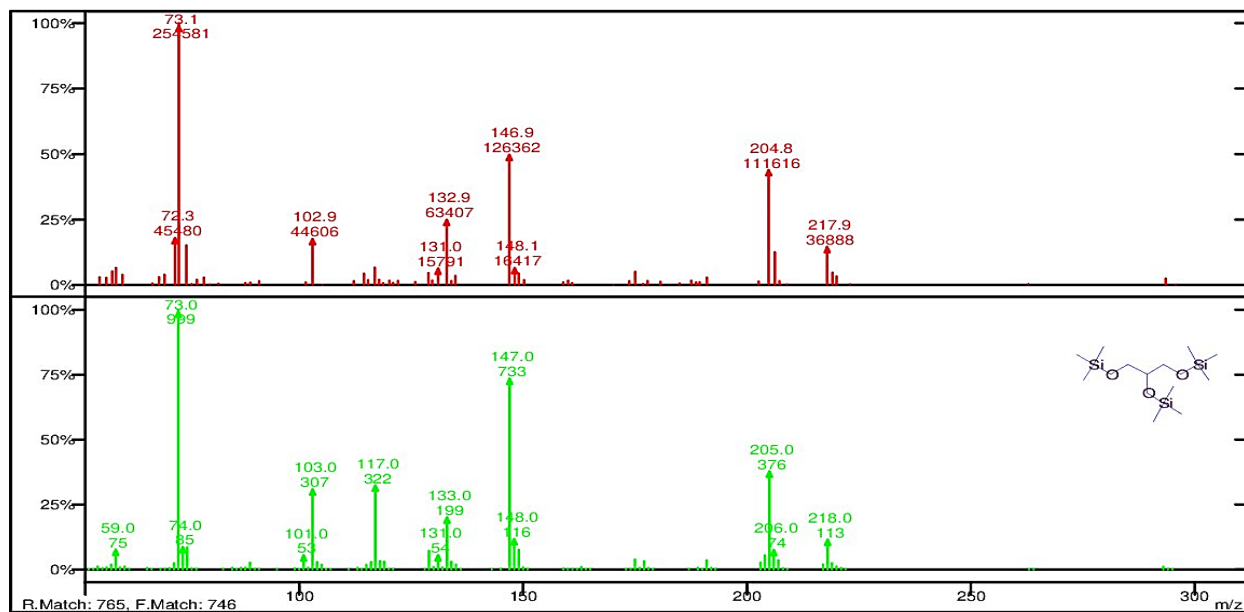
Apéndices A. Espectros de masas para la glicina obtenida en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



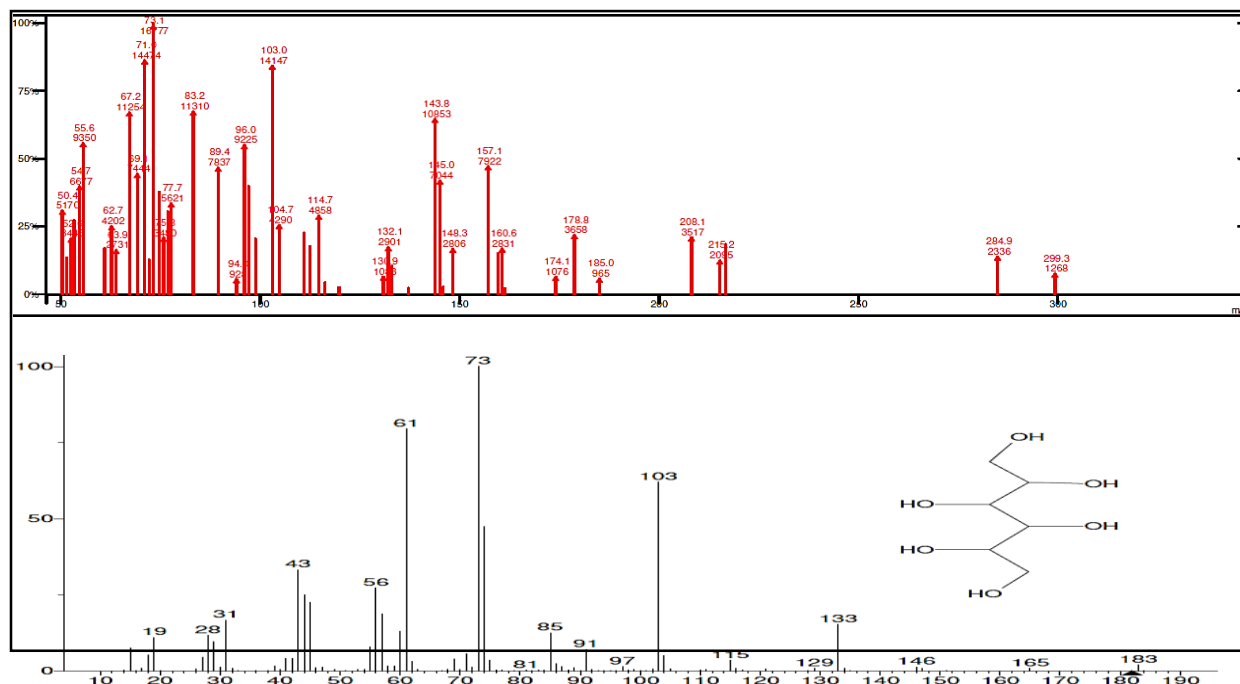
Apéndices B. Espectros de masas para el ácido láctico obtenida en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



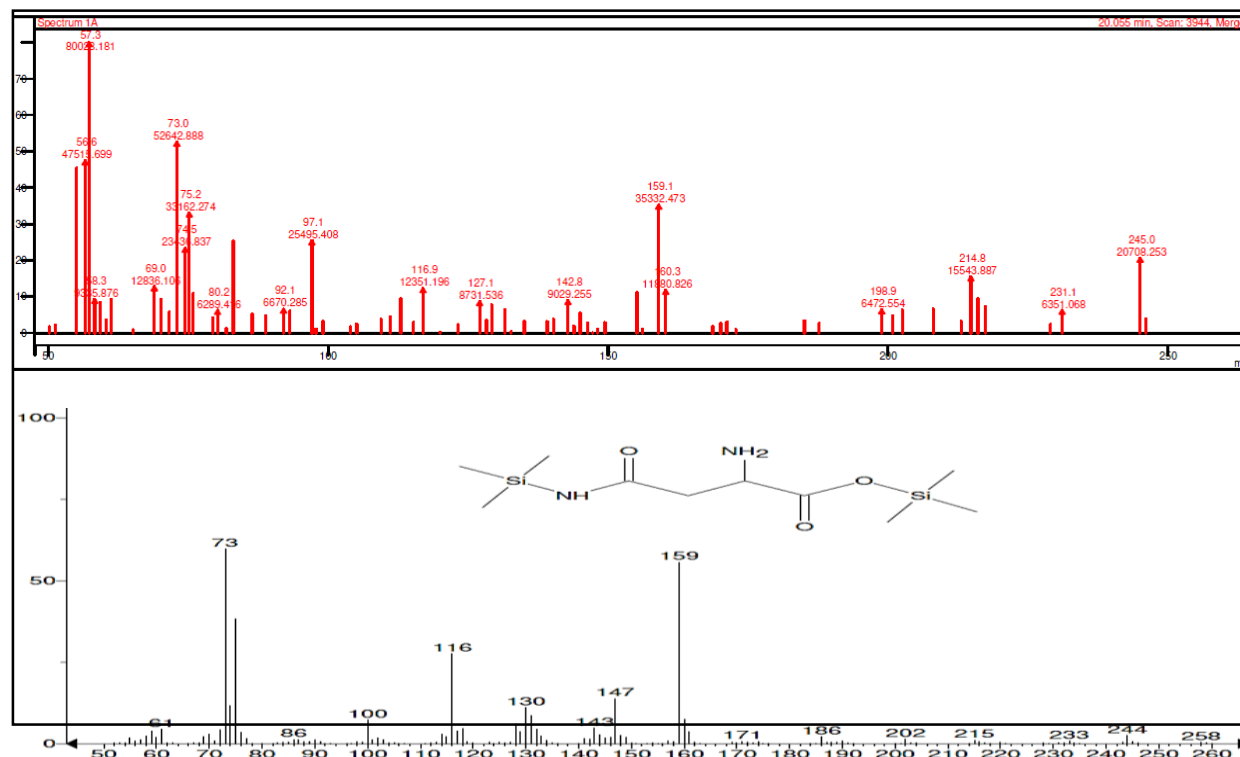
Apéndices C. Espectros de masas para el ácido glicólico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



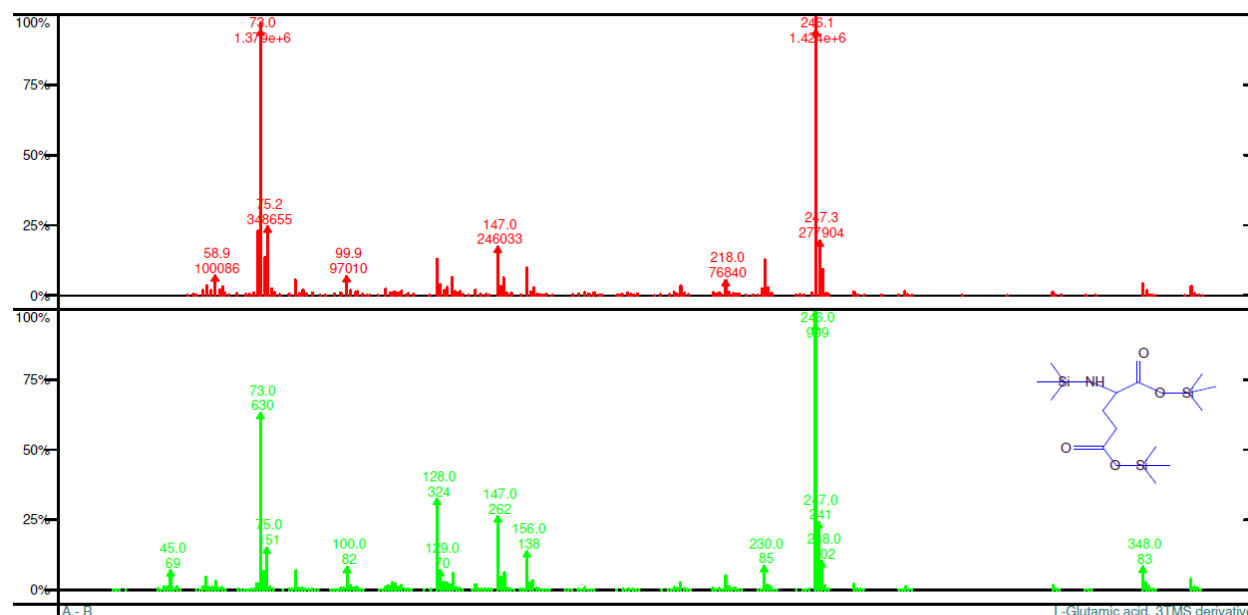
Apéndices D. Espectros de masas para el glicerol obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



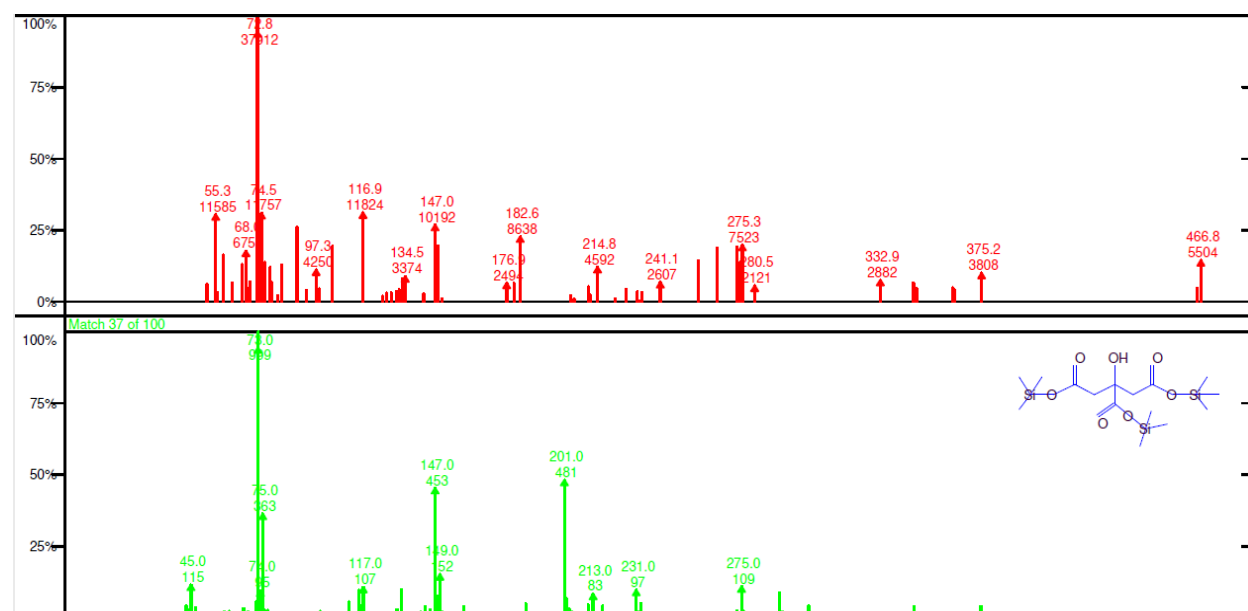
Apéndice E. Espectros de masas para el manitol obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en negro es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



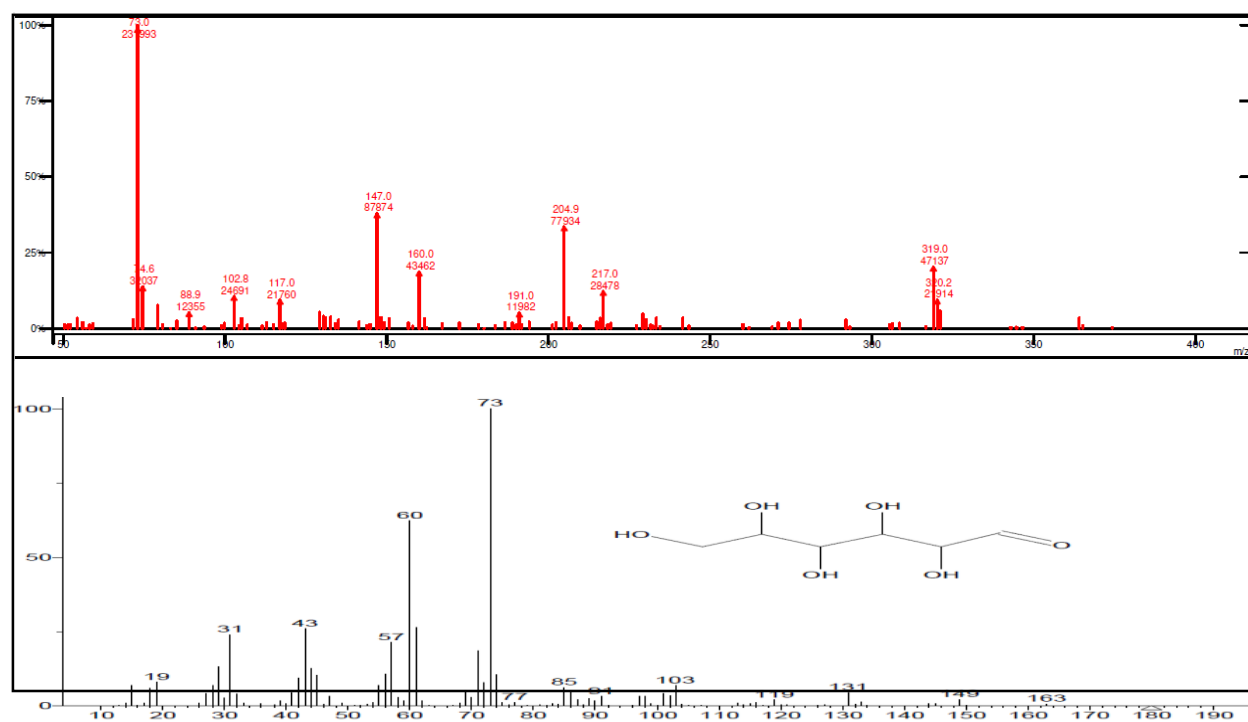
Apéndices F. Espectros de masas para el L-asparagina obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en negro es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



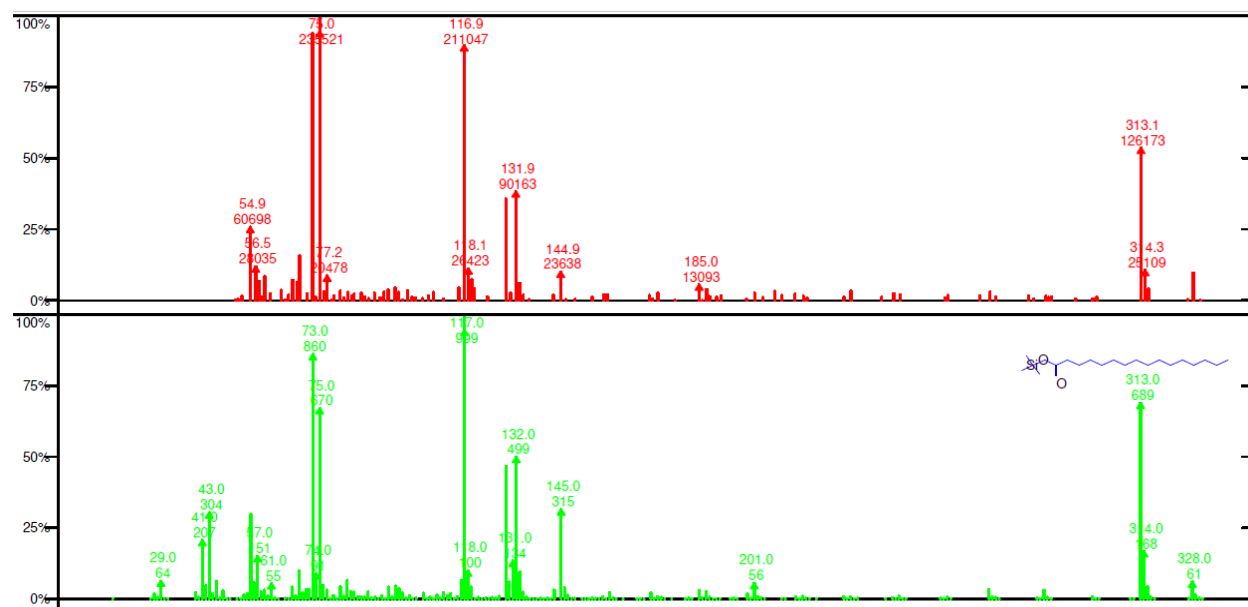
Apéndices G. Espectros de masas para el ácido l-glutámico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



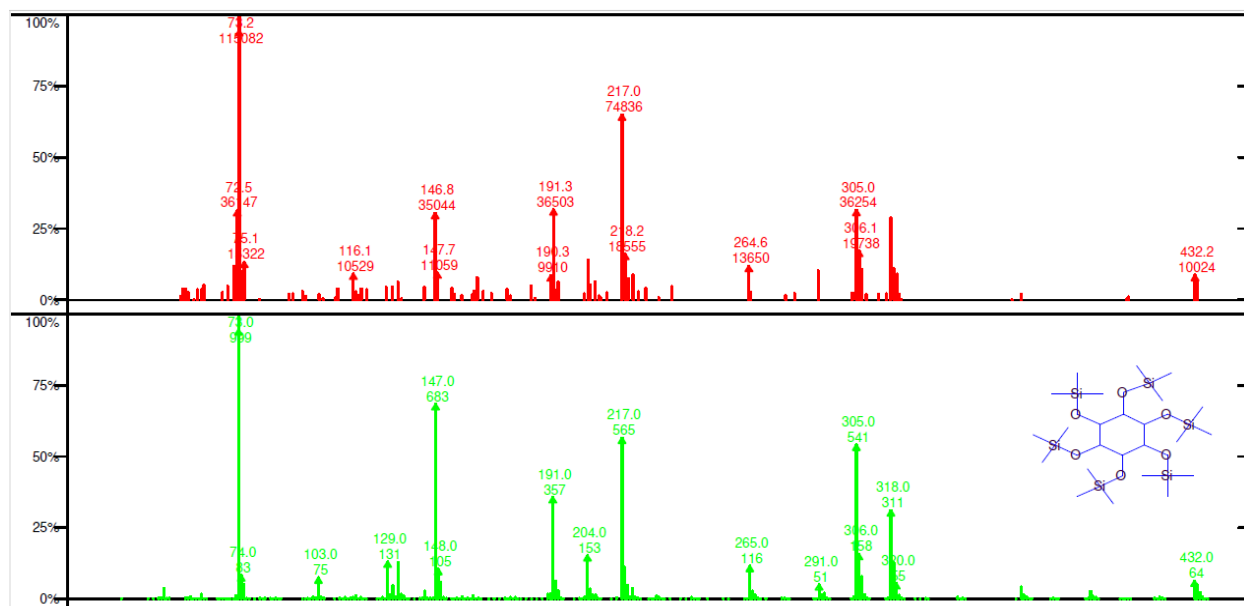
Apéndices H. Espectros de masas para el ácido cítrico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



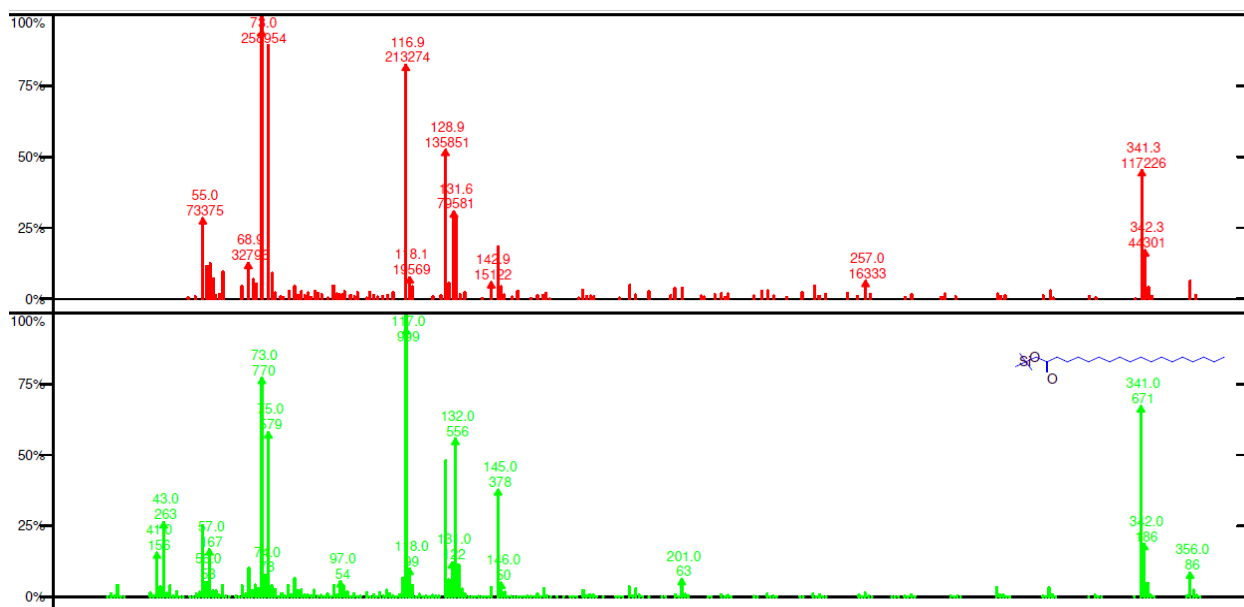
Apéndice I. Espectros de masas para la glucosa obtenida en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en negro es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



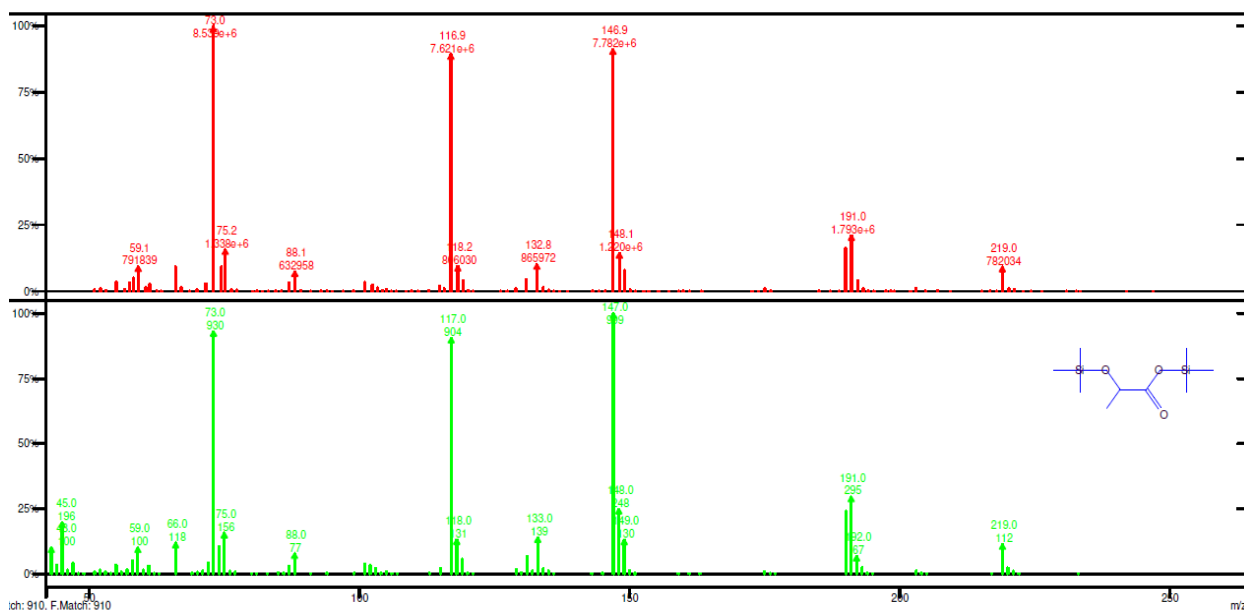
Apéndice J. Espectros de masas para el ácido palmítico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



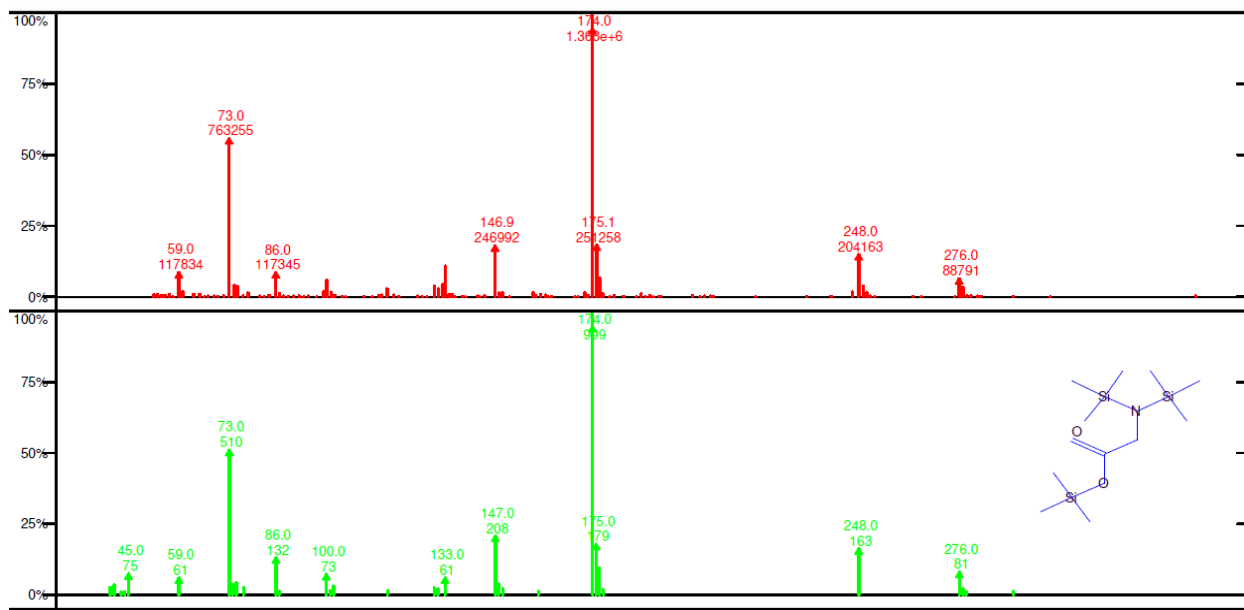
Apéndices K. Espectros de masas para el Myo-inositol obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



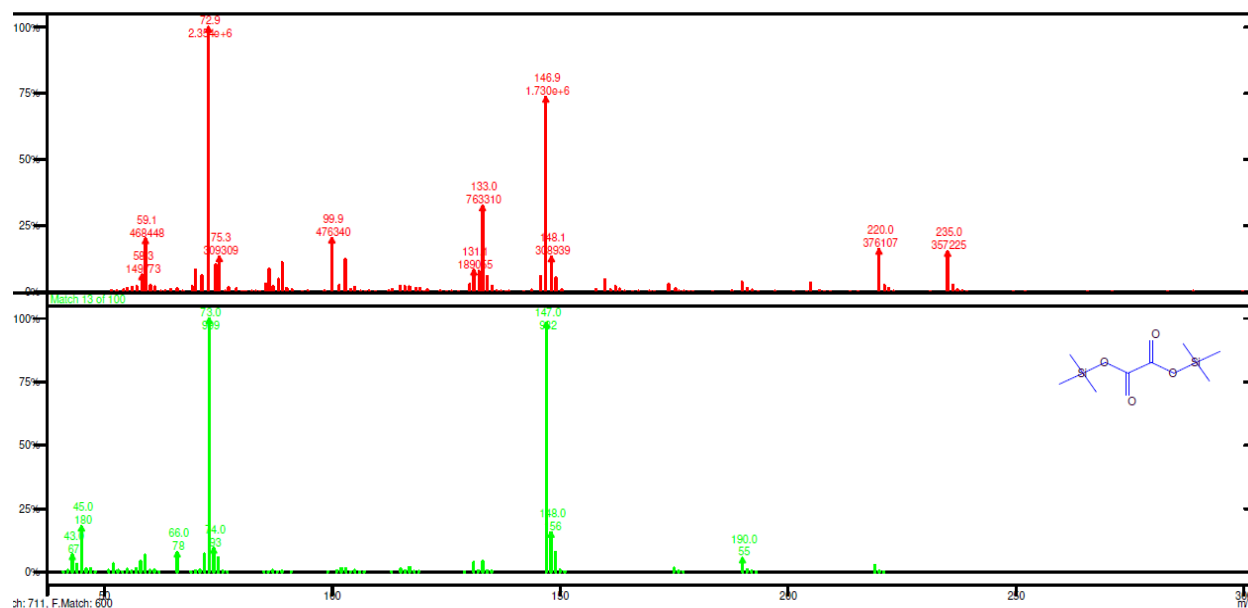
Apéndices L. Espectros de masas para el ácido esteárico obtenido en el tratamiento de 12 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



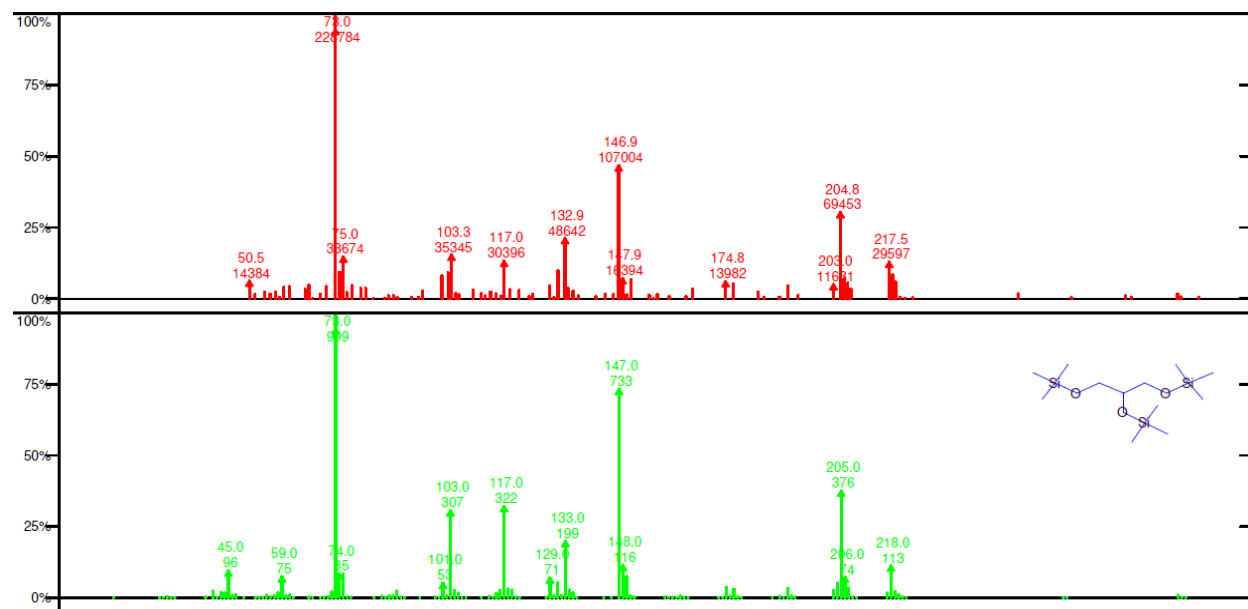
Apéndices M. Espectros de masas para el ácido láctico obtenido en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



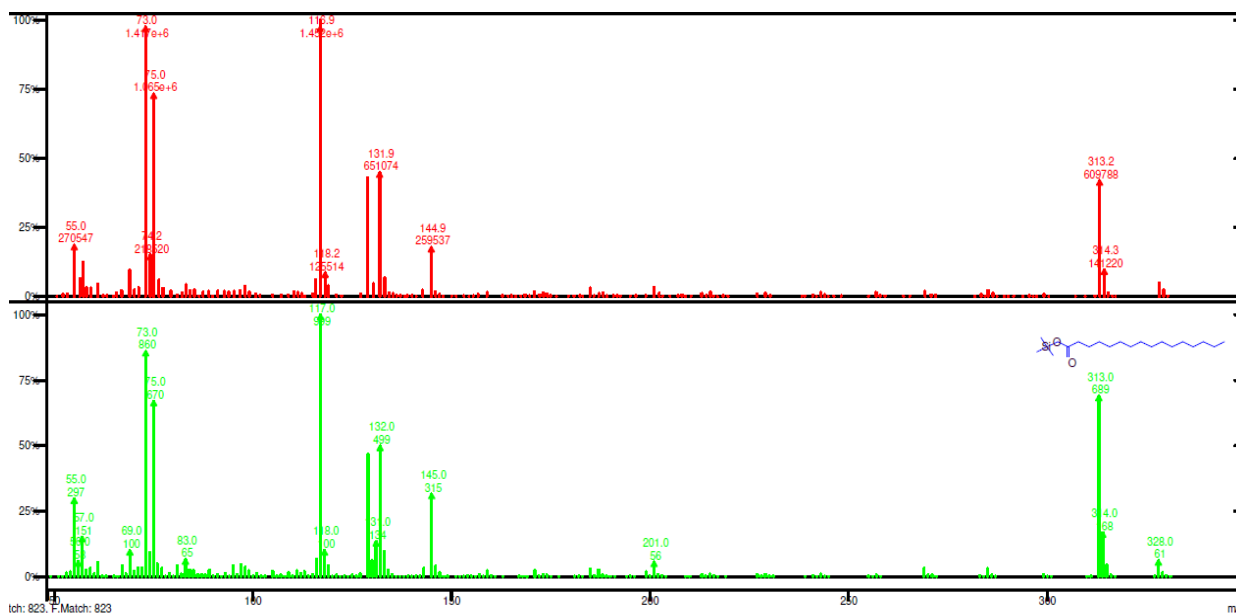
Apéndices N. Espectros de masas para la glicina obtenida en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



Apéndice O. Espectros de masas para el ácido oxálico obtenido en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



Apéndice P. Espectros de masas para el glicerol obtenido en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.



Apéndice Q. Espectros de masas para el ácido palmítico obtenido en el tratamiento de 24 horas, donde el espectro en verde es el suministrado por la base de datos y el rojo es el experimental.