

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Evaluación de la actividad citotóxica de compuestos orgánicos híbridos de tetrahydroquinolinas e isozaxoles en líneas tumorales y su mecanismo de acción

Yenny Bueno Duarte

Trabajo de investigación para optar el título de Doctora en Química

Directora

Stelia carolina méndez sánchez

Doctora en Ciencias-Bioquímica

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, GIBIM

Co-Director

Arnold Rafael Romero Bohórquez

Doctor en Química

Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal, CODEIM

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

“...y cuando menos lo esperas, todo sale bien....”

A Dios, que tiene el universo en sus manos...

Agradecimientos

A Dios por la vida, la salud y por darme la oportunidad de continuar con mis estudios.

A mi familia por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de este proceso.

A mi novio Diego, por su colaboración y apoyo.

A la profe Stelia por su orientación y compromiso incondicional en cada etapa de este doctorado, sufrimos juntas este proceso hasta el final. Pero sus enseñanzas más que académicas son personales; no olvidaré su positivismo, y su frase célebre me acompañará por siempre.

Al grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander y a todas las personas del parque tecnológico de Guatiguará, que aportaron para el desarrollo de este proyecto de investigación. A Luís Carlos por su asesoría en bioenergética. A Marilyn por su ayuda y apoyo hasta el final, fue un ser de luz en mi camino doctoral. A Fausto por la síntesis de los compuestos y su buena disposición en el desarrollo del proyecto de investigación.

A la doctora Silvia Cadena del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad Federal de Paraná, Curitiba, Brasil por recibirme en su laboratorio y compartir sus conocimientos conmigo. Igualmente a Anna Paula Brand del mismo grupo de investigación.

Al Grupo de Investigación en Biomédica Traslacional de la Fundación Cardiovascular y a Sandra Sanabria por compartir sus conocimientos y amistad en el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto Insuasty Oncología e Investigación por la donación de la droga anticancerígena Oxaliplatino que usamos en los ensayos de viabilidad celular.

A la Universidad Industrial de Santander por ser el espacio del saber, y por el apoyo económico brindado a través del crédito condonable, para llevar a cabo este proceso de formación.

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión, a la Facultad de Ciencias y al programa de Posgrados de Química por el apoyo económico para la divulgación de los resultados obtenidos en eventos académicos.

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Tabla de contenido

Introducción	17
1. Objetivos	22
1.1 Objetivo General	22
1.2 Objetivos específicos	22
2. Citotoxicidad en líneas cancerígenas	23
2.1 Introducción	23
2.2 Materiales y métodos	26
2.2.1 Síntesis de los compuestos híbridos	26
2.2.2 Reactivos	27
2.2.3 Células	27
2.2.4 Determinación de viabilidad celular	28
2.2.5 Análisis morfológico	28
2.2.6 Análisis estadístico	29
2.3 Resultados y discusión	29
2.4 Conclusiones	40
3. Análisis del mecanismo de inducción de muerte celular de los compuestos más citotóxicos	
41	
3.1 Introducción	41
3.1.1 Apoptosis	42
3.1.2 Autofagia	44

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

3.1.3 Necroptosis.....	47
3.2 compuesto híbrido 3c en células de carcinoma cervical humano (HeLa).....	50
3.2.1 materiales y métodos.....	50
3.2.2 Resultados	52
3.2.3 Discusión.....	58
3.3 Compuesto híbrido 3j en células carcinoma pulmonar humano (A549)	61
3.3.1 Materiales y métodos	61
3.3.2 Resultados	64
3.3.3 Discusión.....	72
3.4 Compuesto híbrido 3j En células hepatoma humano (HepG2)	76
3.4.1 Materiales y métodos	76
3.4.2 Resultados	79
3.4.3 Discusión.....	85
3.5 Conclusiones	88
4. Respiración en células de hepatoma	89
4.1 Introducción	89
4.1.1 La biología mitocondrial y el cáncer.....	90
4.1.2 Potenciales dianas farmacológicas mitocondriales para la terapia del cáncer	93
4.2 Materiales y métodos	95
4.2.1 Células.....	96

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

4.2.2 Determinación de viabilidad celular	96
4.2.3 Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos de rata	96
4.2.4 Determinación de la viabilidad de los hepatocitos	98
4.2.5 Análisis morfológico.....	99
4.2.6 Determinación del consumo de oxígeno en células HepG2	99
4.2.7 Determinación de ERO	100
4.2.8 Análisis estadístico.....	100
4.3 Resultados	100
4.3.1 Determinación de la viabilidad de células HepG2	101
4.3.2 Efecto sobre la morfología de HepG2	103
4.3.3 Efecto sobre la viabilidad de hepatocitos de rata	104
4.3.4 Determinación del consumo de oxígeno en células HepG2	106
4.3.5 Determinación de ERO	108
4.4 Discusión.....	109
4.4.1 Compuestos híbridos 3k Y 3e	110
4.4.2 Compuestos híbridos 3j Y 3a	113
4.4.3 Compuestos híbridos 3k Y 3j.....	118
4.5 Conclusiones	119
5. Recomendaciones.....	121
6. Divulgación de resultados	122

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Referencias.....123

Apéndice141

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo de reacción para obtener los híbridos de THQ- isoxazoles.	26
Figura 2. Efecto de los compuestos híbridos sobre las células A549 y células Vero después de 48 horas de tratamiento.	35
Figura 3. Efecto de los compuestos híbridos sobre las células HepG2 y células Vero después de 48 horas de tratamiento..	35
Figura 4. Efecto del híbrido 3c y oxaliplatino sobre la viabilidad celular después de 48 horas de tratamiento..	36
Figura 5. Efecto del híbrido 3j y oxaliplatino sobre la viabilidad celular después de 48 horas de tratamiento.	37
Figura 6. Análisis morfológico de células HeLa y B16F10 con el híbrido 3c por 48 horas de tratamiento..	38
Figura 7. Análisis morfológico de células HepG2 y A549 con el híbrido 3j por 48 horas de tratamiento..	39
Figura 8. Vías de inducción de apoptosis.	43
Figura 9. Macroautofagia..	45
Figura 10. Características morfológicas de necroptosis y apoptosis en células cancerígena	47
Figura 11. La vía molecular de la necroptosis desencadenada por la familia de receptores de muerte.....	49
Figura 12. Efecto del compuesto 3c sobre la viabilidad de células HeLa a 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento.....	54
Figura 13. Efecto del compuesto híbrido 3c sobre la viabilidad de la línea celular HeLa.	55
Figura 14. Efecto del compuesto 3c sobre la morfología de las células tumorales HeLa.	56

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Figura 15. Efecto del híbrido 3c sobre la liberación de citocromo c	57
Figura 16. Efecto del compuesto 3c sobre la fragmentación de ADN.....	58
Figura 17. Efecto del compuesto híbrido 3j sobre la viabilidad de células A549 a 12, 24 y 48 horas de tratamiento	65
Figura 18. Efecto de compuesto híbrido 3J [25 μ M] sobre la proliferación de células A549 mediante el método de cristal violeta.....	66
Figura 19. Efecto del compuesto 3j sobre la morfología de las células tumorales A549 incubadas durante 24 horas.....	68
Figura 20. Aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) después del tratamiento con el compuesto híbrido 3J.	69
Figura 21. Efecto del compuesto híbrido 3J sobre la lipoperoxidación en células tumorales A549.....	70
Figura 22. Efecto del compuesto híbrido 3J sobre el potencial de membrana mitocondrial.	71
Figura 23. Efecto del compuesto híbrido 3j sobre células A549 tratadas con Anexina V y sytox.	72
Figura 24. Efecto del compuesto híbrido 3j sobre la viabilidad de células HepG2.	80
Figura 25. Efecto del compuesto 3j sobre la morfología de las células tumorales HepG2 incubadas durante 24 horas.....	81
Figura 26. Aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) después del tratamiento con el compuesto híbrido 3J.	82
Figura 27. Efecto del compuesto híbrido 3J sobre el potencial de membrana mitocondrial.	83
Figura 28. Efecto del compuesto 3J sobre la fragmentación de ADN.....	84

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Figura 29. Efecto del compuesto híbrido 3j sobre células HepG2 tratadas con Anexina V y sytox.	85
Figura 30. Efecto de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a sobre la viabilidad celular de células HepG2 después de 12, 24 y 48 h de tratamiento.....	102
Figura 31. Análisis morfológico del efecto de los híbridos 3k, 3e, 3j y 3a (25 μ M) en células HepG2 por 24 horas de tratamiento.	104
Figura 32. Efecto de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a sobre la viabilidad celular de hepatocitos y células HepG2, después de 24 h de tratamiento.	105
Figura 33. Efecto de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a sobre el consumo de oxígeno en células HepG2.	107
Figura 34. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) después del tratamiento con los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a (25 μ M).	109

Lista de tablas

Tabla 1. Actividad citotóxica de una familia de híbridos de tetrahydroquinolina (THQ)/ isoxazoles en una serie de líneas celulares que incluyen HeLa, A549, HepG2, B16F10 y VERO.	31
Tabla 2. Efecto del compuesto 3c sobre la viabilidad de células.....	54
Tabla 3. Valores de CC50 del compuesto híbrido 3j con respecto al tiempo	65
Tabla 4. Valores de CC50 del compuesto híbrido 3j con respecto al tiempo	80

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS HÍBRIDOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS E ISOZAXOLES EN LÍNEAS TUMORALES Y SU MECANISMO DE ACCIÓN*

AUTORA: YENNY BUENO DUARTE**

PALABRAS CLAVE: MUERTE CELULAR, HÍBRIDOS DETETRAHIDROQUINOLINAS -ISOZAXOLES, BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

DESCRIPCIÓN:

Las tetrahydroquinolinas (THQ) e isozaxoles son heterociclos con diversas propiedades antibacteriales, antimifúngcas, antioxidantes, anticonvulsivos y antitumorales. Su importancia farmacológica ha llevado al grupo de investigación CODEIM a sintetizar híbridos de estos compuestos con el propósito de potenciar sus propiedades antitumorales.

De esta forma fueron sintetizados 16 compuestos híbridos de THQ e isozaxoles y se determinó su viabilidad celular en cuatro líneas tumorales y una línea celular normal. Los híbridos 3a, 3e, 3j y 3k presentaron las mejores concentraciones citotóxicas en células tumorales de hígado (HepG2), el compuesto 3c fue el más citotóxico en células tumorales de cuello uterino (HeLa) y el compuesto 3j presentó la CC₅₀ más baja en células tumorales de pulmón (A549). Posteriormente, fue evaluado el mecanismo de muerte celular de los compuestos más citotóxicos en cada línea celular, mediante diversas técnicas como citometría de flujo, medida intracelular de especies reactivas de oxígeno, lipoperoxidación de membrana, potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c y fragmentación de ADN. Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto 3c inducía apoptosis en las células HeLa, el compuesto 3j inducía varios tipos de muerte celular como necrosis y autofagia en células A549 y el compuesto 3j inducía apoptosis y necrosis en células HepG2.

Finamente, se escogieron los homólogos estructurales 3j-3a y 3k-3e para evaluar su efecto sobre la bioenergética mitocondrial en células HepG2 y mitocondrias aisladas de hígado de rata. Los resultados sugieren que el efecto citotóxico de los compuestos analizados está relacionado con el efecto inhibitorio sobre la cadena de transporte de electrones.

* Trabajo de investigación.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Doctorado en Química.

Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D. Codirector: Arnold Romero, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF HYBRID ORGANIC COMPOUNDS OF TETRAHYDROQUINOLINES AND ISOZAXOLES IN TUMOR LINES AND ITS ACTION MECHANISM*

AUTHOR: YENNY BUENO DUARTE**

KEYWORDS: CELULAR DEATH, HIBRIDOS TETRAHYDROQUINOLINE- ISOZAXOLE, MITOCHONDRIAL BIOENERGETIC.

DESCRIPTION:

Tetrahydroquinolines (THQ) and isozaxoles are heterocycles with various properties like antibacterial, antifungal, antioxidant, anticonvulsant and antitumor. Its pharmacological importance has led the CODEIM research group to synthesize hybrids of these compounds in order to enhance their antitumor properties.

In this way, 16 hybrid compounds of THQ and isozaxoles were synthesized and their cell viability was determined in four tumor lines and a normal cell line. Hybrids 3a, 3e, 3j and 3k presented the best cytotoxic concentrations in liver tumor cells (HepG2), compound 3c was the most cytotoxic in cervical tumor cells (HeLa) and compound 3j had the lowest CC₅₀ in cells lung tumors (A549). Subsequently, the mechanism of cell death of the most cytotoxic compounds in each cell line was evaluated by various techniques such as flow cytometry, intracellular measurement of reactive oxygen species, membrane lipoperoxidation, mitochondrial membrane potential, fragmentation of DNA and release of cytochrome. The results obtained showed that compound 3c induced apoptosis in HeLa cells, compound 3j induced several types of cell death such as necrosis and autophagy in A549 cells and compound 3j induced apoptosis and necrosis in HepG2 cells.

Finally, structural homologues 3j-3a and 3k-3e were chosen to evaluate their effect on mitochondrial bioenergetics in HepG2 cells and mitochondria isolated from rat liver. The results suggest that the cytotoxic effect of the compounds analyzed is related to the inhibitory effect on the electron transport chain.

* Trabajo de investigación.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Doctorado en Química.

Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D. Codirector: Arnold Romero, Ph.D.

Introducción

El cáncer constituye uno de los problemas de salud más graves en varios países del mundo, es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células, la proliferación celular independiente de mitógenos, la presencia de alta inestabilidad genética, la presencia de mutaciones en variadas etapas del ciclo celular, las vías de señalización y/o en el proceso de inducción de apoptosis; y finalmente, la invasión de otros tejidos (metastásis) (Siegel *et al.*, 2015).

El avance en el estudio de la biología molecular del cáncer y el desarrollo de métodos que han permitido identificar las mutaciones en las proteínas implicadas en el desarrollo de los tumores en las diversas etapas del desarrollo de la enfermedad; lo cual ha generado muchas posibilidades en el desarrollo de tratamientos más efectivos, ante los mecanismos de resistencia, cada vez más comunes en el tratamiento quimioterapéutico convencional.

El ciclo celular es un evento secuencial y finamente regulado que se divide en cuatro fases G_0/G_1 , S, G_2 y M. Inicialmente, las células se encuentran en un estado estacionario (G_0), que requiere del estímulo de factores de crecimiento para entrar en el estado activo (G_1), donde progresan a la fase S en la cual ocurre la síntesis del ADN, enseguida la célula pasa a la fase G_2 y la fase M donde ocurre los eventos mitóticos: condensación de los cromosomas, ruptura de la membrana nuclear, reorganización de los microtúbulos en el huso acromático, división de las cromátidas hermanas y citocinesis (Johansson y Persson, 2008). Mutaciones en diferentes proteínas encargadas de regular los puntos de control (retinoblastoma, p53, complejo promotor de la anafase APC) , son responsables de predisposición al cáncer y varias de ellas han sido asociadas con cáncer de colon, pulmón y algunos linfomas (Morgan, 2007; Cooper, 2007; Mallumbres & Bardacid, 2009; Lapennas & Giordano, 2009).

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Además de las mutaciones del ciclo celular que favorecen el desarrollo de los tumores, se requieren varias mutaciones en diferentes vías de señalización para adaptar el metabolismo del tumor y soportar su crecimiento y supervivencia (Cairns *et al.*, 2011).

Se ha observado que algunas células tumorales prefieren la generación de ATP por glucólisis, incluso en concentraciones normales de oxígeno. A este fenómeno se le ha denominado el *efecto Warburg*, y se ha relacionado con la facilidad de obtener ATP con mayor rapidez e incluso con ventajas biosintéticas para las células tumorales. Además, se ha relacionado la glucólisis, la presencia de rutas de señalización aberrante y oncogenes que promueven la proliferación celular (Cairns *et al.*, 2011).

Las rutas de señalización celular Ras/raf/MEK/ERK, la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la actividad oncogénica de WNT1, regulan varios procesos que son importantes en la progresión del cáncer, iniciación del tumor, crecimiento, muerte celular, diferenciación, metástasis y constituyen un blanco importante en el desarrollo de terapias para combatir el desarrollo de la enfermedad (Martini *et al.*, 2014; Gauthier & Ho., 2013; Tartarone *et al.*, 2013; Anastas & Moon, 2013).

Aunque el tratamiento depende del tipo de cáncer, de forma general es posible señalar las diferentes terapias que se usan actualmente para tratar la enfermedad: cirugía, radioterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida (DeSantis *et al.*, 2014). A continuación se presenta una breve descripción de la quimioterapia y la terapia dirigida:

El propósito de la quimioterapia es inducir daño en el ADN de las células tumorales e inducir apoptosis, para ello cuenta con diversos compuestos que actúan como agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa e inhibidores de mitosis, entre otros. Este tipo de

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

terapia ha tenido resultados exitosos en algunos tumores como cáncer de testículo y en algunas leucemias. Sin embargo, el efecto en el tratamiento de tumores epiteliales comunes en el seno, colon y pulmón, ha tenido resultados menos favorables y la efectividad del tratamiento ha disminuido por diversos factores como la toxicidad sistémica, la falta de especificidad, el metabolismo rápido de los fármacos y la resistencia intrínseca y adquirida que presentan estas drogas (Johnstone *et al.*, 2002).

La terapia dirigida emplea fármacos que bloquean el crecimiento y progresión del cáncer al actuar sobre proteínas específicas que son responsables del desarrollo, crecimiento y/o diseminación de la enfermedad. Algunos fármacos usados actualmente son el *Sorafenib*, cuyo efecto citotóxico en células de cáncer de hígado, seno, páncreas, colon y pulmón, aumenta la supervivencia, pero también genera resistencia en muchos pacientes (Zhang *et al.*, 2012; Nakayama *et al.*, 2012; Gauthier & Ho., 2013; Germano *et al.*, 2013; Zhu & col., 2013). Otros fármacos que han sido aprobados por la FDA y desarrollados en los 80's son el *erlotinib* (Roche) y el *gefitinib* (Iressa). Estos inhiben la proliferación celular, angiogénesis, invasión del tumor y el potencial metastásico. Sin embargo, los pacientes tratados con esta droga presentan diferentes mecanismos de resistencia (Heigener & Reck., 2011; Köhler & Schuler; 2013; Tartarone *et al.*, 2013; Bronte *et al.*, 2014).

La naturaleza continúa siendo el mayor recurso de nuevas estructuras químicas que permitan el desarrollo de nuevos fármacos. Estas nuevas estructuras pueden ser usadas de forma significativa y dirigida, mediante síntesis orgánica para poner los farmacóforos en la posición correcta y obtener más efectos benéficos (Cragg & Neuman, 2013; Dev, 2010; Monneret *et al.*, 2010; Nirmala *et al.*, 2011; Das & Satyalakshmi, 2012) efectivamente efectivos, El avance en el entendimiento de las reglas que gobiernan

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Dentro del conjunto de compuestos activos identificados y sintetizados en su totalidad, se presentan las tetrahydroquinolinas (THQ) como una característica estructural de muchos agentes farmacéuticos, cuyos derivados presentan un amplio rango de actividades biológicas (Kumars *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013; Rudenko *et al.*, 2014). Vario han reportado actividad citotóxica de derivados de tetrahydroquinolinas sobre células tumorales de seno, linfomas, pulmón y hepáticas (Ghorab *et al.*, 2009; Alqasoumi *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2013; Faidallah & Rostom, 2013). Además de efecto de estos derivados sobre procesos importantes en el desarrollo del cáncer como la angiogénesis y en el metabolismo del tumor (Walsh *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2013).

Igualmente, se han reportado propiedades farmacológicas para los isoxazoles (Palusa *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Chauhan *et al.*, 2012; Palanisamy *et al.*, 2013; Darwish *et al.*, 2014), y se ha reportado actividad citotóxica y antiproliferativa en líneas tumorales de cervix, colon y pulmón de leucemia, melanoma, ovario, seno, próstata, riñón y pulmón (Veeraswamy *et al.*, 2012; Kumbhare *et al.*, 2012; Palanisamy *et al.*, 2013; Diana *et al.*, 2014). El efecto citotóxico de las THQ e isoxazoles en células cancerígenas, pone de manifiesto la importancia de estos compuestôs en el desarrollo de potenciales compuestos antitumorales.

Un compuesto antitumoral debe generar efecto citotóxico mediante un mecanismo de muerte celular programada (MCP) que le permita eliminar las células tumorales y presentar poco o ningún efecto sobre los tejidos vecinos. Inicialmente, se consideraba la apoptosis como el mecanismo de MCP ideal para los compuestos quimioterapéuticos. Sin embargo, se han identificado otros mecanismos regulados como necroptosis, autofagia, mitoptosis, entre otros, que pueden convertirse en alternativas para los diversos mecanismos de resistencia que presentan

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

las células tumorales al tratamiento que induce apoptosis (Chaabane *et al.*, 2013; Radogna *et al.*, 2014).

Estos mecanismos de resistencia y la variabilidad genética existentes en los tumores, señalan a las mitocondrias como objetivos funcionales en todos los tipos de cáncer. De esta manera, la identificación de la mitocondria como el blanco primario o secundario de una droga puede facilitar el descubrimiento del mecanismo de acción y abrir nuevas perspectivas de su aplicación y de los efectos secundarios que puede tener (Szewczyk & Wojtczak, 2002). Teniendo en cuenta la importancia de las mitocondrias en la demanda bioenergética y biosintética de la célula, en desencadenar mecanismos de MCP y en el metabolismo aberrante en las células malignas (Neuzil *et al.*, 2013; Dong & Neuzil, 2014; Olszewska & Szewczyk, 2013).

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la toxicidad *in vitro* de compuestos híbridos tetrahydroquinolinas-isoxazoles sobre diferentes líneas tumorales y mediante el estudio de bioenergética mitocondrial conocer el posible mecanismo de acción de estos compuestos.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los compuestos híbridos tetrahydroquinolinas-isoxazoles sobre la viabilidad y proliferación de cuatro líneas de células tumorales.
- Determinar el mecanismo de inducción de muerte celular responsable de la toxicidad de los compuestos híbridos tetrahydroquinolinas-isoxazoles.
- Estudiar el efecto de los compuestos híbridos sobre la bioenergética de mitocondrias extraídas de hígado de rata.



1. Citotoxicidad en líneas cancerígenas

“Hemos entrado en la célula, mansión de nuestro nacimiento, y comienzo del inventario de nuestra riqueza adquirida”

Albert Claude

2.1 Introducción

El avance en el entendimiento de las reglas que gobiernan el desarrollo del ciclo celular, el conocimiento en las mutaciones que se presentan en proteínas específicas y la determinación de vías de señalización que contribuyen a la proliferación de las células cancerígenas, promueve el diseño racional de fármacos que puedan eliminar específicamente las células tumorales. La búsqueda de estas fuentes de compuestos se ha dirigido hacia fuentes naturales, como un campo adecuado para la búsqueda de los potenciales fármacos. La naturaleza produce una gran librería de estructuras químicas de gran diversidad y función (Cragg *et al.*, 2009; Nobili *et al.*, 2009; Dev, 2010; Monneret *et al.*, 2010). De manera significativa y dirigida, mediante síntesis orgánica se puede usar esas estructuras moleculares presentes en los productos naturales, haciendo copias sintéticas y así poner los farmacóforos en la posición correcta para obtener más efectos benéficos en términos del perfil biológico (Max & Wang, 2009). Aunque los productos naturales también inspiran la química medicinal para descubrir nuevas drogas, el proceso de descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales es un proceso difícil, tedioso y consume tiempo. El descubrimiento moderno de fármacos aplica las herramientas de la química sintética como un enfoque innovador y orientado a explorar la química biológicamente activa más rápidamente (Das & Satyalakshmi, 2012). Los productos naturales han desempeñado un papel fundamental en la identificación de diversos medicamentos, incluyendo compuestos antibacterianos, antifúngicos, antituberculosis y antitumorales (Nirmala, 2011).

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Varios de los heterociclos activos que exhiben propiedades farmacológicas han sido identificados y sintetizados en su totalidad (Kumar *et al.*, 2011; Dasari *et al.*, 2015; Marchetti *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016). Dentro de estos heterociclos se destacan las tetrahydroquinolinas como una característica estructural de muchos agentes farmacéuticos, cuyos derivados presentan un amplio rango de actividades biológicas, que incluyen inhibición de la proteína farnesiltransferasa, antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), antiinflamatorios, anti-arritmicos, supresores inmunológicos, actividad antiviral, antibacterial, anti-VIH, antituberculosis, antifúngicos y moderada actividad antioxidante (Kumar *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013; Rudenko *et al.*, 2014; Chander *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 2016). Varios estudios han reportado actividad citotóxica de derivados de tetrahydroquinolinas sobre células tumorales de seno, linfomas, pulmón y hepáticas (Ghorab *et al.*, 2009; Alqasoumi *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2013; Faidallah & Rostom, 2013; Kouznetsov *et al.*, 2016; Chen y col., 2016). Adicionalmente, los trabajos realizados por Walsh y colaboradores muestran que derivados de THQ son activadores de la isoforma M2 de la piruvato quinasa (PKM2); esta isoforma está presente en la mayoría de los tumores como un dímero inactivo y se ha determinado que su actividad disminuida favorece el desarrollo del tumor al aumentar los niveles de intermediarios glucolíticos para procesos anabólicos como la síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos y lípidos (Walsh *et al.*, 2011). Del mismo modo, se ha determinado que derivados de las THQ son moléculas activas como antiangiogénesis, siendo la angiogénesis uno de los procesos propios de los tumores más agresivos y que aseguran su desarrollo y posterior metástasis (Reddy *et al.*, 2013).

Por su parte, la síntesis de nuevos isoxazoles se mantiene como un objetivo importante de la investigación medicinal. Se ha reportado que estos compuestos poseen propiedades

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

farmacológicas tales como antifúngica, antibacterial, anticonvulsiva, anti-inflamatoria, antiviral, analgésica, antioxidante, antituberculosa, antitumoral y antidepresivas (Palusa *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Chauhan *et al.*, 2012; Palanisamy *et al.*, 2013; Darwish *et al.*, 2014). En cuanto a su actividad antitumoral, se ha establecido actividad citotóxica y antiproliferativa en líneas tumorales de cérvix, colon y pulmón (Veeraswamy *et al.*, 2012; Kumbhare *et al.*, 2012; Palanisamy *et al.*, 2013; Diana *et al.*, 2014). Igualmente, los derivados de isoxazoles evaluados por Kamal y colaboradores en 2011, presentaron actividad citotóxica en varias líneas tumorales de leucemia, melanoma, ovario, seno, próstata, riñón y pulmón. El estudio del posible mecanismo de acción de estos derivados mostró que estos compuestos aumentaban la cantidad de células presentes en la fase G2/M lo que indicaría la detención del ciclo celular, posiblemente como resultado de la acción de los derivados como inhibidores de la ciclina B1, la CDK1 y la polimerización de los microtúbulos (Kamal *et al.*, 2011).

Al-Sanea y sus colaboradores en 2013 mostraron que derivados de estos compuestos tienen efecto inhibitorio sobre receptores de membrana tipo tirosina quinasa MAPK14 y MAP quinasa p38; la importancia de estos receptores en los procesos de diferenciación y proliferación celular, así como en la regulación del ciclo celular y la apoptosis demuestran el papel determinante que los derivados de los isoxazoles pueden tener en el desarrollo de potenciales compuestos antitumorales.

Los compuestos híbridos de THQ-isoxazoles usados en el presente estudio, fueron sintetizados a partir de la formación del correspondiente derivado N-propagil tetrahidroquinolina a través de tres reacciones catiónicas imino Diels-Alder, y la formación de los sistemas híbridos THQ-isoxazoles fueron obtenidos mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar.

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

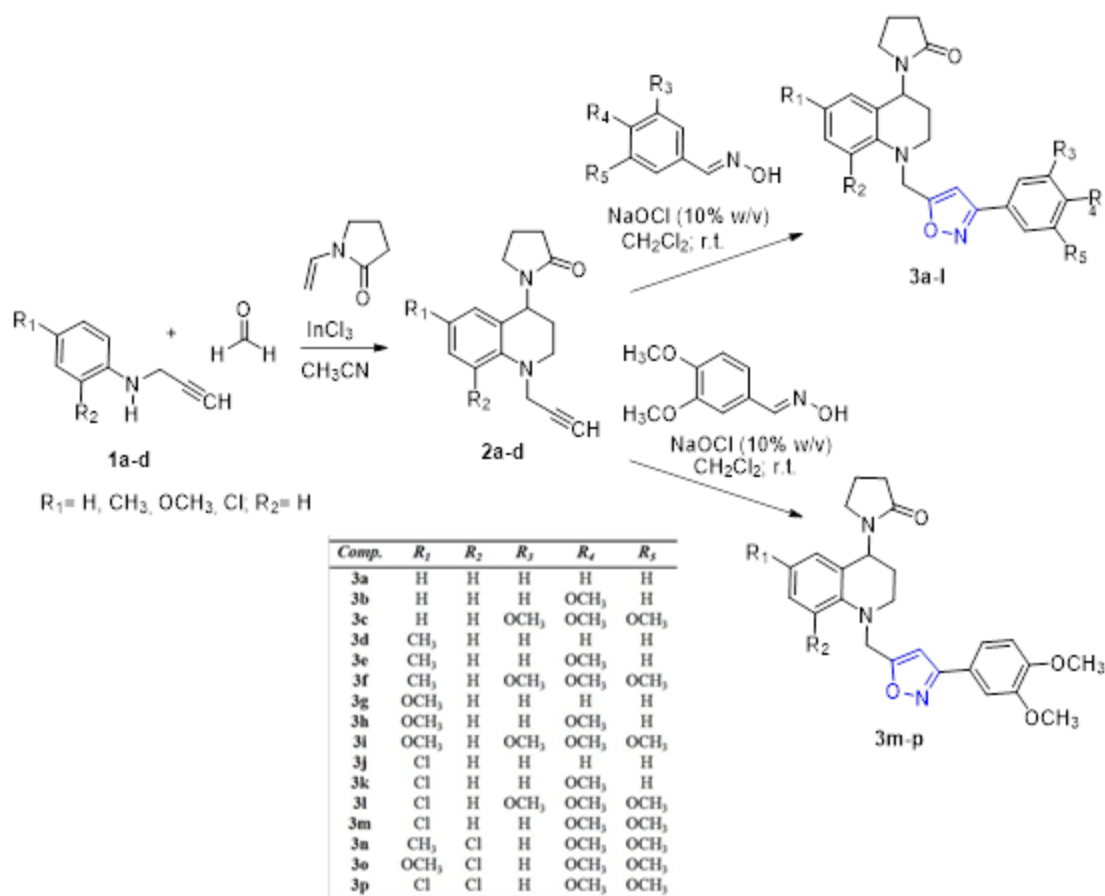


Figura 1. Mecanismo de reacción para obtener los híbridos de THQ- isoxazoles.

Estos compuestos fueron evaluados en diferentes líneas celulares con el propósito de establecer su actividad citotóxica, índice de selectividad y finalmente, se realizó un análisis morfológico de los compuestos más citotóxicos.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Síntesis de los compuestos híbridos

La síntesis de nuevos compuestos híbridos tetrahydroquinolina-/isoxazol se realizó en el Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) por el Químico Fausto Marín, a partir de anilinas 4-sustituidas, para la posterior obtención de las *N*-propargil-4-

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

(2'-oxopirrolidin-1'-il) tetrahydroquinolinas y las oximas de los aril aldehídos benzaldehído, 4-metoxibenzaldehído, 3,4-dimetoxibenzaldehído y el 3,4,5-trimetoxibenzaldehído, a través de una reacción de imino Diels-Alder catiónica y una cicloadición 1,3-dipolar. Los híbridos moleculares fueron caracterizados por las técnicas espectroscópicas IR, resonancia magnética nuclear (RMN) y estudios de espectrometría de masas ESI-MS, con los cuales fue posible comprobar la estructura de los híbridos moleculares obtenidos (Marín, 2014).

2.2.2 Reactivos

El suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de LABG&M, los medios de cultivo EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute), la proteína tripsina y los reactivos dimetilsulfóxido (DMSO), MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5-difenil tetrazolio) y EDTA (ácido trietilendiaminotetracético) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los demás reactivos usados fueron obtenidos comercialmente con alto grado de pureza.

2.2.3 Células

Fueron usados diferentes tipos de células cancerígenas humanas: células HeLa (Células de carcinoma cervical humano), HepG2 (células de hepatoma humano), A549 (Células de carcinoma pulmonar humano), B16F10 (Células de melanoma murino) y una línea de células normales VERO (Células de riñón de mono verde africano). Las células HeLa, HepG2, A549 y VERO fueron cultivadas en medio EMEM, y las células B16F10 en medio de cultivo RPMI usando 10% de suero fetal bovino y un pH de 7.4. Los repiques de cada línea celular se realizaron usando una solución de tripsina-EDTA.

2.2.4 Determinación de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por el método del MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5- difenil tetrazolio) de acuerdo a lo descrito por Mossman (1983). Con este método las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio formando cristales de formazan solubles en DMSO que pueden ser cuantificados a 570 nm.

Se usaron 7.5×10^3 células/pozo de las líneas celulares HepG2, A549, B16F10, VERO y 1.0×10^4 células/pozo para los ensayos con HeLa. Las células en estudio fueron adicionadas en placas de 96 pozos, incubadas a 37°C con 5% de atmosfera de CO₂ durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente, se adicionaron soluciones de 5, 25, 50 y 100 µM de cada compuesto y se incubaron por 48 horas. En cada uno de los tratamientos se mantuvo un porcentaje de 0,1% de DMSO. Al cabo de este tiempo, fue adicionado 200 µL de MTT (500µg.mL⁻¹ en HBSS) y las células fueron incubadas por 3 horas. Después del tiempo de incubación, los cristales formados fueron solubilizados en 200 µL de DMSO y cuantificados a 570 nm, mediante un lector de microplaca. Las CC₅₀ fueron calculadas con el software GraphPad Prism.

2.2.5 Análisis morfológico

Células de cada línea celular (1×10^5 células/pozo) fueron depositadas en placas de 12 pozos e incubadas en atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Después de la adhesión, el medio de cultivo fue reemplazado con medio conteniendo la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de los compuestos híbridos que presentaban la mejor actividad en cada línea celular evaluada. Posterior al tratamiento, las células fueron fijadas con etanol por 5 minutos y teñidas con hematoxilina y eosina. Finalmente, los cambios morfológicos fueron examinados con un microscopio invertido con un aumento de 40x.

2.2.6 Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados en triplicado en tres ensayos independientes, y los valores obtenidos fueron analizados y expresados como la media $\pm$ error estándar de la media (ESM). El análisis estadístico fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de un test de tukey, con interval de confianza del 95%.

2.3 Resultados y discusión

Una familia de 16 compuestos híbridos de THQ-isoxazoles sintetizados y caracterizados, fueron evaluados en cuatro líneas tumorales: HeLa (Células de carcinoma cervical humano), HepG2 (células de hepatoma humano), A549 (Células de carcinoma pulmonar humano), B16F10 (Células de melanoma murino) y una línea transformada de células normales VERO (Células de riñón de mono verde africano), con el objetivo de establecer el efecto citotóxico y el potencial antitumoral de estos compuestos.

La tabla 1.1 presenta la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de los compuestos híbridos durante 48 horas de tratamientos sobre las cinco líneas celulares. Todos los compuestos híbridos evaluados presentan actividad citotóxica en por lo menos una línea celular. El compuesto 3c presenta el mejor efecto citotóxico en las líneas celulares HeLa y B16F10 (Figura 2 A, 2B). Por su parte, en las líneas tumorales A549 y HepG2 el compuesto 3j, presenta los mejores efectos citotóxicos (Figura 3A, 3B).

En la primera serie de compuestos híbridos de THQ-isoxazoles 3c, 3f, 3l y 3i (Tabla 1.1), es posible observar que el aumento del tamaño del sustituyente de la tetrahydroquinolina, en la posición 6, se correlaciona con disminución del efecto citotóxico en las líneas tumorales HeLa y

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

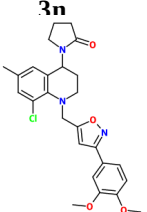
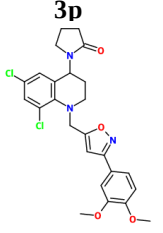
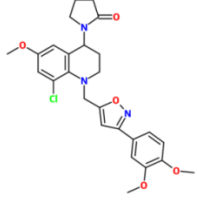
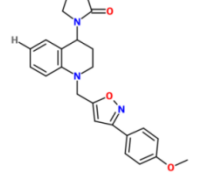
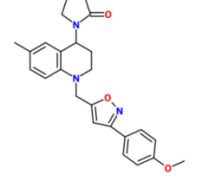
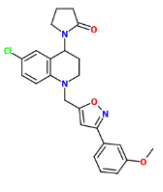
HepG2. Mientras que las líneas celulares A549 y B16F10 el mejor efecto citotóxico es para el hidrógeno, seguido del átomo de cloro, después el metil y finalmente el grupo metoxi. Estos resultados coinciden con el trabajo de Lam y colaboradores en 2013, donde fue posible observar que sustituyentes pequeños como el hidrógeno en la posición 6 e hidroxilo en la posición 8, en una familia de THQ quirales, presentaron fuerte efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer humano A549 (pulmón), MDA-MB-231 (seno), SaoS2 (sacroma), SKHep-1 (hepatoma) y Hep3B (carcinoma hepatocelular).

Para los compuestos híbridos de THQ-izoxoxoles 3m, 3n, 3p y 3o (tabla 1), se puede observar que el compuesto 3m, que contiene un átomo de cloro en la posición 6 de la tetrahydroquinolina, presenta la mejor actividad en todas las líneas celulares. La presencia de dos sustituyentes cloro en las posiciones 6 y 8 del anillo de la tetrahydroquinolina, mejora el efecto citotóxico sobre la línea tumoral A549 (compuesto 3p). Por su parte, los compuestos híbridos 3b, 3e, 3k y 3h (tabla 1), presentan el mejor efecto citotóxico en las líneas tumorales A549 y HepG2; y es notable la disminución de la actividad citotóxica conforme aumenta el tamaño del sustituyente de la THQ. También se observaron dificultades en la disolución del híbrido 3b en el vehículo, lo cual se manifestó en la alta variabilidad presentada en el efecto citotóxico sobre las líneas tumorales evaluadas (Tabla 1). En este grupo de compuestos, se destaca el efecto del compuesto 3e que presenta el mejor efecto citotóxico en la línea tumoral HepG2 ($CC_{50} 10,9 \pm 4,5 \mu M$).

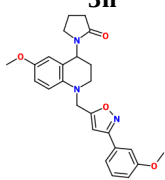
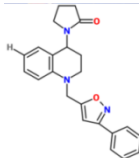
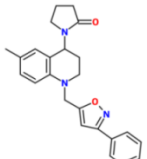
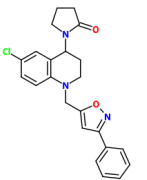
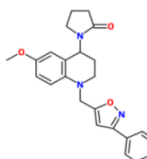
Actividad citotóxica CC₅₀ [μM]

[illegible]

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

3n 	>100	>1.0	>100	>1.0	>100	>1.0	>100	>1.0	>100
3p 	77.7 ± 28.4	1.3	22.7 ± 6.4	4.4	>100	>1.0	>100	>1.0	>100
3o 	>100	>1.0	-	-	-	-	>100	1.0	>100
3b 	>100	>1.0	52.0 ± 17.8	>1.9	19.5 ± 17.3	>5.1	>100	>1.0	>100
3e 	>100	>1.0	-	-	10,9 ± 4,5	>8.2	>100	>1.0	>100
3k 	-	-	>100	>1.0	27.6 ± 1.6	>3.6	>100	>1.0	>100

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

3h 	>100	>1.0	62.9 ± 3.9	>1.6	-	-	87.6 ± 8.3	>1.1	>100
3a 	-	-	35.3 ± 8.8	>2.8	6.8 ± 0.71	>14.7	87.9 ± 1.5	>1.1	>100
3d 	>100	>1.0	45.2 ± 3.5	>2.2	26.2 ± 4.2	>3.8	84.1 ± 2.3	>1.2	>100
3j 	52.9 ± 13.4	1.6	16.9 ± 6.4	4.9	5.2 ± 1.9	16.1	87.3 ± 13.0	± 0.94	82.2 ± 19.6
3g 	58.1 ± 8.2	1.5	72.7 ± 12.9	1.1	43.9 ± 6.9	1.9	50.4 ± 2.5	1.6	94.0 ± 3.9
Oxaliplatino	14.3 ± 2.8	3.6	31.2 ± 1.7	1.6	22.4 ± 1.1	2.3	4.9 ± 1.2	10.5	51.5 ± 2.2

De la misma manera, de los compuestos híbridos de THQ-isoxazoles 3a, 3d, 3j y 3g (tabla 1), se destaca el efecto citotóxico mostrado por los compuestos 3j y 3a, principalmente en las líneas

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

tumorales A549 y HepG2. Es posible observar como el cambio del grupo metoxi por el átomo de Cloro en la posición 6 de la THQ permite un considerable aumento en la actividad citotóxica de CC_{50} $72.7 \pm 12.9 \mu M$ a $16.9 \pm 6.4 \mu M$ en la línea celular A549 y de CC_{50} $43,9 \pm 6,9 \mu M$ a $5,2 \pm 1,9 \mu M$ en HepG2. Igualmente, el cambio del grupo metil por un hidrógeno en la posición 6 de la THQ muestra un marcado aumento de la actividad citotóxica en la línea tumoral HepG2 donde la disminución del CC_{50} es de $26,2 \pm 4,2 \mu M$ a $6,8 \pm 0,71 \mu M$.

Estos resultados son interesantes porque el carcinoma hepatocelular (CHC) es uno de los tipos de cáncer de mayor prevalencia en Colombia (Carreño y col., 2015) y se ubica como el quinto cáncer más prevalente en el mundo. Además, el tratamiento del CHC se dificulta porque frecuentemente está asociado a cirrosis, afección que constituye un problema socioeconómico en muchos países y cuyas opciones de tratamiento son limitadas. Por ello, la importancia y pertinencia de descubrir y/o desarrollar opciones terapéuticas más efectivas para el CHC (González & Prieto, 2001; Testa *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2016).

La falta de selectividad en los compuestos antitumorales usados actualmente es uno de los desafíos de los nuevos compuestos diseñados para el tratamiento del cáncer. Es interesante que los compuestos híbridos de THQ e isoxazoles que presentaron los mejores efectos citotóxicos en A549 (3p y 3j), también presentaron los mayores índices de selectividad (CC_{50} célula normal/ CC_{50} célula tumoral) 4.4 y 4.9, respectivamente (Figura 2). Del mismo modo, los compuestos 3m, 3j y 3a presentaron los mejores efectos citotóxicos en HepG2, y sus índices de selectividad representan los valores más altos registrados en esta línea celular $>9,8$, $>14,7$ y $16,1$ respectivamente (Figura 3).

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

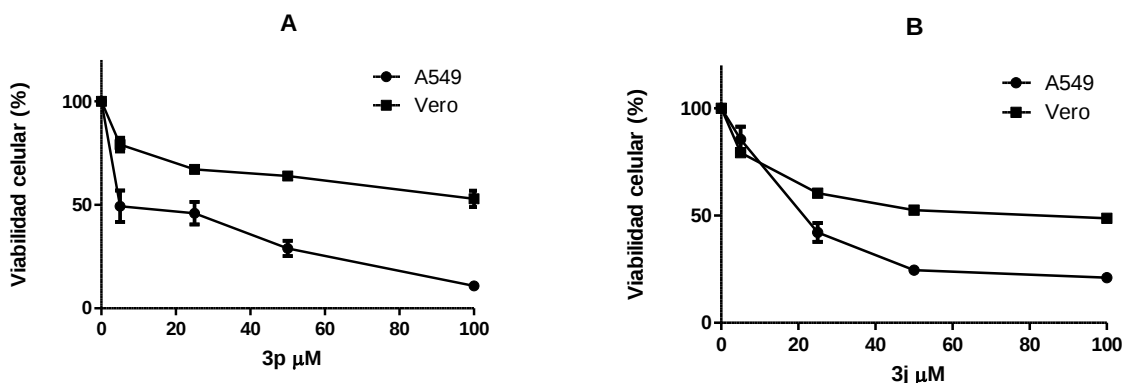


Figura 2. Efecto de los compuestos híbridos sobre las células A549 y células Vero después de 48 horas de tratamiento. Efecto de los compuestos híbridos sobre las células A549 y células Vero después de 48 horas de tratamiento. A) Híbrido 3p. B) Híbrido 3j. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de células viables en comparación con el control (los datos presentan dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas en los porcentajes de viabilidad de todas las dosis evaluadas para los compuestos híbridos sobre la línea celular A549 y a partir de la concentración de 25 μM para la línea celular Vero.

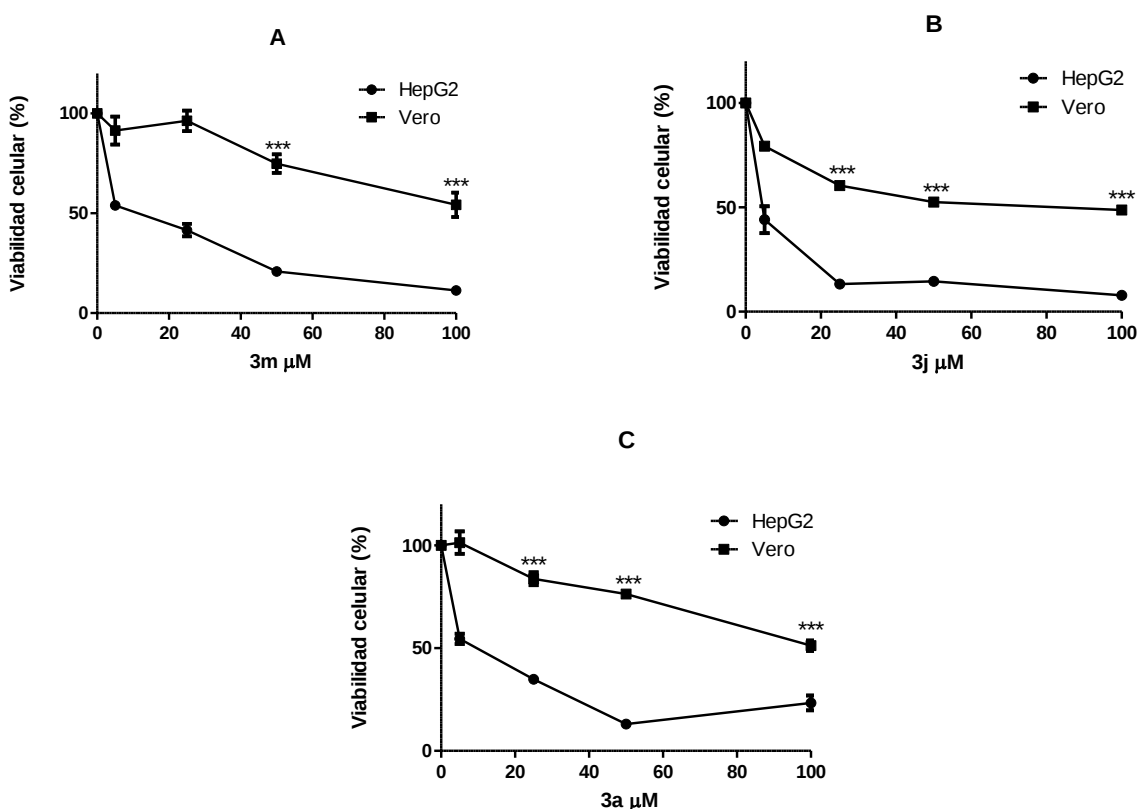


Figura 3. Efecto de los compuestos híbridos sobre las células HepG2 y células Vero después de 48 horas de tratamiento. A) Híbrido 3m. B) Híbrido 3j. C) Híbrido 3a. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de células viables en comparación con el control (los datos presentan

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas en los porcentajes de viabilidad de todas las dosis evaluadas para los compuestos híbridos sobre la línea celular HepG2 y a partir de la concentración de 25 μM para la línea celular Vero.

El oxaliplatino fue el medicamento usado como fármaco de referencia, este es un agente quimioterapéutico que ha mostrado eficacia *in vitro* e *in vivo* contra varias líneas tumorales, incluyendo algunas que han presentado resistencia al cisplatino y carboplatino (Raymond *et al.*, 1998). En este sentido, al comparar los mejores efectos citotóxicos registrados por los compuestos híbridos de THQ-isoxazoles con respecto al compuesto quimioterapéutico tomado como control positivo; es posible observar que el compuesto 3j en la línea tumoral A549, es dos veces más citotóxico y 3 veces más selectivo; mientras que HepG2, es 4 veces más citotóxico y 7 veces más selectivo (Figura 4A, 4B).

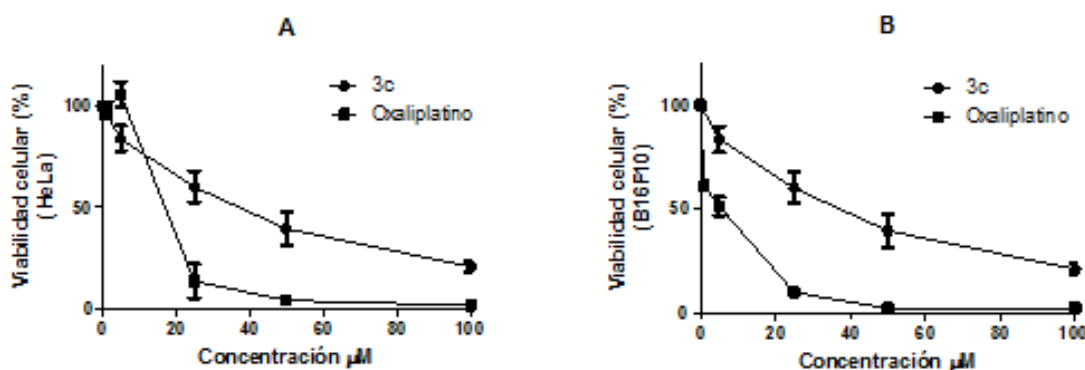


Figura 4. Efecto del híbrido 3c y oxaliplatino sobre la viabilidad celular después de 48 horas de tratamiento. A) Viabilidad de la línea tumoral HeLa. B) Viabilidad de la línea tumoral B16F10. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de células viables en comparación con el control (los datos presentan dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas en los porcentajes de viabilidad de todas las dosis evaluadas.

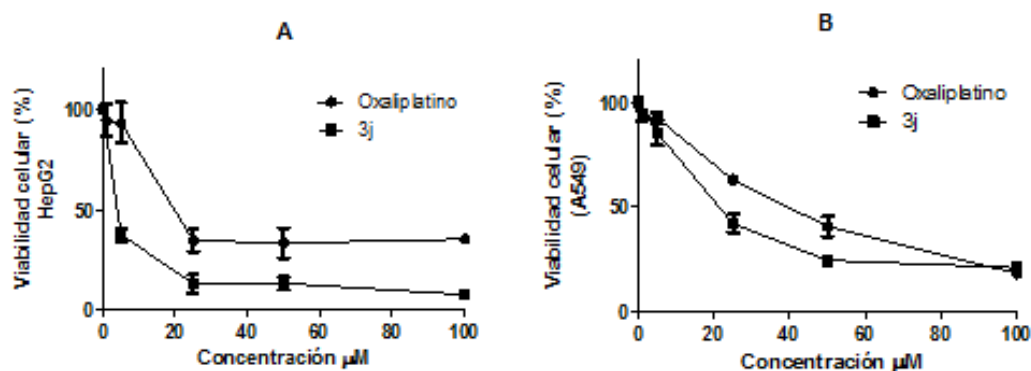


Figura 5. Efecto del híbrido 3j y oxaliplatino sobre la viabilidad celular después de 48 horas de tratamiento. A) Viabilidad de la línea tumoral HepG2. B) Viabilidad de la línea tumoral A549. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de células viables en comparación con el control (los datos presentan dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas en los porcentajes de viabilidad de todas las dosis evaluadas

El híbrido 3c en las líneas tumorales HeLa y B16F10; y el compuesto 3j en las líneas tumorales A549 y HepG2 fueron los compuestos que presentaron mayor citotoxicidad y como una aproximación al estudio del posible mecanismo de muerte, responsable del efecto citotóxico, se realizó un análisis morfológico usando la tinción de hematoxilina y eosina, de las concentraciones del IC_{50} por 48 horas de tratamiento.

En la figura 6 se muestra el efecto del compuesto 3c sobre las líneas tumorales HeLa y B16F10. El análisis muestra que el híbrido 3c genera cambios morfológicos en las dos líneas tumorales; relacionados con pérdida de la monocapa, disminución en la densidad celular y consecuente pérdida de contacto con las células adyacentes; reducción del volumen celular y desestabilización de la membrana plasmática. En las dos líneas tumorales es posible observar surcos en la membrana de las células (figura 6B y 6D), y en las células HeLa aparecen cuerpos apoptóticos (figura 6B). Se ha establecido que las células en fases tempranas de apoptosis pierden contacto con las células vecinas producto del efecto de las caspasas sobre proteínas de los sitios de adhesión célula-matrix extracelular y complejos de adhesión célula-célula (Taylor *et*

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

al., 2008). Del mismo modo, se ha observado la presencia de surcos en la membrana plasmática como consecuencia del debilitamiento del citoesqueleto, generado por el clivaje de diversas proteínas estructurales como miosina, espectrinas, α -actinina, gelsolina, filamina, tubulinas y proteínas asociadas a los microtúbulos (Häcker, 2000). Finalmente, el citoesqueleto debilitado de las células apoptóticas, dirigido por el complejo actina-miosina estrangula la membrana, permitiendo la formación de vesículas independientes (cuerpos apoptóticos) que facilitan su eliminación por los macrófagos (Hengartner, 2000).

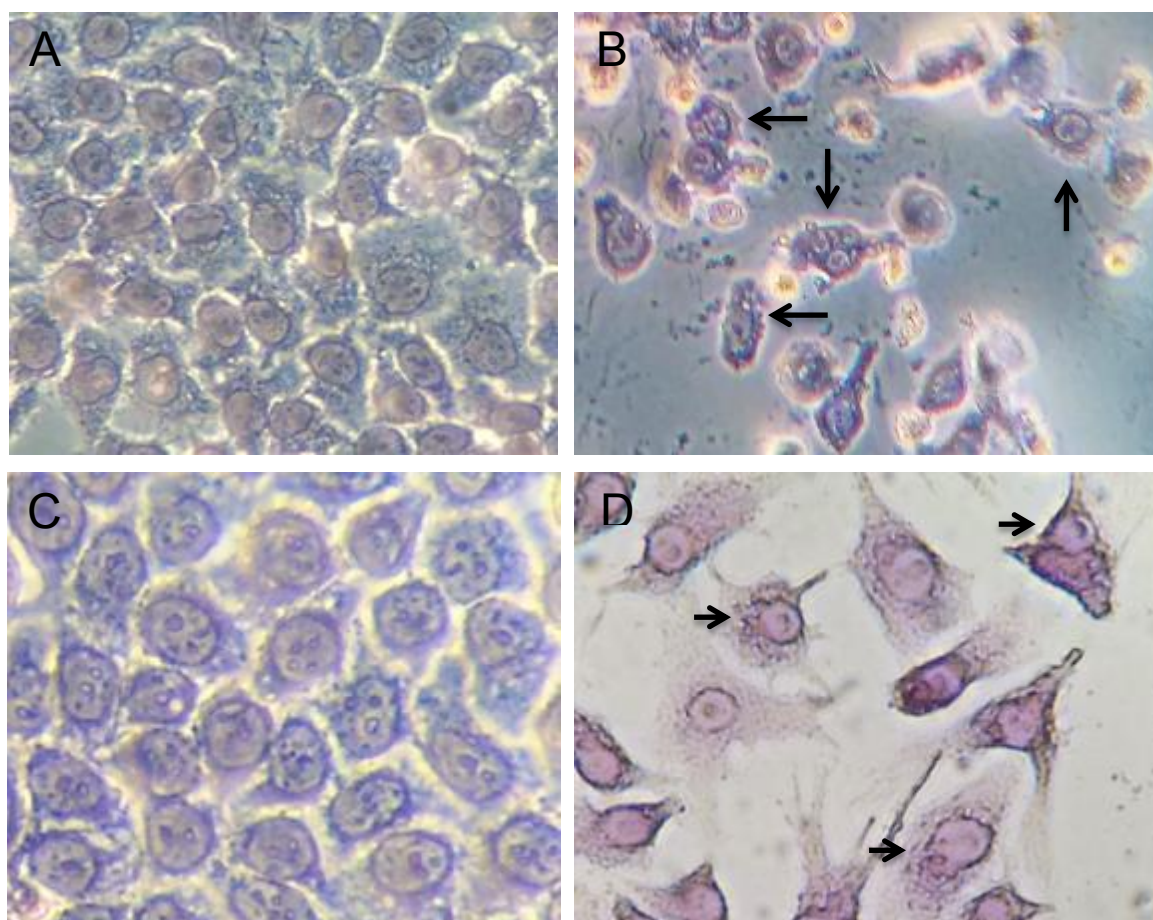


Figura 6. Análisis morfológico de células HeLa y B16F10 con el híbrido 3c por 48 horas de tratamiento. A) Control HeLa, B) Efecto del híbrido 3c sobre células HeLa (38,0 μ M), C) Control B16F10, D) Efecto del híbrido 3c sobre las células B16F10 (23,6 μ M).

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Por su parte, en la figura 7 se muestra el efecto del compuesto 3j sobre las líneas tumorales HepG2 y A549. En las dos líneas tumorales el híbrido 3j genera pérdida de contacto con las células adyacentes. Igualmente, en la línea tumoral HepG2 es posible observar la presencia de pseudo-vacuolas, mientras que en las células tumorales A549 se evidencia pérdida de volumen celular, cambios de la morfología característica de las células y la presencia de núcleos picnóticos.

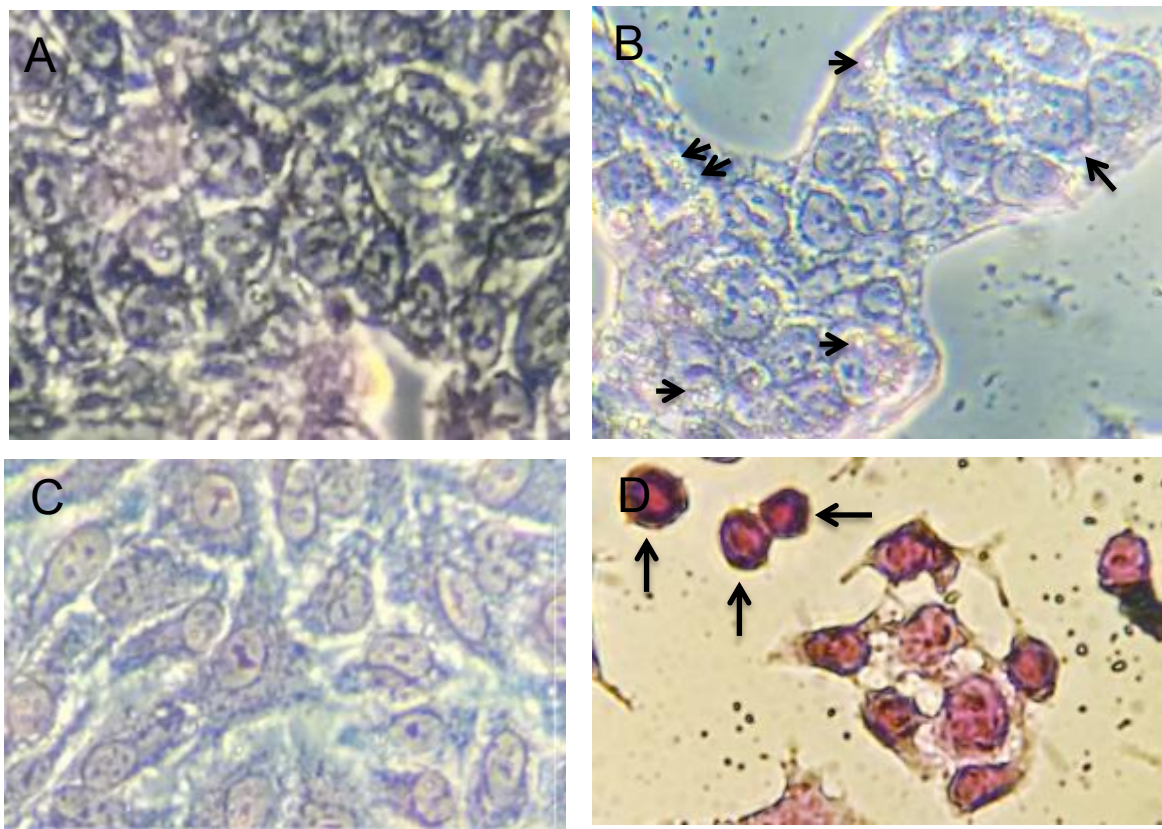


Figura 7. Análisis morfológico de células HepG2 y A549 con el híbrido 3j por 48 horas de tratamiento. A) Control HepG2 48 h, B) Efecto del híbrido 3j sobre células HepG2 (5,1 μ M), C) Control A549, D) Efecto del híbrido 3j sobre las células A549 (16,9 μ M).

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

En este sentido, se ha establecido que la presencia de vacuolas se favorece durante la apoptosis, aunque en diversos cultivos celulares se ha observado, su mecanismo molecular no es claro (Häcker, 2000). Igualmente, una alteración temprana es la condensación de la cromatina nuclear en paquetes a lo largo de la membrana del núcleo, una serie de eventos bioquímicos desencadenados por la acción de las caspasas 3 y 6 sobre las proteínas nucleares DFF45 (Factor de fragmentación del ADN), laminas y el factor de unión de andamiaje nuclear, entre otras; dirige la formación del núcleo picnótico que posteriormente será fragmentado, separado y empacado en los cuerpos apoptóticos (Taylor, 2000; Hengartner, 2000; Swanson, 2014).

Los compuestos híbridos 3c y 3j generan diversos cambios morfológicos, sobre las líneas tumorales HeLa, B16F10, A549 y HepG2, que han sido relacionados con diferentes etapas del proceso de muerte celular programada. Aunque estas observaciones sugieren la presencia de un mecanismo de muerte regulada, es necesario realizar diversas pruebas confirmatorias que permitan confirmar el mecanismo de muerte responsable del efecto citotóxico mostrados por los compuestos híbridos de THQ-isoxazoles.

2.4 Conclusiones

- Los compuestos híbridos de THQ-isoxazoles 3(a-m) y 3p presentan CC_{50} menores de 100 μ M en por lo menos una de las líneas tumorales analizadas: carcinoma cervical humano (HeLa), hepatoma humano (HepG2), carcinoma pulmonar humano (A549) y melanoma murino (B16F10).
- El efecto de los compuestos híbridos 3c, 3f, 3l, 3i, 3b, 3e, 3k y 3h sobre las líneas tumorales A549 y HepG2 presenta una relación entre el aumento del tamaño del sustituyente en la posición 6 de la THQ, y la disminución de la actividad citotóxica.

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

- El compuesto híbrido 3c presenta el mejor efecto citotóxico en las líneas tumorales HeLa y B16F10, con respecto a los demás compuestos híbridos evaluados; y el compuesto híbrido 3j presenta el mejor efecto citotóxico en las líneas tumorales HepG2 y A549; con respecto a los demás compuestos híbridos evaluados y el oxaliplatino tomado como medicamento control.
- El análisis morfológico realizado a los compuestos híbridos 3c y 3j sobre las líneas tumorales HeLa, B16F10 y HepG2, A549, respectivamente; sugiere cambios morfológicos relacionados con diversas etapas de un proceso de muerte celular regulada; sin embargo, es necesario obtener más evidencia que permita establecer un mecanismo de muerte específica.

2. Análisis del mecanismo de inducción de muerte celular de los compuestos más citotóxicos



3.1 Introducción

La eliminación de células no deseadas o dañadas a través de la muerte celular programada (MCP) es esencial para procesos biológicos fundamentales como el desarrollo animal, homeostasis tisular y respuesta al estrés. La falta de regulación en los procesos de muerte celular contribuye al desarrollo de una serie de enfermedades humanas que incluyen el cáncer y la inflamación. Durante la transformación oncogénica, las células neoplásicas resistentes a la muerte celular sobreviven y adquieren mutaciones, lo cual convierte a la inducción de muerte celular en uno de los mecanismos anti cáncer desencadenados por una variedad de fármacos quimioterapéuticos, y constituye una estrategia atractiva para desarrollar nuevas terapias contra el cáncer (Chen *et al.*, 2016).

Aunque se han descrito varias clasificaciones, la apoptosis, autofagia y necrosis programada son las tres formas principales de MCP, que se distinguen fácilmente por sus diferencias

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

morfológicas. La *apoptosis* se caracteriza por encogimiento celular, condensación y fragmentación nuclear, crestas en la membrana y pérdida de contacto con las células vecinas (Tanaka, 2013; Fernald & kurokawa, 2013; Bai & Wang, 2014; Hassan *et al.*, 2014). Mientras que la *autofagia*, es un proceso catabólico que comienza con la formación de autofagosomas, estructuras dobles ligadas a la membrana que circundan macromoléculas citoplasmáticas y orgánulos, destinados al reciclaje. En general, la autofagia asegura la supervivencia celular durante períodos de inanición, estrés o privación de factores de crecimiento. Sin embargo, las células autofágicas pueden suicidarse al hacer frente al estrés, por mecanismos que difieren de la apoptosis y necrosis programada.

Finalmente, la *necrosis programada* (necroptosis) genera hinchazón celular, disfunción orgánica y lisis celular. Así, la importancia de los procesos de MCP en la preservación de la homeostasis del tejido y la eliminación de las células dañadas, tiene profundos efectos sobre el desarrollo y eliminación de los tejidos malignos (Ouyang *et al.*, 2012).

3.1.1 Apoptosis

La inducción de apoptosis puede ser iniciada por diferentes puntos, a través de los receptores de muerte ubicados en la membrana plasmática o por vía mitocondrial (Figura 8). La estimulación de los receptores de muerte del factor de necrosis tumoral (TNF) CD95 o receptores de ligando que inducen apoptosis (TRAIL) desencadenan la activación del iniciador caspasa 8, el cual puede propagar la señal de muerte por clivaje directo de efectores internos como la caspasa 3 (Fulda & Debatin, 2006).

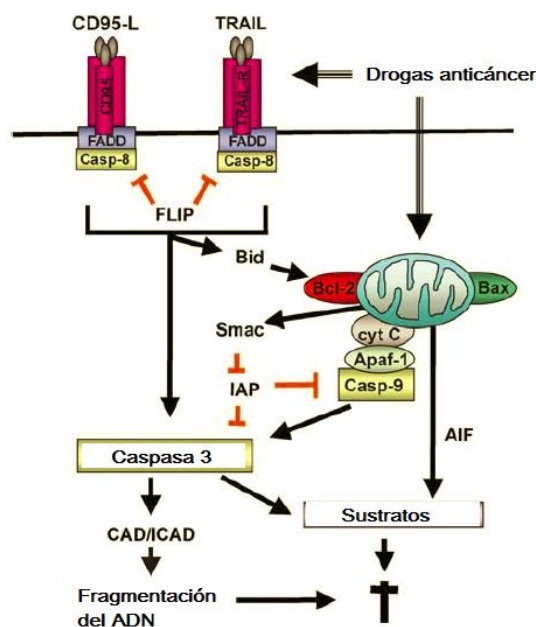


Figura 8. Vías de inducción de apoptosis. La apoptosis puede inducirse por diferentes vías, mediante los receptores de muerte ubicados en la membrana plasmática o por vía mitocondrial. La estimulación de la superfamilia de los receptores de muerte CD95 o TRAIL genera la agregación del receptor y la unión del dominio de muerte asociado a Fas y la caspasa 8. Así la caspasa 8 inicia la apoptosis mediante el clivaje de caspasas efectoras. La vía mitocondrial inicia a través de la liberación de factores apoptogénicos como citocromo c, factor de inducción de apoptosis (AIF) o Smac/DIABLO. La liberación del citocromo c en el citoplasma permite la formación del apoptosoma y el Smac/DIABLO promueve la activación de caspasas y neutraliza las IAP (proteínas inhibitorias de apoptosis). Las diferentes vías de inducción de apoptosis se conectan por diferentes niveles, por ejemplo por la proteína Bid, un miembro de la familia Bcl-2. [Tomado de Fulda S y Debatin K. *Oncogene*. 2006; 25: 4798-4811].

Las vías de apoptosis mitocondrial están regulados principalmente por los miembros de la familia Bcl-2, que incluyen las proteínas pro-apoptóticas (BAX, BAK, BAD, BID, Bim, NOXA, PUMA) y antiapoptóticas (Bcl-2, A1, Bcl-xL, MCL-1, Bcl-w). La proteína P53 participa en la respuesta al daño del ADN (causada por radiación UV) mediante la inducción de la expresión de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2. Este evento conduce a la permeabilización de la membrana mitocondrial y liberación del citocromo c. El citocromo c, una vez en el citoplasma

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

se une a Apaf-1 activando la cascada de caspasas y finalmente causando apoptosis. Aunque la falta de regulación de la vía intrínseca de apoptosis es la principal causa de resistencia a la quimioterapia; la vía extrínseca también se ha relacionado con quimio-resistencia, al asociar fallas en esta vía con la progresión de algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, la progresión del melanoma con la disminución en los receptores de muerte TRAIL-R1 y R2, que resulta afectando la muerte celular mediada por TRAIL (Maira *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2014)

3.1.2 Autofagia

Se ha descrito como una estrategia evolutivamente conservada para degradar las proteínas citosólicas de vida larga y organelos, con el fin de proporcionar energía y reciclar nutrientes. La autofagia es típicamente un mecanismo de adaptación al estrés en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo hambre, hipoxia y estrés oxidativo que desencadenan una vía de supervivencia evitando la muerte celular (Li *et al.*, 2016). En la terapia para el cáncer la autofagia se activa como una respuesta adaptativa para promover la supervivencia celular. Sin embargo, el estrés sobre un cierto umbral conduce a una acumulación masiva de vesículas autofagosómicas, que pueden promover formas no apoptóticas de muerte celular. La respuesta autofágica ha sido inicialmente caracterizada en células resistentes a la apoptosis sugiriendo que la autofagia es una salvaguardia alternativa a la muerte celular. Sin embargo, el papel de la autofagia como un mecanismo alternativo sigue siendo un tema controversial y no hay pruebas estrictas de que la autofagia sea un mecanismo directo de muerte celular. Algunos estudios han sugerido que la autofagia puede ser una adaptación a la inanición que genera como resultado apoptosis o necroptosis (Dentron *et al.*, 2015; Chaabane *et al.*, 2013).

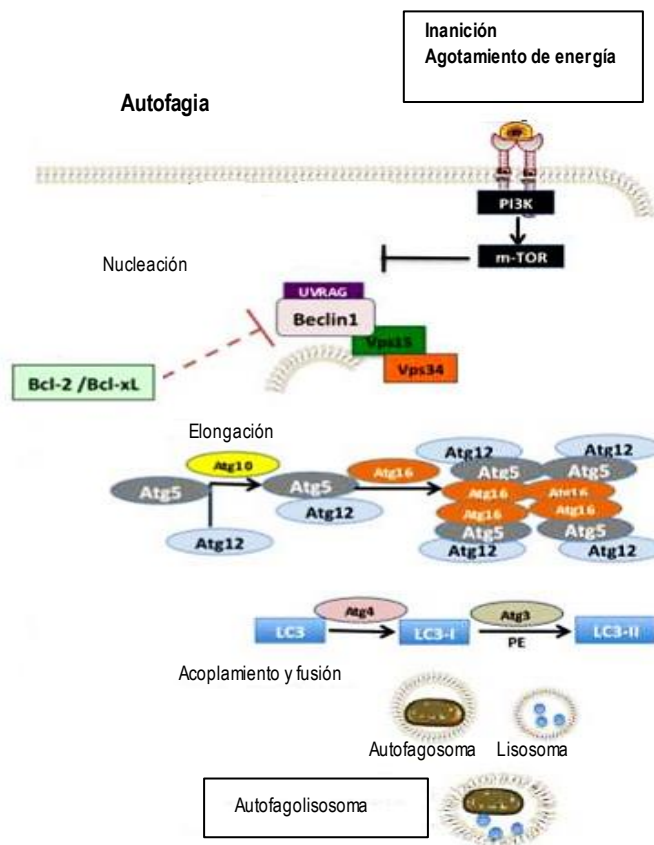


Figura 9. Macroautofagia. La autofagia comienza con la nucleación de una membrana de aislamiento que secuestra material celular en una vesícula de doble membrana (autofagosoma), para degradación por la hidrolasa lisosomal después de su fusión con un lisosoma (Autofagolisosoma). Reciclando así macromoléculas esenciales durante períodos de nutrientes limitados y para la supervivencia celular en general. El proceso de formación del núcleo de autofagia es regulado por proteínas relacionadas (Atgs) y miembros anti-apoptóticos Bcl-2 (Bcl-2 / Bcl-xL) que pueden inhibir la autofagia mediante la unión de Beclin-1, un componente esencial del complejo clase III PI3K / Vps34 requerido para la inducción de autofagia. Tomado de Radogna y col., 2015.

Existen tres tipos de autofagia que culminan en la degradación mediada por lisosomas: (1) macroautofagia (denominada en lo sucesivo autofagia) es la más estudiada y está caracterizada por la formación de autofagosomas (Figura 9); (2) la microautofagia, donde el material citosólico es absorbido directamente por el lisosoma; y (3) autofagia mediada por chaperonas (Chaabane y col., 2013). La macroautofagia se caracteriza por la formación del autofagosoma, una vacuola

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

autofágica de membrana doble, que secuestra proteínas citoplasmáticas, mitocondrias, retículo endoplásmico y ribosomas para la degradación por hidrolasas lisosómicas después de la fusión con el lisosoma. La formación de autofagosomas implica diferentes etapas: aislamiento de membranas, elongación (caracterizada por la participación de diferentes subconjuntos de genes relacionados con la autofagia (Atg) y proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (Bcl-2 / Bcl-xL)) y fusión con lisosomas (figura 9) (Parzych y Klionsky, 2014). El sensor metabólico (mTOR) es un regulador crítico de la autofagia, un inhibidor del paso de inicio del montaje de autofagosoma. Bajo condiciones nutritivas positivas, MTOR fosforila Atg13 evitando su interacción con un complejo que contiene Atg1 quinasas y Atg17. Durante la inanición, mTOR se inhibe y la unión de Atg13 desfosforilada a Atg1 desencadena el aislamiento de membranas. La nucleación de la vesícula está regulada por un complejo de Beclin-1, UVRAG (gen supresor de tumores asociado a la resistencia a la radiación UV) y una quinasa miristilada (Vps15, o p150 en Humanos) que se requiere para la activación de Vps34, una clase de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) para generar PI3-fosfato. La elongación de la vesícula es un proceso que implica dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. Primero la conjugación covalente de Atg12 a Atg5 se produce a través de la enzima tipo E1 Atg7 y la enzima tipo E2 Atg10. Entonces la interacción de la proteasa Atg4, la enzima Atg7 y la enzima Atg3 con LC3 (el homólogo de mamífero de Atg8) induce la conjugación lipídica de la fosfatidiletanolamina (PE) que conduce a la conversión de la forma soluble de LC3 (denominada LC3-I) molécula asociada de la vesícula autofágica (LC3-II). El último paso de acoplamiento y fusión del autofagosoma y lisosoma conduce a la formación del autofagolisosoma donde los organelos intracelulares se degradan por catepsinas lisosómicas (Radogna *et al.*, 2015).

3.1.3 Necroptosis

Otro tipo de muerte celular regulada que ha ganado interés en los últimos años es la necroptosis. Esta modalidad de muerte celular mantiene algunas características apoptóticas, pero también posee morfología necrótica (figura 10). Al igual que la necrosis, la necroptosis se caracteriza por pérdida de la integridad de la membrana plasmática, citosol traslúcido, hinchamiento mitocondrial y lisis celular (Chen *et al.*, 2016).

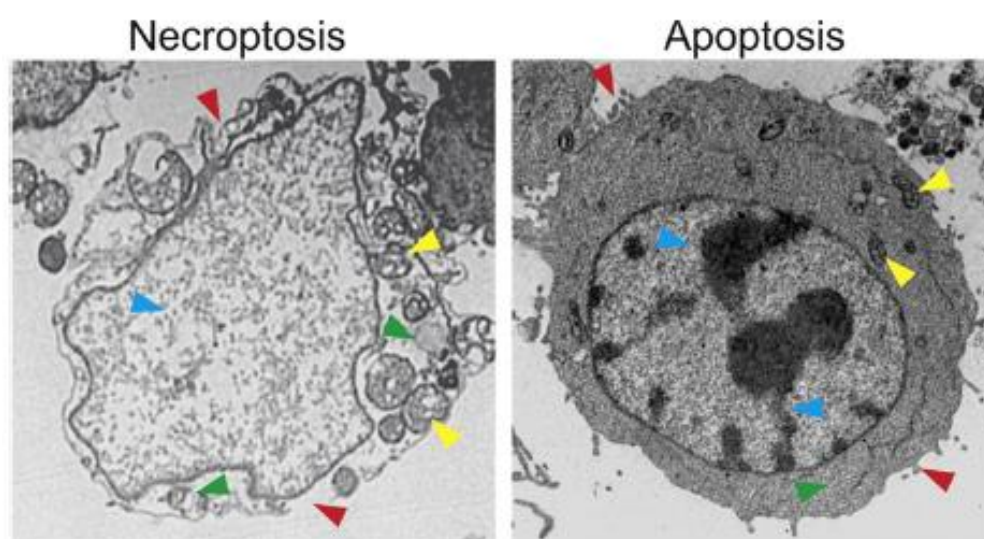


Figura 10. Características morfológicas de necroptosis y apoptosis en células cancerígenas. Las células fueron tratadas con una droga antitumoral por 48 horas y fueron analizadas con microscopía electrónica de transmisión. La célula bajo necroptosis muestra ruptura de la membrana plasmática y permeabilización, en contraste con la membrana intacta con crestas de la célula en apoptosis (flechas rojas). La célula necroptótica presenta citoplasma inflamado y pseudo-vacuolas, características ausentes en la célula apoptótica (flechas verdes). La célula necroptótica tiene mitocondria hinchada, en contraste con aquellas presentes en las células apoptóticas (flechas amarillas). La célula necroptótica también carece de núcleo condensado y fragmentado presente en la célula apoptótica (flecha azul). Tomada de Chen y col., 2016).

Al igual que la apoptosis, la necroptosis implica la formación de complejos multi-proteína que dan lugar a la desaparición celular. Los receptores de muerte que suelen desencadenar apoptosis también se asocian a necroptosis, en particular cuando se inhibe la activación de caspasas. La

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

unión de un ligando a su respectivo receptor de muerte puede dar como resultado señalización pro- y anti-apoptótica (por ejemplo, activación de NF- κ B). La señalización pro-apoptótica se caracteriza por la formación de un complejo inductor de muerte (DISC), la activación de la caspasa-8 y las caspasas efectoras 3 y 7. De esta manera la caspasa-8 activa suprime la necroptosis mediante el clivaje de las quinasas RIPK1 y RIPK3. Mientras que, la inhibición de la caspasa 8 inicia la necroptosis por formación del necrosoma, un complejo que contiene las proteínas FADD, procaspase-8, RIPK1 y RIPK3 (Figura 10). Se ha demostrado que RIPK3 es indispensable para la formación necrosómica y es la encargada de fosforilar la proteína tipo quinasa de linaje mixto (MLKL) en treonina 357 y serina 358 (Philipp *et al.*, 2016). Se han propuesto varios mecanismos diferentes para explicar cómo el MLKL oligomerizado provoca la muerte celular. El complejo formado por RIP1, RIP3 y el MLKL puede promover la activación del factor de fisión mitocondrial, relacionado con la dinámica proteína 1 (Drp1), y activa su actividad de GTPasa para la fisión mitocondrial y la muerte celular. También se ha sugerido que la MLK oligomerizada puede promover la afluencia de calcio a través de la proteína TRPM7 del canal de calcio o afluencia de sodio, para promover la muerte celular (Chen *et al.*, 2016). Se ha demostrado que el fenómeno de la necroptosis se produce sólo cuando se presenta Inhibición farmacológica o ablación genética de la vía apoptótica, lo que sugiere que la necroptosis es inducida como una alternativa para asegurar la muerte celular cuando la apoptosis falla (Vandenabeele *et al.*, 2010; Radogna *et al.*, 2015).

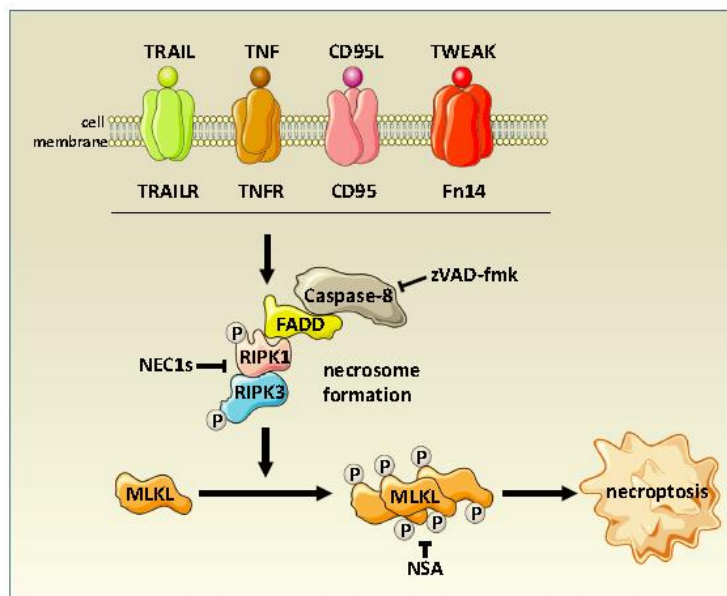
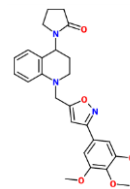


Figura 11. La vía molecular de la necroptosis desencadenada por la familia de receptores de muerte. Tras la inhibición de caspasa-8, la necroptosis se inicia por la formación del necrosoma y subsiguiente fosforilación de la quinasa MLKL. La necroptosis puede ser inhibida por fármacos como necrostatina 1 (NEC1s) y necrosulfonamida (NSA). Tomado de Philipp y col., 2016.

La importancia de los mecanismos de MCP en la homeóstasis celular y la eliminación de las células defectuosas, demuestra su pertinencia en el desarrollo de fármacos antitumorales que eliminen o limiten la supervivencia de los tejidos malignos. Este sentido, en el presente estudio fueron escogidos tres compuestos híbridos de THQ-isoxazoles que presentaron los mejores efectos citotóxicos en tres líneas celulares específicas, y fue determinado el mecanismo de muerte que desencadena su efecto citotóxico.

3.2 compuesto híbrido 3c en células de carcinoma cervical humano (HeLa)



3.2.1 materiales y métodos

3.2.1.1 Determinación de la viabilidad por el método de reducción de MTT

El efecto del compuesto híbrido de THQ-isoxazoles 3c sobre la viabilidad de las células HeLa se realizó mediante la reducción de la sal de tetrazolio MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA). Se depositaron 1×10^4 células/pozo (HeLa) en una placa de 96 pozos y fueron mantenidas durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación, las células fueron tratadas con diversas concentraciones del compuesto híbrido (5, 25, 50 y 100 μ M) por 12, 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por 200 μ L de MTT (0,5 mg/mL) se mantuvo en incubación por 3 horas a 37°C. Finalmente los cristales de formazan formados, fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y se midió la absorbancia a 580 nm (Mosmann, 1983).

3.2.1.2 Determinación de la proliferación por el método con cristal violeta.

El efecto del compuesto híbrido 3c sobre la proliferación celular se determinó mediante el método de cristal violeta. Las células HeLa fueron depositadas (5×10^3 células/pozo) en una placa de 96 por 24 horas a 37°C. Luego de la incubación, las células fueron tratadas con el compuesto híbrido 3c en las concentraciones de 5 y 25 μ M durante 48 horas. A continuación, las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS tampón compuesto por NaCl (680,0 mM, KCl 13,40 mM, y Na₂HPO₄ 40,50 mM), fijadas con metanol durante 10 minutos y posteriormente incubadas con 50 μ L de solución de cristal violeta (0,02% p/v disuelto en etanol al 2% v/v) durante 5 minutos. A continuación, las células fueron lavadas 10 veces con PBS y enseguida se

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

solubilizó el contenido de cada pozo con 200 μ L de citrato de sodio (0,05 M). La lectura de la absorbancia fue realizada a 550 nm (Kueng *et al.*, 1989).

3.2.1.3 Liberación de Citocromo C.

Se incubaron 1×10^6 células HeLa en una caja de Petri de 6 cm de diámetro durante 24 horas y enseguida se trataron con el compuesto 3c en la concentración de 25 μ M durante 12 horas. Posteriormente, las células tripsinizadas se centrifugaron y se lavaron con PBS, manteniendo un volumen de 1mL. Una alícuota de 30 μ L del precipitado disuelto fue separada para la cuantificación de la proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976). La solución restante del precipitado obtenido, fue centrifugada a 4500 xg durante 15 minutos. Posteriormente el precipitado fue resuspendido en 1mL de solución TRIS en HCl 85,6 mM a un pH de 7,2, EDTA 7,89 mM y sacarosa 0,146 mM junto con digitonina 10 μ M y fue llevado a incubación por 30 min a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, la suspensión celular fue centrifugada a 10000 x g durante 30 minutos, el sobrenadante fue filtrado con la ayuda de una membrana de poliestireno con diámetro de poro de 200 nm y se determinó su absorbancia a 414 nm. Finalmente se calculó la concentración de citocromo c liberado. (Appaix *et al.*, 2000)

3.2.1.3 Análisis de daño del ADN

Las células HeLa (5×10^5) fueron depositadas en cajas de Petri de 6 cm de diámetro durante 12 horas para total adherencia, a continuación las placas fueron tratadas con el compuesto 3c en la concentración de 25 μ M durante 24 y 48 horas. Posterior al tratamiento, las células fueron lavadas con PBS, soltadas con raspador y el ADN fue extraído mediante el kit de detección de la escalera de ADN ApoTarget de Invitrogen Corporation (Camarillo, CA, USA), de acuerdo a instrucciones de manufactura. Finalmente, las muestras de ADN fueron separadas

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% a 300 mA, 12 V/cm por 40 minutos a 25°C. Se usó tratamiento con camptotecina por 5 horas a 37°C como control positivo.

3.2.1.4 Análisis morfológico.

Células HeLa (1×10^5 células/pozo) fueron sembradas en placas de 12 pozos e incubadas con atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C por 24 h. Después de la adhesión, las células fueron tratadas con la IC₅₀ del híbrido 3c durante 48 h. Posterior al tiempo de tratamiento, las células fueron fijadas con etanol por 5 minutos a temperatura ambiente y teñidas con hematoxilina y eosina. Los cambios morfológicos fueron examinados con un microscopio invertido Prisma Vert Zeiss.

3.2.1.5 Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico ANOVA, de cada conjunto de datos, seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey, que consiste en comparar las desviaciones obtenidas desde el ANOVA, para así determinar que medias tienen diferencias significativas con relación al promedio y la desviación estándar. Para este análisis, se empleó el programa STATISTICA 8.0.550 con valores de $p < 0,05$.

3.2.2 Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el presente estudio, sin realizar comparaciones con los datos disponibles en la literatura.

3.2.2.1 El compuesto híbrido 3c afecta la viabilidad de células HeLa.

La prueba de MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del colorante de tetrazolio ((Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (MTT)) por parte de las

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas, produciendo cristales de formazan que pueden ser solubilizados con DMSO y detectados a 580 nm. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido (Reilly *et al.*, 1998).

El compuesto híbrido 3c fue evaluado mediante el método de MTT por 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento, usando las concentraciones de 5, 25, 50 y 100 μM . La viabilidad celular se presenta como porcentaje en relación al control (Figura 12). Los resultados obtenidos muestran que el compuesto 3c presenta un efecto dependiente de la dosis y del tiempo. En un periodo de 12 h, la concentración 50 μM generó reducción de $\sim 20\%$ en la viabilidad celular, y al doblar el tiempo de tratamiento, provoca la misma reducción con 25 μM . Asimismo, una concentración baja (25 μM), después de 48 y 72 h, fue capaz de disminuir la viabilidad celular en ~ 38 y 45% , respectivamente; y una concentración alta (100 μM) después de 48 h de tratamiento generó $\sim 80\%$ de reducción en la viabilidad de las células HeLa.

Por su parte, la tabla 2 muestra las concentraciones citotóxicas 50 (CC_{50}) del compuesto 3c en los diferentes tiempos evaluados. Los resultados obtenidos confirman la dependencia del efecto con respecto al tiempo de tratamiento. Aunque la CC_{50} a 12 h es evidentemente alta, es posible observar la disminución gradual en esta concentración de $\sim 41\%$ en cada tiempo evaluado, y mayores reducciones de ésta en 24 y 72 h de tratamiento.

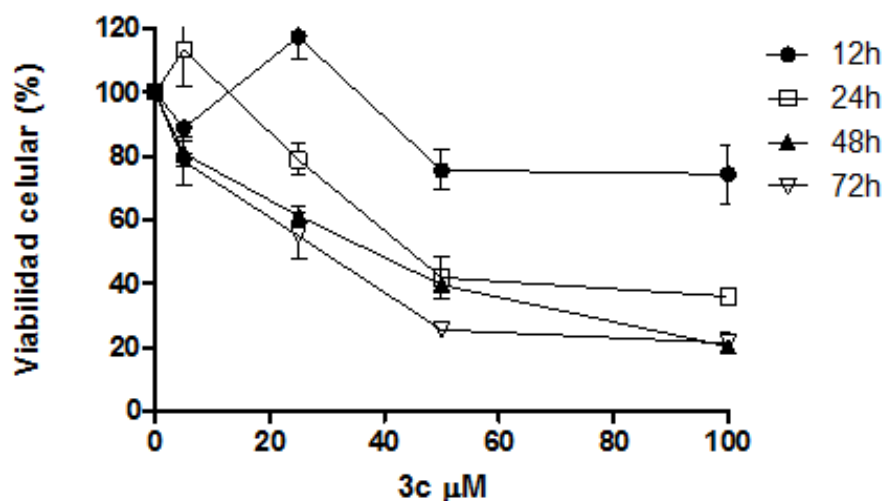


Figura 12. Efecto del compuesto 3c sobre la viabilidad de células HeLa a 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de las células viables con respecto al control (los datos representan mínimo dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas en 24 h de tratamiento (50 y 100 μ M); y en 48 y 72 horas de tratamiento. (25, 50 y 100 μ M).

Tabla 2. Efecto del compuesto 3c sobre la viabilidad de células

Tiempo de tratamiento (horas)	CC ₅₀ μ M
12	>100
24	51, 1 $\pm$ 4,9
48	38,0 $\pm$ 10,8
72	19,7 $\pm$ 2,7

También, se determinó el efecto del compuesto sobre la viabilidad celular usando cristal violeta, un compuesto que atraviesa la membrana de las células viables. Las células plaqueadas fueron tratadas con soluciones 5 y 25 μ M del compuesto 3c por 48 horas. El efecto sobre la viabilidad celular se observa en la figura 13, donde puede observarse que este compuesto genera

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

una disminución en el número de células con respecto al control para las concentraciones de 5 y 25 μM , del 39,1 y 69,5% respectivamente.

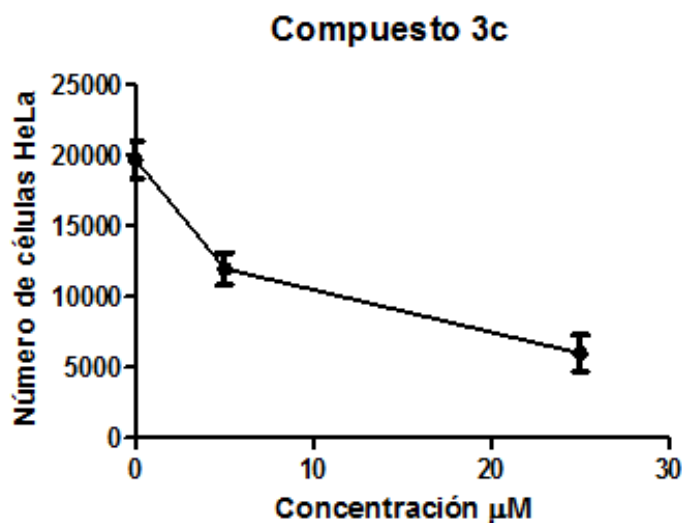


Figura 13. Efecto del compuesto híbrido 3c sobre la viabilidad de la línea celular HeLa. Las células fueron tratadas con el híbrido 3c durante 48 horas con las concentraciones de 5 y 25 μM . Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas para las dos concentraciones evaluadas.

3.2.2.2 El compuesto híbrido 3c altera la morfología celular, induciendo apoptosis en las células HeLa.

Con el objetivo de relacionar el efecto citotóxico y la inducción de apoptosis o necrosis, se realizó un análisis morfológico usando la tinción de hematoxilina y eosina del compuesto 3c sobre la línea tumoral HeLa, tomando la concentración del IC_{50} por 48 horas de tratamiento. La figura 14 muestra las células HeLa sin tratamiento que presentan una morfología típica adherente con formación de monocapa; mientras que en las células tratadas con el híbrido 3c se puede observar pérdida de contacto con las células adyacentes, reducción del volumen celular,

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

presencia de pseudo-vacuolas, aparición de surcos en la membrana plasmática que sugieren su desestabilización y la formación de cuerpos apoptóticos.

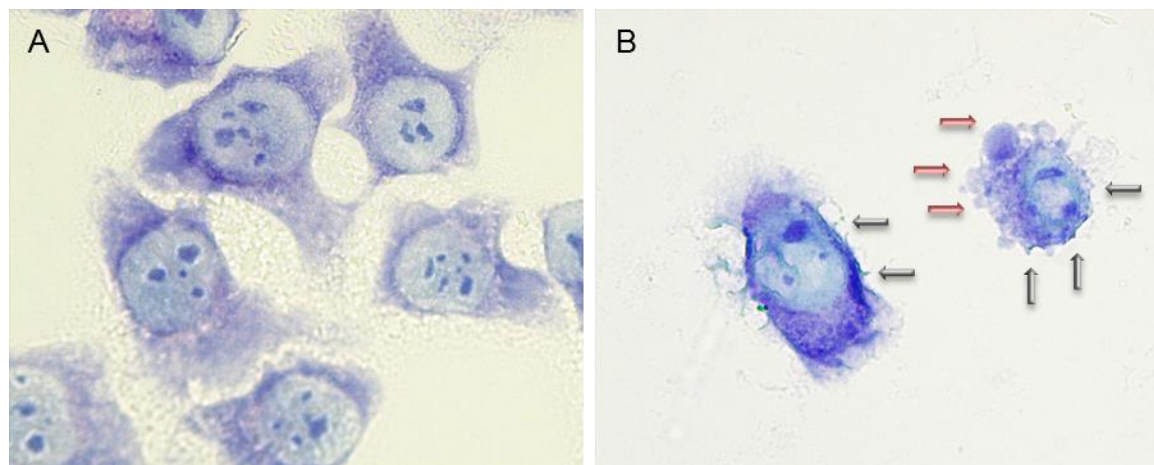


Figura 14. Efecto del compuesto 3c sobre la morfología de las células tumorales HeLa. Las células fueron incubadas durante 48 horas con la CC_{50} y teñidas con hematoxilina y eosina. Las imágenes se adquirieron con un microscopio invertido Prisma Vert Zeiss con objetivo de 40x. Células sin tratamiento (a). Tratamiento con 3c a $34,5 \mu\text{M}$.

3.2.2.3 El compuesto híbrido 3c induce la liberación de citocromo c y la fragmentación de ADN en células HeLa.

Con el fin de entender mejor el mecanismo de muerte celular inducido por el híbrido 3c, se estableció un periodo de tratamiento y una concentración (12 h, $25 \mu\text{M}$) que no generara efecto citotóxico significativo sobre las células (Figura 12); y se evaluó la liberación de citocromo c, tal como se describió en la sección de materiales y métodos. La figura 15 evidenció un incremento de aproximadamente 380% con relación al control, de la concentración de citocromo c liberado al citoplasma, después del tratamiento con el compuesto 3c.

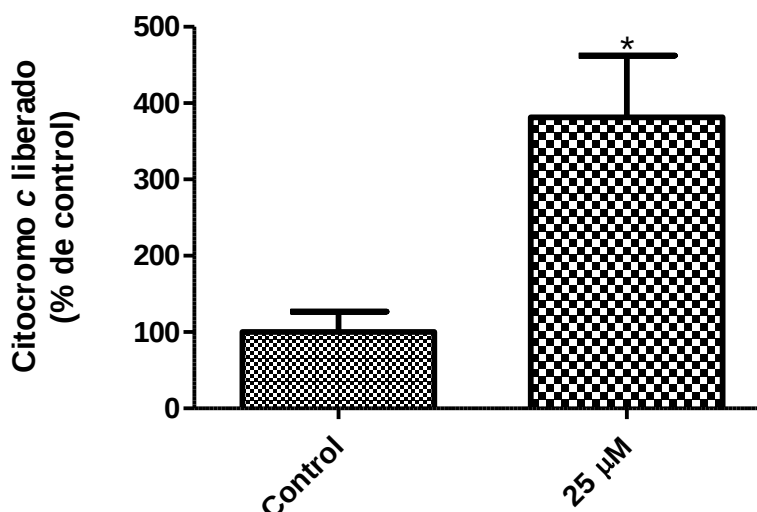


Figura 15. Efecto del híbrido 3c sobre la liberación de citocromo c. Los datos se muestran como el porcentaje con respecto al control (100%) de tres experimentos independientes. El control (100%) corresponde a $0,52 \text{ nmol de citocromo c liberado min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína total. * $p < 0,05$.

Además, se realizó la extracción de ADN de células HeLa tratadas con el híbrido 3c en la concentración de 25 µM , en diferentes periodos de tratamiento (24 y 48 h) que permitieran obtener la mayor cantidad de células en proceso de MCP. La figura 16 muestra el patrón de separación del ADN extraído, el carril 1 muestra sólo una banda que corresponde al ADN de las células HeLa sin tratamiento, los carriles 2 y 3, corresponden al tratamiento realizado durante 24 y 48 horas respectivamente, presentan el patrón de ruptura de ADN en fragmentos múltiples de 300pb, formando la denominada escalera de ADN. Estos datos sugieren que el compuesto híbrido 3c induce apoptosis en las células HeLa, mediante la vía mitocondrial intrínseca.

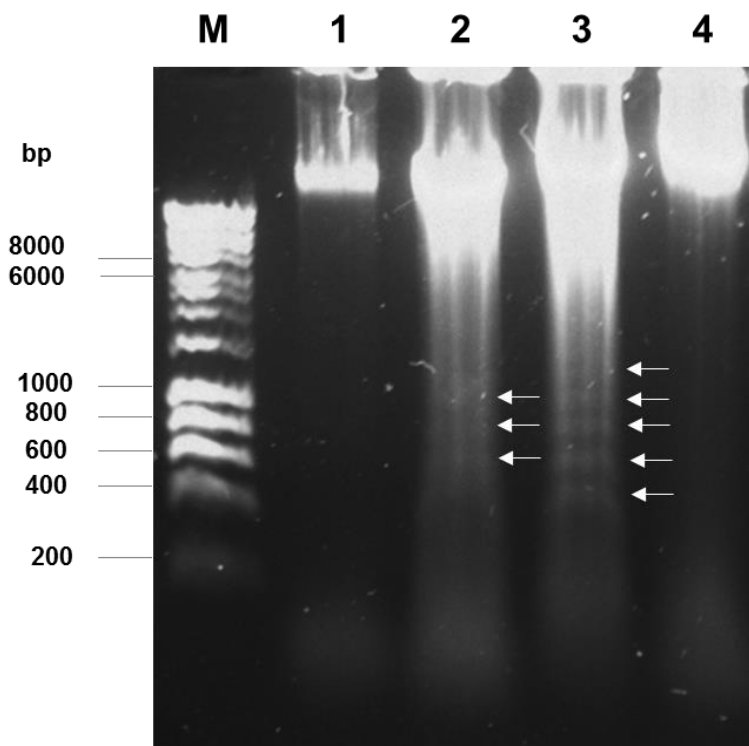


Figura 16. Efecto del compuesto 3c sobre la fragmentación de ADN. Las células HeLa fueron tratadas con el compuesto 3c (25 μ M) durante 24 y 48 horas de tratamiento. M) marcados de peso molecular. 1 ADN extraído de las células sin tratamiento. 2 células tratadas con 3c durante 24 horas. 3 células tratadas con 3c durante 48 horas. 4 camptotecina 10 μ M durante 5 horas de tratamiento.

3.2.3 Discusión

Los compuestos híbridos constituyen una alternativa en el desarrollo de fármacos que permite obtener mayores efectos benéficos (Dasari *et al.*, 2015; Marchetti *et al.*, 2016). En este sentido, los derivados de las THQ e isoxazoles han reportado un amplio rango de propiedades biológicas, que incluyen: antiinflamatorios, anti-aritmicos, supresores inmunológicos, antivirales, antituberculosis, antioxidantes (Hou *et al.*, 2013; Rudenko *et al.*, 2014), antifúngicas, antibacteriales, anticonvulsivas, antidepresivas y antitumorales (Chauhan *et al.*, 2012; Palanisamy *et al.*, 2013). A continuación se discuten los resultados obtenidos en el análisis de la

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

actividad citotóxica del compuesto híbrido 3c en células HeLa y el estudio del mecanismo de muerte que desencadena el efecto citotóxico.

El análisis de MTT mostró que el compuesto híbrido 3c presenta efecto citotóxico sobre la línea tumoral HeLa y se estableció la CC_{50} de $19,7 \pm 2,7 \mu\text{M}$ para 72 h de tratamiento. Además, en un periodo de 48 horas el híbrido 3c, a baja concentración ($5 \mu\text{M}$), fue capaz de disminuir la proliferación celular en 40%. Estos resultados son consistentes con aquellos reportados por otros autores, donde manifiestan el efecto de derivados de THQ y/o isoxazoles sobre la viabilidad y proliferación en células HeLa (Liu *et al.*, 2006; Kouznetsov *et al.*, 2010; Palanisamy *et al.*, 2013). Esto sugiere la potencial importancia de este compuesto al inducir mecanismos de muerte celular y controlar el crecimiento y expansión del cáncer, manteniendo la enfermedad en el mismo estadio.

Con el objetivo de conocer el mecanismo de muerte, se usaron diferentes métodos basados en características morfológicas y bioquímicas, que permitieran explicar el efecto citotóxico presentado por este híbrido. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con el compuesto, generó evidente liberación del citocromo *c*, lo cual sugiere que este compuesto híbrido podría activar el proceso apoptótico por vía intrínseca. Teniendo en cuenta que el proceso apoptótico por vía intrínseca presenta el rol decisivo de la mitocondria mediante el efecto de los factores pro-apoptóticos como Bax o Bid, que permiten la liberación del citocromo *c* al citoplasma, la unión a Apaf-1 y la activación de la caspasa 9 que entonces propaga la cascada proteolítica mediante la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7. Igualmente, el análisis morfológico mostró características de MCP por apoptosis, relacionadas con contracción celular, pérdida de contacto con la matriz y formación de surcos en la membrana (Figura 14B). En este sentido, está reportado que estas características morfológicas son el resultado de la

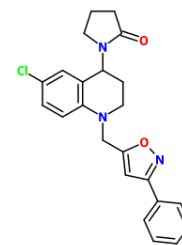
NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

acción de las caspasas que clivan muchos de los constituyentes del citoesqueleto, permitiendo la separación celular y la formación de surcos en la membrana, como consecuencia de la contracción de la actina cortical que empuja el citosol contra otras áreas de la corteza celular y genera las ampollas en el citoesqueleto debilitado (Elmore, 2007; Häcker, 2000; Hengartner, 2000).

Igualmente, en nuestros resultados se observó que el tratamiento con el compuesto 3c 25 μ M por 48 h, generó el patrón de ruptura de ADN en fragmentos múltiples de 300pb, formando la denominada escalera de ADN (Figura 16). Esta constituye una característica típica del mecanismo de muerte por vía apoptótica y se considera que la presencia de este patrón de ruptura de ADN es un evento clave en el desarrollo de la apoptosis y constituye un fuerte indicativo de la presencia de este proceso (Elmore, 2007). Finalmente, en el análisis morfológico realizado fue posible observar la presencia de cuerpos apoptóticos (Figura 14), que de acuerdo a las fases reportadas para el proceso de MCP por apoptosis, constituyen los depósitos donde son empacados los fragmentos de núcleo, organelos y citoplasma, para ser fagocitados por los macrófagos (Su *et al.*, 2015).

Consistente con los resultados obtenidos para el compuesto 3c, otros compuestos con efecto citotóxico, como la antraquinona de origen natural emodin y la flavona natural eupatorin inducen apoptosis en células HeLa por vía intrínseca (Lee *et al.*, 2016; Yaoxian *et al.*, 2013).

3.3 Compuesto híbrido 3j en células carcinoma pulmonar humano (A549)



3.3.1 Materiales y métodos

3.3.1.1 Determinación de la viabilidad por el método de reducción de MTT.

El efecto del compuesto híbrido 3J sobre la viabilidad de las células A549 se realizó mediante la reducción de la sal de tetrazolio MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA). Las células A549 fueron depositadas 7.5×10^3 células/pozo, en una placa de 96 pozos e incubadas durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación, las células fueron tratadas con diversas concentraciones del compuesto híbrido 3J (5, 25, 50 y 100 µM) por 12, 24 y 48 horas. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por 200 µL de MTT (0,5 mg/mL) se mantuvo en incubación por 3 horas a 37°C. Finalmente los cristales de formazan fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y se midió la absorbancia a 580 nm (Reilly *et al.*, 1998).

3.3.1.2 Determinación de la proliferación por el método con cristal violeta.

El efecto del compuesto híbrido 3J sobre la proliferación celular se determinó mediante el método de cristal violeta. Las células A549 fueron depositadas 5×10^3 células/pozo (A549) en placas de 96 por 24 horas a 37°C. Luego de la incubación, las células fueron tratadas con el compuesto híbrido 3J en la concentración de 5 µM durante 24, 48 y 72 horas. A continuación, las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS tampón compuesto por NaCl (680,0 mM, KCl 13,40 mM, y Na₂HPO₄ 40,50 mM), fijadas con metanol durante 10 minutos y posteriormente incubadas con 50 µL de solución de cristal violeta (0,02% p/v disuelto en etanol 2% v/v) durante 5 minutos. A continuación, las células fueron lavadas 10 veces con PBS y

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

enseguida se solubilizó el contenido de cada pozo con 200 μL de citrato de sodio (0,05 M). La lectura de la absorbancia fue realizada a 550 nm (Kueng *et al.*, 1989).

3.3.1.3 Análisis morfológico

Células 549 (1×10^5 células/pozo) fueron sembradas en placas de 12 pozos y mantenidas con atmósfera de 5% de CO_2 a 37 °C por 24 h. Después de la adhesión, las células fueron tratadas con la concentración 25 μM del compuesto 3J durante 24 h. Posterior al tiempo de tratamiento, las células fueron fijadas con etanol por 5 minutos a temperatura ambiente y teñidas con hematoxilina y eosina. Los cambios morfológicos fueron examinados con un microscopio invertido Prisma Vert Zeiss.

3.3.1.4 Medida intracelular de especies reactivas de oxígeno

La medida intracelular de especies reactivas de oxígeno se realizó por el método de 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DFCH-DA). Las células A549 fueron depositadas ($1,5 \times 10^4$ células por pozo) en una placa de 96 pozos durante 24 horas, hasta adhesión total. Posteriormente, las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) dos veces e incubadas por treinta minutos con una solución de DFCA 50 μM diluido en PBS. A continuación, las células fueron lavadas nuevamente con PBS y se realizó el tratamiento con el compuesto 3J a 16,9 y 25 μM , se usó como control positivo peróxido de hidrógeno 400 μM . Enseguida se midió la fluorescencia, a 485 nm de longitud de onda de excitación y 525 nm de longitud de onda de emisión, usando un lector Varioskan Flash (Lebel *et al.*, 1992).

3.3.1.5 Medida de lipoperoxidación de membrana

Se depositaron $1,3 \times 10^5$ células (A549) en placas de 6 pozos durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con una solución 25 μM del compuesto 3J durante 24 horas. A continuación, las células fueron lavadas con PBS, soltadas con raspador y sonicadas por dos minutos. En seguida, alícuotas de 250 μL se mezclaron con 150 μL de dodecilsulfato sódico (SDS) 7% y 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (preparado en HCl 0,0667 M en oscuridad). En seguida, las muestras se agitaron e incubaron a 95 °C por 1h, se enfriaron en baño de hielo y se mezclaron con 2 mL de butanol. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 4000 g por 10 minutos y la fluorescencia de la fase orgánica fue determinada con 520 nm de excitación y 553 nm de emisión (Ohkawa *et al.*, 1979).

3.3.1.6 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

Las células A549 (8×10^4 células/pozo) fueron sembradas en placas de 6 pozos durante 24 horas hasta total adherencia, e incubadas con el compuesto híbrido 3j a la concentración de 25 μM por 24 horas. Posteriormente, las células se soltaron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en medio que contenía rodamina 1,0 $\mu\text{g/mL}$ a 37°C por 15 minutos en oscuridad. Después del tratamiento las células fueron lavadas, re-suspendidas en PBS y mantenidas por 30 minutos en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo en un equipo FACSCanto II (BD Biosciences) y los datos presentados mediante el programa flowing software news canal, versión 2.5.1. Un total de 30000 eventos fueron analizados por experimento (Cury-Boaventura *et al.*, 2004).

3.3.1.7 Inducción de apoptosis -Anexina V/sytox

La inducción de apoptosis o necrosis fue determinada por citometría de flujo en un equipo BD FACS Canto II, mediante el kit APC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with APC Annexin V and SYTOX Green (Invitrogen). Las células A549 fueron depositadas en placas de 6 pozos (1×10^5 células/pozo) por 24 horas hasta total adherencia, y enseguida fueron tratadas con el compuesto híbrido 3j (25 μ M) por 24 horas. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas e incubadas con 5 μ L de APC anexina y 1 μ L de sytox, por cada 100 μ L de suspensión celular, durante 15 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Después del periodo de incubación las células fueron conservadas en hielo, examinadas por citometría de flujo y los datos analizados mediante Flowing software news canal, versión 2.5.1. Un total de 30000 eventos fueron analizados por experimento (Vermes *et al.*, 1995).

3.3.2 Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el presente estudio, sin realizar comparaciones con los datos disponibles en la literatura.

3.3.2.1 El compuesto híbrido 3j afecta la viabilidad y proliferación de células A549

La figura 17 presenta el efecto del compuesto 3j sobre la viabilidad de las células A549 después de 12, 24 y 48 horas de tratamiento. Los resultados obtenidos con el ensayo de MTT, muestran que el compuesto 3j presenta un efecto dependiente de la dosis y del tiempo, donde la actividad citotóxica más pronunciada se observa después de 48 horas de aplicación. En una concentración baja (25 μ M) en 12 h de tratamiento no se presenta efecto citotóxico significativo, pero después de 24 y 48 h de tratamiento se observa disminución en 20 y 60% en la viabilidad celular. Asimismo, en la concentración más alta (100 μ M), después de 48 h de incubación se presenta

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

disminución de 80% en la viabilidad de las células HeLa testeadas. La tabla 3 presenta las concentraciones del híbrido 3j que disminuyen en 50% la viabilidad de las células A549, para 48 horas de tratamiento la CC_{50} fue $16,9 \pm 6,4 \mu\text{M}$ y para 12 y 24 horas fue $>100 \mu\text{M}$.

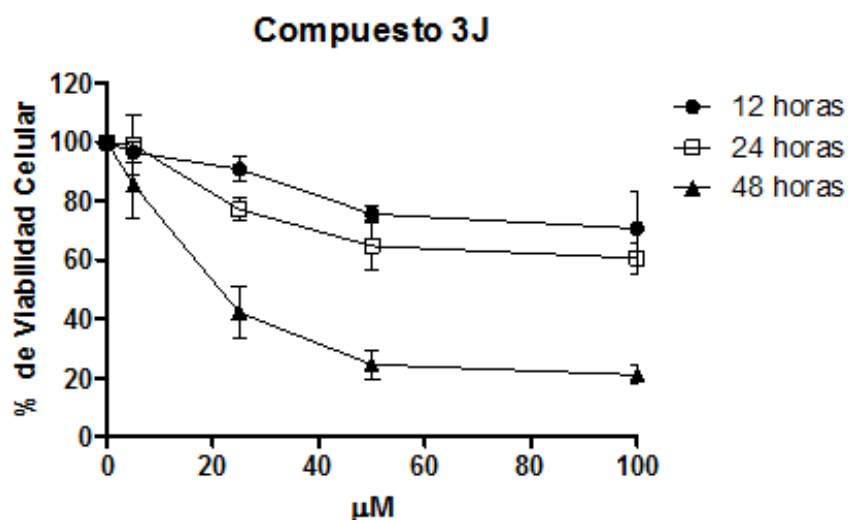


Figura 17. Efecto del compuesto híbrido 3j sobre la viabilidad de células A549 a 12, 24 y 48 horas de tratamiento. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de células viables en comparación con el control (los datos representan mínimo dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas en los porcentajes de viabilidad de las concentraciones de 50 y 100 μM para 12 horas, en las concentraciones de 25, 50 y 100 para 24 horas y en todas las concentraciones evaluadas para 48 horas de tratamiento.

Tabla 3. Valores de CC_{50} del compuesto híbrido 3j con respecto al tiempo

Tiempo de tratamiento	$CC_{50} \mu\text{M}$
(horas)	
12	>100
24	>100
48	$16,9 \pm 6,4$

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Igualmente, se determinó el efecto de bajas concentraciones de compuesto híbrido 3j, sin efecto citotóxico significativo, sobre la proliferación celular. Las células fueron tratadas con 5 μ M del compuesto 3j por 48 horas. El efecto sobre la proliferación celular del compuesto 3j se presenta en la figura 18, donde puede observarse que inhibe la proliferación en 53% con respecto al control, después de 48 h de tratamiento. Esto demuestra que el compuesto híbrido 3j, en bajas concentraciones, afecta la viabilidad y proliferación de células de adenocarcinoma de pulmón (A549).

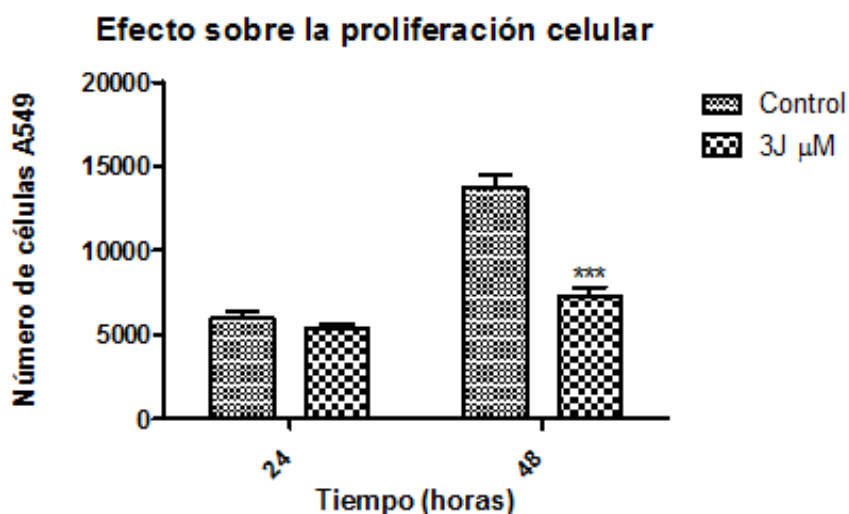


Figura 18. Efecto de compuesto híbrido 3J [25 μ M] sobre la proliferación de células A549 mediante el método de cristal violeta. Los valores representan la media $\pm$ DS del número de células viables en comparación con el control (los datos presentan mínimo dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). *** representa diferencias significativas ($p < 0,001$).

3.3.2.2 El compuesto híbrido 3j altera la morfología celular, induciendo diferentes mecanismos de muerte en las células A549.

Con el objetivo de conocer el mecanismo de muerte que genera el efecto citotóxico presentado por el compuesto 3j, se realizó un análisis morfológico usando tinción de hematoxilina y eosina. La figura 19 contiene las imágenes de las células tomadas como control y las células

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

tratadas con la concentración de 25 μ M por 24 h. La figura 19A presenta las células A549 sin tratamiento, donde es posible observar la morfología típica adherente con formación de monocapa. Por su parte, en las células tratadas con el híbrido 3j (figura 19B, 19C) se puede observar tres patrones morfológicos diferentes. En el primero, se observa un grupo de células que presentan pérdida de contacto con las células adyacentes, reducción del volumen celular, aparición de surcos en la membrana plasmática y cuerpos apoptóticos (flechas azules). En el segundo, es posible ver células que presentan aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y condensación de cromatina (flechas rojas). En el tercero, (figura 19C) es posible observar gran acumulación de pseudo-vacuolas de doble membrana (flechas negras). Estos patrones morfológicos sugieren que el compuesto híbrido 3j ejerce su efecto citotóxico al inducir diferentes mecanismos de muerte como apoptosis, necrosis y autofagia.

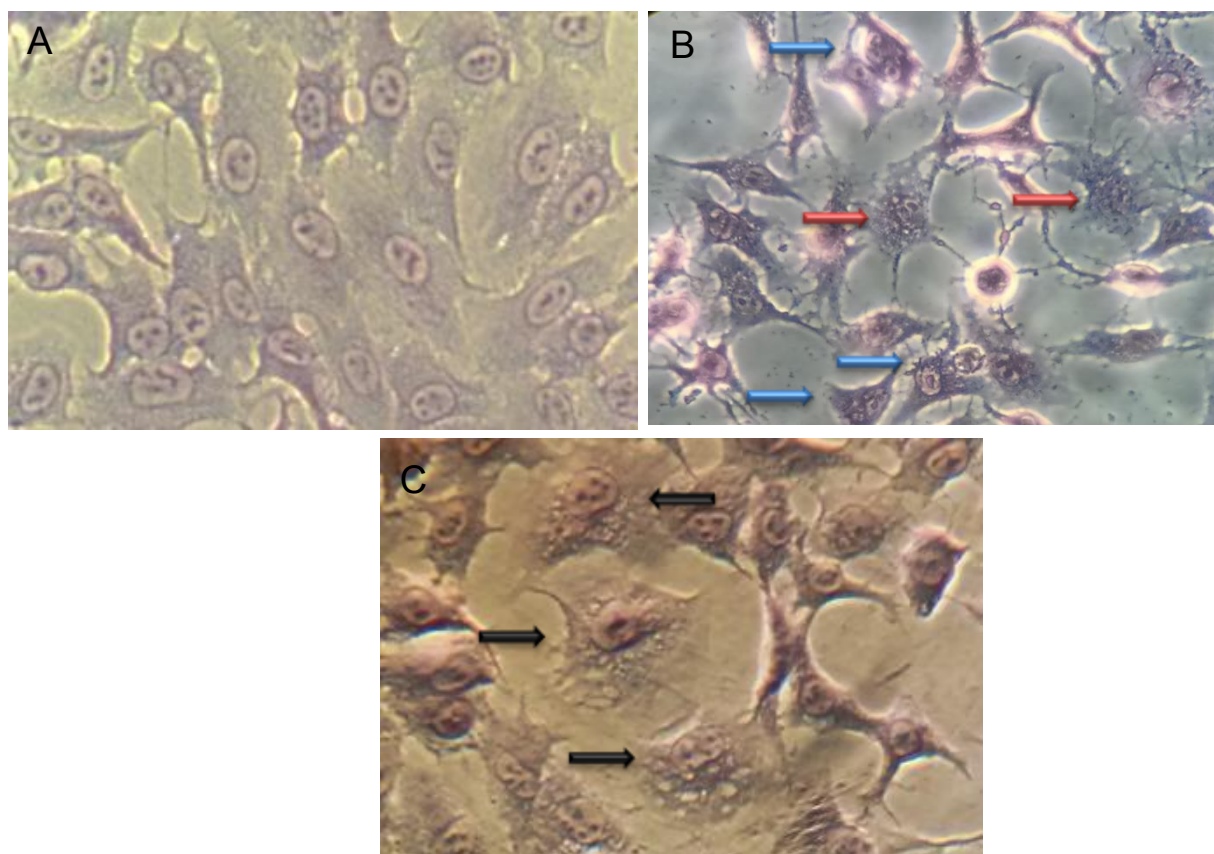


Figura 19. Efecto del compuesto 3j sobre la morfología de las células tumorales A549 incubadas durante 24 horas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido Prisma Vert Zeiss, con el objetivo 40x. A) Células sin tratamiento, B) células tratadas con 3j a 25 μ M, C) células tratadas con 3j a 25 μ M.

3.3.2.3 El compuesto híbrido 3j aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno sin generar lipoperoxidación, ni cambios en el potencial de membrana.

Con el fin elucidar el mecanismo de muerte celular inducido por el híbrido 3j, se determinó la generación de ERO por análisis fluorométrico usando el método de DFCH-DA, usando H_2O_2 (400 μ M) como control positivo del ensayo. El compuesto 3J mostró un aumento exponencial de las ERO en función del tiempo hasta ~60 minutos, posteriormente se observó una tendencia a estabilizarse hasta los 240 minutos de monitoreo del ensayo (Figura 20). Este comportamiento se observó para las dos concentraciones evaluadas (16,9 y 25 μ M) y para el control positivo. Con la

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

concentración más alta se observó un ligero aumento en el porcentaje de fluorescencia que no alcanzó los niveles presentados por el control positivo, que superaron el 200%.

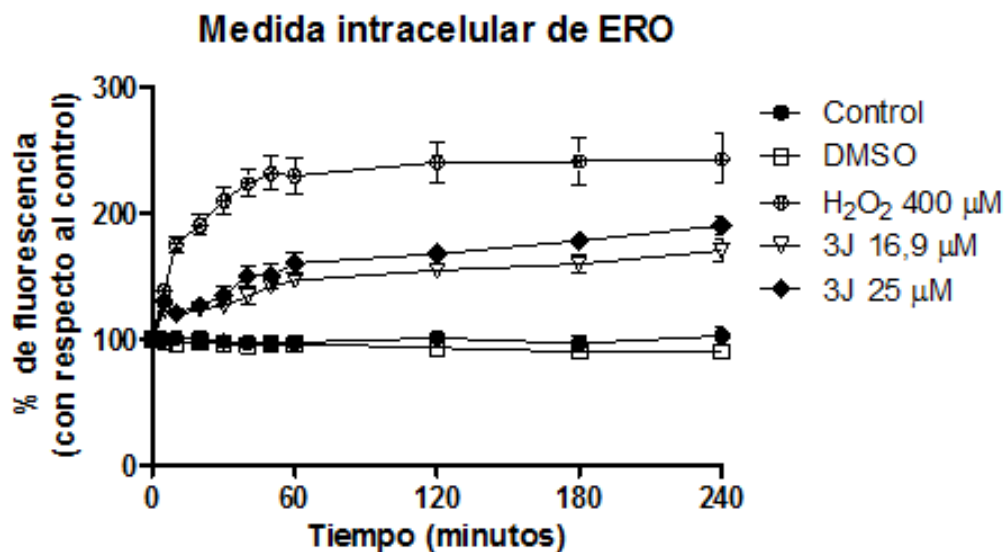


Figura 20. Aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) después del tratamiento con el compuesto híbrido 3J. . Las células A549 fueron pre-tratadas con DCFH-DA disuelto en PBS, tratadas con el compuesto híbrido 3j (16,9 y 25 µM) y la lectura de la fluorescencia se realizó durante 240 minutos. Los experimentos representan la media $\pm$ DS del triplicado de tres experimentos independientes. El compuesto 3J (16,9 y 25 µM) y el H₂O₂ (400 µM) presentan diferencias significativas con respecto al control $p < 0,001$.

Posteriormente, se determinó si el aumento en las ERO inducido por el compuesto híbrido provocaban lipoperoxidación o degradación oxidativa de los lípidos de las membranas celulares, mediante el ensayo de TBARS. La figura 21 muestra que el efecto del híbrido 3J no genera niveles significativos de malondialdehído (MDA)/ mg de proteína, con respecto a los niveles observados para el control.

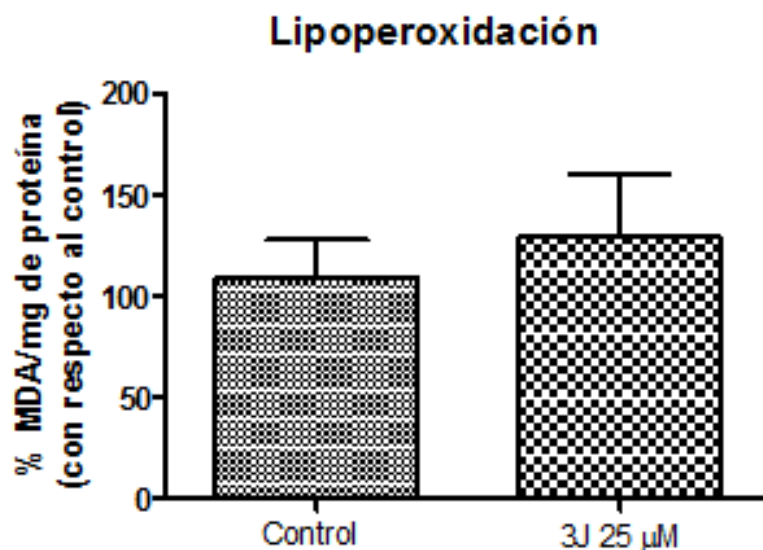


Figura 21. Efecto del compuesto híbrido 3J sobre la lipoperoxidación en células tumorales A549. La figura presenta el porcentaje de malondialdehído por mg de proteína, determinado mediante el método de TBARS. Los resultados representan la media $\pm$ DS del triplicado de tres experimentos independientes. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. El 100% corresponde a 15,56 nmol MDA/mg de proteína.

Mediante citometría de flujo se determinó el efecto del compuesto 3J sobre el potencial de membrana mitocondrial usando rodamina (Rho-123). En la figura 22 es posible observar que doxorubicina (1,5 μ M), tomada como control positivo del experimento, afecta el potencial mitocondrial; mientras que el híbrido no genera despolarización mitocondrial en las células A549, al no incorporar Rho-123 después de 24 h de tratamiento.

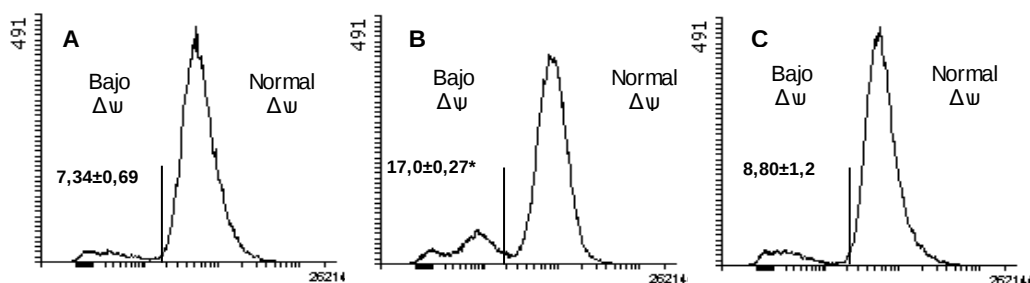


Figura 22. Efecto del compuesto híbrido 3J sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los resultados se obtuvieron mediante citometría de flujo después de 24 h de tratamiento. A) Control. B) Doxorubicina 1,5 μM . C) Compuesto híbrido 3J (25 μM). Se analizó un total de 30000 eventos en cada experimento. * representa diferencias significativas $p < 0,05$.

3.3.2.4 El compuesto híbrido 3J genera externalización de fosfatidilserina.

Las células A549 tratadas con el compuesto híbrido 3J (25 y 50 μM) durante 24 horas, fueron evaluadas por citometría de flujo con Anexina V y sytox. La anexina V es una proteína recombinante que se une a la fosfatidilserina, un lípido que se expresa en la membrana de las células en apoptosis, y el sytox es un colorante impermeable a las membranas celulares que se une al ADN y es dependiente de la permeabilidad de membrana que se presenta en las fases tardías de apoptosis o necrosis. Las figura 23A y 23B presentan los resultados obtenidos para las células A549 sin tratamiento y el fármaco doxorubicina, tomado como control positivo. La figura 23C presenta los resultados obtenidos para el tratamiento 25 μM , donde es posible observar eventos en los cuatro cuadrantes. Sin embargo, en ninguno de los casos se observan diferencias significativas con respecto al control, por ello se realizó el ensayo con una concentración alta 50 μM y los resultados se presentan en la figura 23D, donde se observa el aumento significativo de 5,6% en las células marcadas con Anexina V (+)/Sytox (+) y de 11,38% en las células marcadas con Anexina V (-)/Sytox (+). Lo anterior indica que el tratamiento con el híbrido 3J 50 μM genera mecanismos de muerte celular relacionados con apoptosis tardía y necrosis.

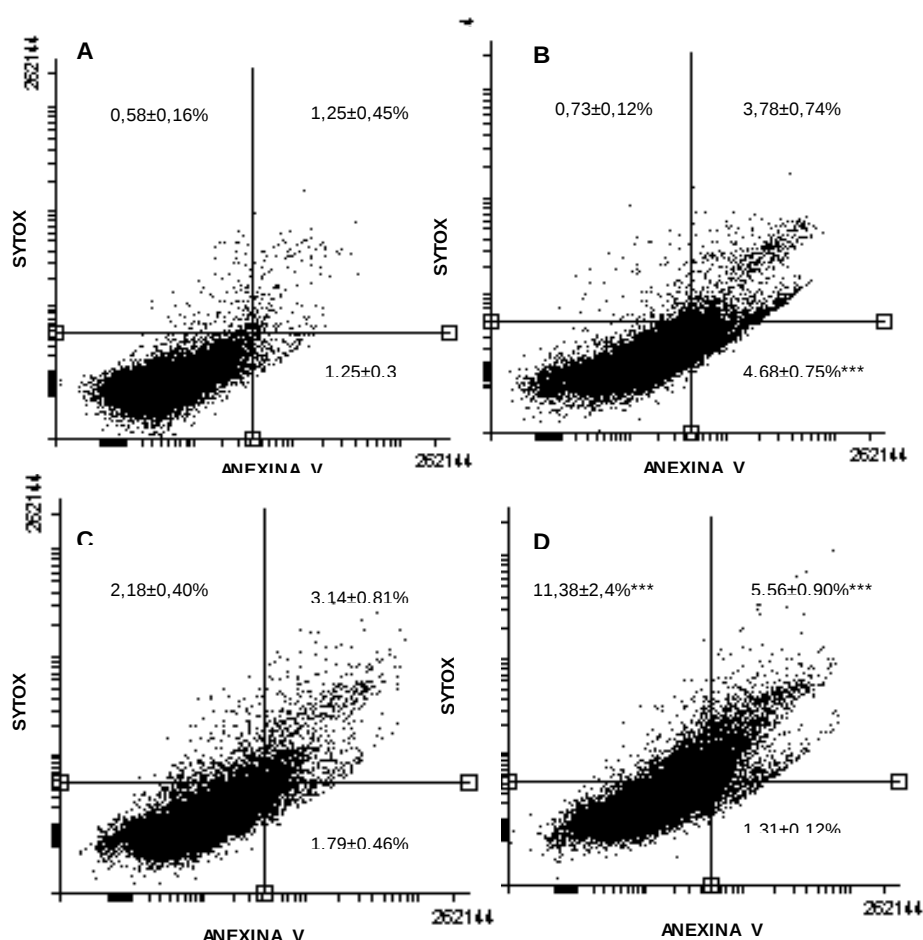


Figura 23. Efecto del compuesto híbrido 3j sobre células A549 tratadas con Anexina V y sytox. Las células A549 fueron tratadas durante 24 horas. A) Control, B) Doxorubicina 1,5 μM, C) 3j 25 μM, D) 3j 50 μM. Las figuras representan un dot-blot con diferentes poblaciones de células: cuadrante inferior izquierdo= células normales; cuadrante inferior derecho= células en apoptosis temprana; cuadrante superior derecho= células en apoptosis tardía; cuadrante superior izquierdo= células necróticas. *** Representa diferencias estadísticamente significativas $p < 0,01$.

3.3.3 Discusión

El cáncer de pulmón es una de las causas de muerte por cáncer más frecuente, y en parte, esto es producto del desarrollo de resistencia a los medicamentos disponibles. A pesar de la investigación exhaustiva sobre mecanismos de resistencia, aún no se conoce el ajuste correcto para un tratamiento eficiente (Rosell *et al.*, 2013). Los compuestos híbridos de THQ-isozaxoles

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

presentaron actividad citotóxica en células de adenocarcinoma de pulmón (A549), lo que lo convierte en un compuesto promisorio para este tipo de cáncer. A continuación se discuten los resultados obtenidos en los análisis de citotoxicidad, proliferación, y estudio del mecanismo de muerte del compuesto híbrido 3J en células A549.

El análisis de MTT mostró que el compuesto híbrido 3J 25 μ M después de 48 h de tratamiento, fue capaz de disminuir en 60% la viabilidad de las células A549 y con una concentración no citotóxica (5 μ M) inhibió la proliferación celular en 50%. Estos resultados demuestran que el híbrido 3J afecta la viabilidad y proliferación de células A549. Esto sugiere la potencial importancia de este compuesto en el tratamiento del cáncer pulmonar y pone de manifiesto la importancia de estudiar el mecanismo de MCP que desencadena su efecto citotóxico.

El análisis morfológico del efecto del compuesto 3J sobre las células A549 (Figura 19), mostró diferentes características que sugieren la co-existencia de varios tipos de MCP, apoptosis, necrosis y autofagia. Se ha establecido que los procesos de muerte celular programada encierran la compleja interacción entre apoptosis, autofagia y necroptosis. En algunos casos un estímulo desencadena un tipo de MCP pero en otras situaciones, el mismo estímulo puede iniciar múltiples procesos de muerte, y diferentes mecanismos pueden co-existir e interactuar dentro de una célula, pero finalmente uno de éstos se convierte en dominante (Su *et al.*, 2015).

En este sentido, se estableció mediante el ensayo de DCFH-DA, que el híbrido 3J genera la formación de ERO (Figura 20), cuya presencia se ha relacionado con la inducción de los tres tipos de MCP descritas en este trabajo (Simón *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2014; Fulda, 2016). Lo cual, podría sugerir que el aumento en las ERO, generado por el híbrido, podría

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

inducir apoptosis por vía extrínseca, teniendo en cuenta que no se generó efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial (Figura 21). Lo cual se relaciona con la co-existencia de varios tipos de MCP, conociendo que los miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) TNF- α , Ligando FAS y (TRAIL), encargados de generar apoptosis por vía extrínseca, también puede generar necroptosis al ser activados por el aumento en las ERO (Chen *et al.*, 2016), y el dominio de muerte asociado a FAS (FADD) en células epiteliales induce muerte celular con altos niveles de autofagia, principalmente cuando la apoptosis está bloqueada (Chaabone *et al.*, 2013). Además, que el híbrido genere mecanismos de MCP por vía extrínseca genera gran interés, teniendo en cuenta que actualmente hay interés en dirigir los mecanismos de muerte hacia la vía extrínseca con el fin de eludir la resistencia a las drogas; conociendo que los pacientes que no responden a la quimioterapia presentan defectos en p53 y disfunciones en la vía intrínseca de apoptosis, lo cual es comprensible conociendo que p53 activa proteínas como PUMA, NOXA, Bax y Bak, las cuales están encargadas de formar poros en la membrana mitocondrial que permiten la liberación de proteínas pro-apoptóticas y la inducción de muerte por vía mitocondrial (Maslon & Hupp, 2010).

Estos resultados son coherentes con los reportes recientes de compuestos que generan efecto citotóxico por varios mecanismos de MCP mediada por la generación de ERO. Entre estos, el producto natural *rasfonina* en la línea tumoral de riñón ACHN, se estableció que induce simultáneamente diversos mecanismos de MCP necroptosis, autofagia y apoptosis (Sun *et al.*, 2016). Igualmente, la columbianadin (CBN) extraída de la planta medicinal de origen japonés *Angelica pubescens*, en la línea de cáncer de colon HCT116, induce apoptosis en bajas concentraciones y necroptosis en altas concentraciones. Los autores manifiestan que el estrés

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

oxidativo generado por el compuesto en parte es el responsable de activar estos dos tipos de MCP (Kang *et al.*, 2016).

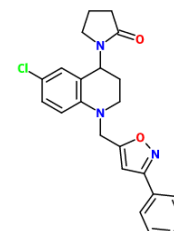
De la misma forma, los datos obtenidos en los análisis de Anexina/sytox muestran que el 5,56% de las células tratadas con el híbrido 3J (50 μM) fueron marcadas con anexina V +/ sytox +, un marcador de apoptosis y el 11,38% en la población marcada con anexina V -/ sytox +. Estos resultados y el análisis morfológico sugieren que el compuesto híbrido 3J en altas concentraciones induce mecanismos de MCP por apoptosis y necrosis. La necrosis ha sido comúnmente considerada como un mecanismo de muerte accidental y no regulada. Sin embargo, evidencias indican que la necrosis también puede ser ejecutada por mecanismos regulados, y se adoptó el término necroptosis para identificar una forma de necrosis programada. Actualmente, hay especial interés en la necroptosis porque podría convertirse en una ruta alterna de muerte para células tumorales resistentes a la terapia que induce apoptosis (Wu *et al.*, 2012; Linkermann & Green, 2014).

Por otro lado, el efecto citotóxico del compuesto 3J en bajas concentraciones sugiere la intervención de un mecanismo de muerte celular distinto a necroptosis y apoptosis; teniendo en cuenta la CC_{50} de 16,9 μM y que no se observaron diferencias significativas en estos mecanismos de muerte, en el ensayo de Anexina V/sytox en una concentración baja (25 μM) del compuesto. Esto podría ser congruente con el hecho de que no se afecten el potencial de membrana mitocondrial (Figura 22) y que los niveles de ERO tampoco generen daño en la membrana celular (Figura 21), a pesar de que las células A549 presentan membranas con altos niveles de ácidos grasos insaturados, que son muy susceptibles a la lipoperoxidación (Catalá, 2013). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las características observadas en el análisis morfológico, es posible sugerir que el híbrido 3J a bajas concentraciones podría inducir varios

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

tipos de MCP, posiblemente con preferencia de la autofagia. Mientras que en altas concentraciones del compuesto, los tipos de MCP preferentes serían apoptosis y necroptosis. Sin embargo, es necesario evaluar marcadores de necrosis para establecer que corresponde al mecanismo de muerte por necrosis programada y realizar una microscopía electrónica para confirmar la generación de autofagia.

3.4 Compuesto híbrido 3j En células hepatoma humano (HepG2)



3.4.1 Materiales y métodos

3.4.1.1 Determinación de la viabilidad por el método de reducción de MTT.

El efecto del compuesto híbrido 3J sobre la viabilidad de las células HepG2 se realizó mediante la reducción de la sal de tetrazolio MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA). Las células HepG2 fueron depositadas (7.500 células/pozo) en una placa de 96 pozos e incubadas durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación, las células fueron tratadas con diversas concentraciones del compuesto híbrido 3J (5, 25, 50 y 100 µM) por 12, 24 y 48 horas. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por 200 µL de MTT (0,5 mg/mL) se mantuvo en incubación por 3 horas a 37°C. Finalmente los cristales de formazan fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y se midió la absorbancia a 580 nm (Reilly *et al.*, 1998).

3.4.1.2 Análisis morfológico

Células HepG2 (1x10⁵ células/pozo) fueron sembradas en placas de 6 pozos e incubadas con atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C por 24 h. Después de la adhesión, las células fueron tratadas con la

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

concentración 25 μM del compuesto 3J durante 24 h. Posterior al tiempo de tratamiento, las células fueron fijadas con etanol por 5 minutos a temperatura ambiente y teñidas con hematoxilina y eosina. Los cambios morfológicos fueron examinados a través de un microscopio invertido y las imágenes se adquirieron con una cámara Nikon digital Sight DS-U2.

3.4.1.3 Medida intracelular de especies reactivas de oxígeno

La medida intracelular de especies reactivas de oxígeno se realizó por el método de 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DFCH-DA). Las células HepG2 fueron depositadas (2×10^4 células por pozo) en una placa de 96 pozos durante 24 horas, hasta total adherencia. Posteriormente, las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) dos veces e incubadas por treinta minutos con una solución de DFCH-DA 50 μM diluido en PBS. A continuación, las células fueron lavadas con PBS y tratadas con el compuesto 3J a 25 μM . Enseguida se midió la fluorescencia, a 485 nm de longitud de excitación y 525 nm de longitud de emisión, durante 4 horas usando un lector Varioskan Flash. Se usó como control positivo peróxido de hidrógeno 400 μM (Lebel *et al.*, 1992).

3.4.1.4 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

Las células HepG2 (1×10^5 células/pozo) fueron sembradas en placas de 6 pozos durante 24 horas hasta total adherencia, e incubadas con el compuesto híbrido 3j a la concentración de 25 μM por 24 horas. Posteriormente, las células se soltaron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con medio que contenía rodamina 1,0 $\mu\text{g/mL}$ a 37°C por 15 minutos en oscuridad. Después del tratamiento las células fueron lavadas, re-suspendidas en PBS y mantenidas por 30 minutos en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo en un equipo BD FACS Canto II y los datos presentados mediante el programa Flowing software news

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

cannel, versión 2.5.1. Un total de 30000 eventos fueron analizados por experimento (Cury-Boaventura *et al.*, 2004).

3.4.1.5 Inducción de apoptosis -Anexina V/sytox

La inducción de apoptosis o necrosis fue determinada por citometría de flujo en un equipo equipo BD FACS Canto II mediante el kit APC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with APC Annexin V and SYTOX Green (Invitrogen). Las células HepG2 fueron depositadas en placas de 6 pozos ($1,5 \times 10^5$ células/pozo) por 24 horas hasta total adherencia, y enseguida fueron tratadas con el compuesto híbrido 3j ($25 \mu\text{M}$) por 24 horas. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas e incubadas con $5 \mu\text{L}$ de APC anexina y $1 \mu\text{L}$ de sytox, por cada $100 \mu\text{L}$ de suspensión celular, durante 15 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Después del periodo de incubación las células fueron conservadas en hielo, examinadas por citometría de flujo y los datos analizados mediante el programa flowing software news canal, versión 2.5.1. Un total de 30000 eventos fueron analizados por experimento (Vermes *et al.*, 1995)

3.4.1.6 Análisis de daño del ADN

Se depositaron 1×10^6 células HepG2 en cajas de Petri de 6 cm de diámetro, durante 24 horas hasta completa adherencia. A continuación las placas fueron tratadas con el compuesto híbrido 3j en la concentración de $50 \mu\text{M}$ durante 12 horas y $25 \mu\text{M}$ durante 12, 24 y 48 horas de tratamiento. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, soltadas con raspador y el ADN fue extraído mediante el kit de detección de la escalera de ADN ApoTarget de Invitrogen Corporation (Camarillo, CA, USA), de acuerdo a instrucciones de manufactura. Finalmente, las muestras de ADN fueron separadas electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% a 300 mA,

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

12 V/cm por 40 minutos a 25°C. Se usó tratamiento con camptotecina durante 5 horas a 37°C como control positivo.

3.4.2 Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el presente estudio, sin realizar comparaciones con los datos disponibles en la literatura.

3.4.2.1 *El compuesto híbrido 3j afecta la viabilidad HepG2*

La figura 24 presenta el efecto del compuesto 3j sobre la viabilidad de las células HepG2 después de 12, 24 y 48 horas de tratamiento. Los resultados obtenidos con el ensayo de MTT, muestran que el compuesto 3j presenta un efecto dependiente de la concentración y el tiempo, donde la actividad citotóxica más pronunciada se observa después de 48 horas de aplicación. El tratamiento por 12 y 24 h en concentraciones altas (50 y 100 μM) generó disminución en la viabilidad celular de ~20 y 50%, respectivamente. Mientras que, en 48 h de tratamiento con una concentración baja (5 μM) la inhibición es cercana al 60%, y en la concentración más alta (100 μM), es de ~93%. La tabla 4 presenta las concentraciones de híbrido 3j que disminuyen en 50% la viabilidad de las células HepG2, para 48 horas de tratamiento la CC_{50} fue $5,2 \pm 1,9 \mu\text{M}$, para 24 h $52,4 \pm 4,9$ y para 12 h fue $>100 \mu\text{M}$.

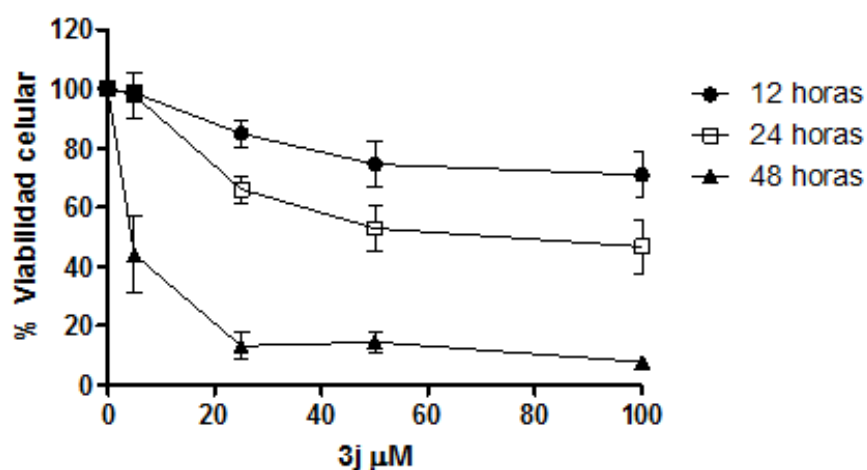


Figura 24. Efecto del compuesto híbrido 3j sobre la viabilidad de células HepG2. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de células viables en comparación con el control (los datos presentan dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas en los porcentajes de viabilidad de las concentraciones de 50 y 100 μM para 12 horas, en las concentraciones de 25, 50 y 100 para 24 horas y en todas las concentraciones evaluadas para 48 horas de tratamiento.

Tabla 4. Valores de CC_{50} del compuesto híbrido 3j con respecto al tiempo

Tiempo de tratamiento (horas)	CC_{50} μM
12	>100
24	$52,4 \pm 4,9$
48	$5,2 \pm 1,9$

3.4.2.2 El compuesto híbrido 3J induce alteraciones de la morfología celular de las células HepG2

Con el objetivo de conocer el mecanismo de muerte que genera el efecto citotóxico presentado por el compuesto 3j, se realizó un análisis morfológico usando la tinción de hematoxilina y eosina. La figura 25 presenta las imágenes de las células tomadas como control y las células tratadas con la concentración de 25 μ M por 24 h, en la figura 25A es posible observar la morfología típica adherente de las células HepG2 sin tratamiento, con formación de monocapa. Por su parte, en las células tratadas con el híbrido 3j (figura 25B) es posible observar disminución significativa en el número de células adheridas, pérdida de contacto con las células adyacentes, reducción del volumen celular y condensación de cromatina.

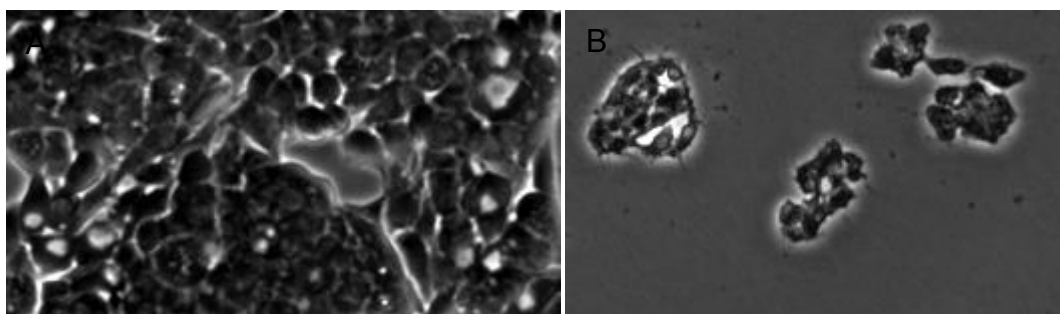


Figura 25. Efecto del compuesto 3j sobre la morfología de las células tumorales HepG2 incubadas durante 24 horas. A) Células sin tratamiento, B) células tratadas con 3J a 25 μ M.

3.4.2.3 El compuesto híbrido 3J aumenta las especies reactivas de oxígeno y altera en el potencial de membrana mitocondrial.

Con el fin elucidar el mecanismo de muerte celular inducido por el híbrido 3J, se determinó la generación de ERO por análisis fluorométrico usando el método de DFCH-DA, el H_2O_2 se usó

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

como control positivo (400 μM) del ensayo. El compuesto 3J y el control positivo mostraron un aumento de las ERO en función del tiempo hasta ~60 minutos, posteriormente se observó una tendencia a estabilizarse hasta los 240 minutos de monitoreo del ensayo (Figura 27). El híbrido generó un aumento en las ERO de ~150% y el H_2O_2 superó el 250%.

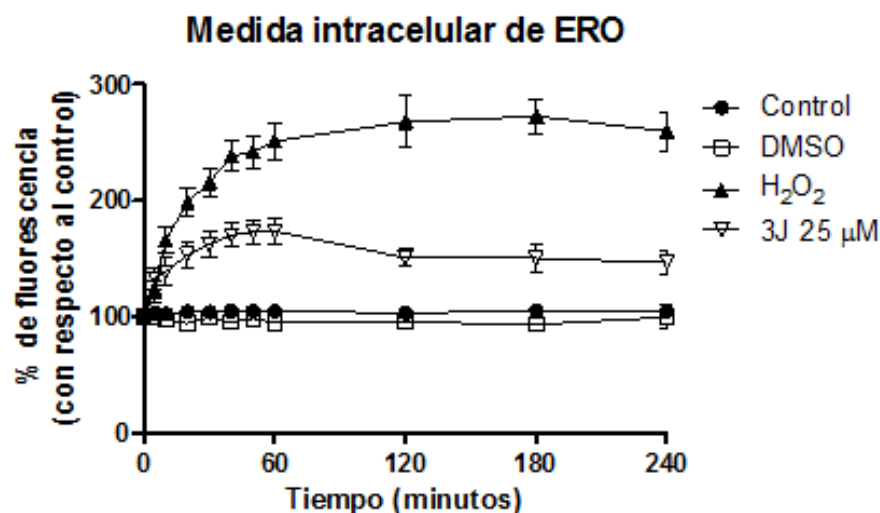


Figura 26. Aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) después del tratamiento con el compuesto híbrido 3J. Las células HepG2 fueron pre-tratadas con DCFH-DA disuelto en PBS, tratadas con el compuesto híbrido 3j (25 μM) y la lectura de la fluorescencia se realizó durante 240 minutos. Los experimentos representan la media $\pm$ DS del triplicado de tres experimentos independientes. El compuesto 3J (25 μM) y el H_2O_2 presentan diferencias significativas con respecto al control $p < 0,05$.

Mediante citometría de flujo se determinó el efecto del compuesto 3J sobre el potencial de membrana mitocondrial de células HepG2 usando rodamina (Rho-123). La figura 27 presenta los resultados obtenidos donde el compuesto híbrido 3J genera despolarización mitocondrial en las células HepG2, en la concentración de 25 μM durante 24 h de tratamiento. Igualmente, el fármaco doxorubicina tomado como control positivo afectó el potencial de membrana de estas células.

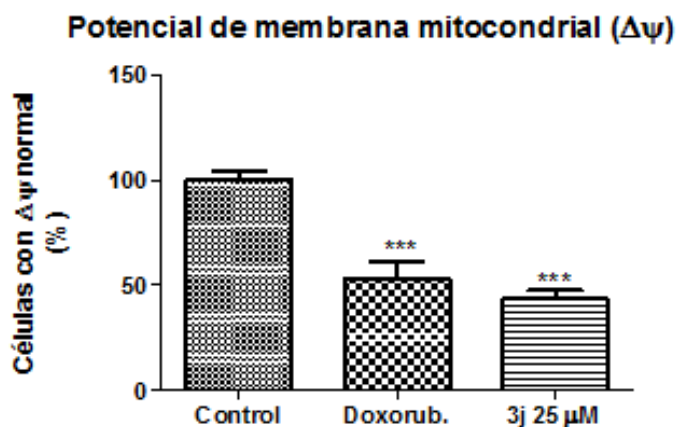


Figura 27. Efecto del compuesto híbrido 3J sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los resultados se obtuvieron mediante citometría de flujo después de 24 h de tratamiento. Doxorubicina 1,0 μ M se usó como control positivo. *** representan diferencias significativas con respecto al control $p < 0,001$.

3.4.2.4 El compuesto híbrido 3J no genera patrón de fragmentación de ADN y genera muerte celular por necrosis en altas concentraciones.

Se realizó la extracción de ADN de células HepG2 tratadas con el híbrido 3J en la concentración de 25 y 50 μ M durante 12 y 24 horas de tratamiento. La figura 28 muestra el patrón de separación del ADN extraído, el carril 1 presenta el marcador de peso, el carril 2 muestra sólo una banda que corresponde al ADN de las células HepG2 sin tratamiento. El carril 3 corresponde al tratamiento por 12 h con el compuesto 3J (50 μ M), donde es posible observar un barrido que se extiende por todo el gel; y en los carriles 4 y 5, que corresponden al tratamiento realizado durante 12 y 24 horas con la concentración 25 μ M, no es posible observar diferencias en el patrón de separación de ADN, con respecto a las células sin tratamiento.

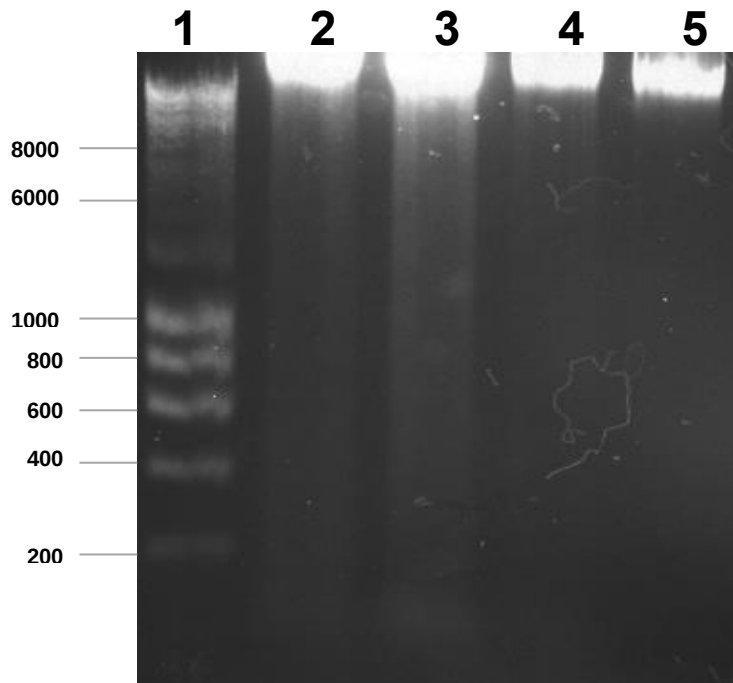


Figura 28. Efecto del compuesto 3J sobre la fragmentación de ADN. Las células HepG2 fueron tratadas con el compuesto 3J (25, 50 μ M) durante 12 y 24 horas de tratamiento. 1) marcador de peso molecular. 2) ADN extraído de las células sin tratamiento. 3) células tratadas con 3J 50 μ M durante 12 horas. 4) células tratadas con 3J 25 μ M durante 12 horas. 5) células tratadas con 3J 25 μ M durante 12 horas de tratamiento.

Además, las células HepG2 tratadas con el compuesto híbrido 3J (25 y 50 μ M) durante 24 horas, fueron evaluadas por citometría de flujo con Anexina V y sytox. La figura 29 presenta los diagramas para las células sin tratamiento (Figura 29A), el fármaco doxorubicina como control positivo (Figura 29B) y los tratamientos (25 y 50 μ M) (Figuras 29C y 29D). El tratamiento con el híbrido 25 y 50 μ M, presenta un aumento significativo con respecto al control, en las células marcadas con Anexina V (-)/Sytox (+) de 21,5 y 40,4 %, respectivamente. Estos resultados indican que las células HepG2 tratadas con el híbrido 3J en las concentraciones 25 y 50 μ M, presentaron un mecanismo de muerte celular por necrosis.

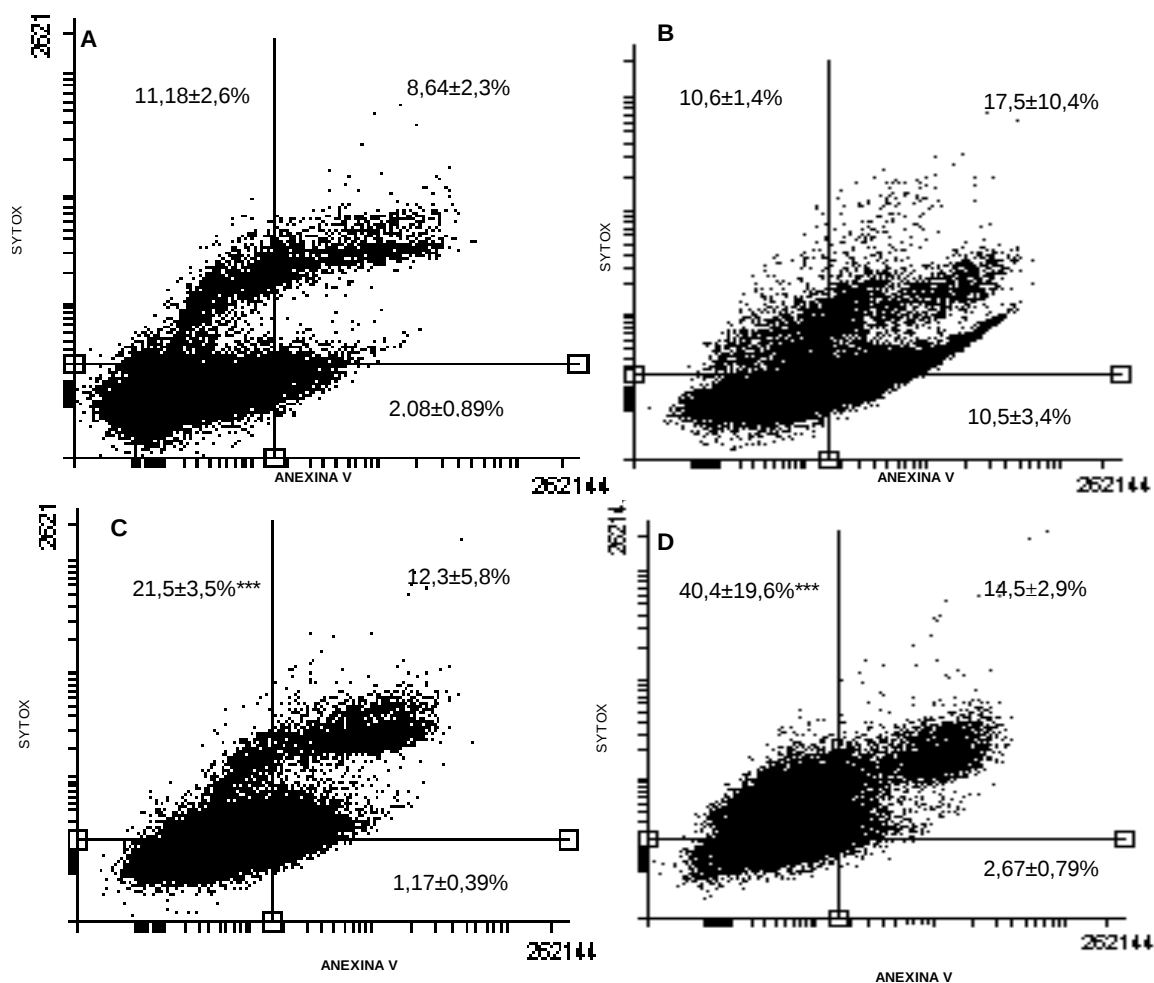


Figura 29. Efecto del compuesto híbrido 3j sobre células HepG2 tratadas con Anexina V y sytox. . Las células HepG2 tratadas y sin tratamiento con el compuesto 3j (25 µM) por 24 horas, fueron soltadas con tripsina, tratadas con anexina V – sytox y 30000 eventos fueron analizados por citometría de flujo. A) Control, B) Doxorubicina 1,0 µM, C) 3j 25 µM, D) 3j 50 µM. Las figuras representan un dot-blot con diferentes poblaciones de células: cuadrante inferior izquierdo= células normales; cuadrante inferior derecho= células en apoptosis temprana; cuadrante superior derecho= células en apoptosis tardía; cuadrante superior izquierdo= células necróticas. *** representa diferencias significativas $p < 0,01$.

3.4.3 Discusión

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el tipo de cáncer más prevalente y presenta el mayor índice de mortalidad en el mundo. Diversos procedimientos quirúrgicos, quimioterapéuticos y de

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

terapia molecular hacen parte del tratamiento. No obstante, se presentan diversas dificultades relacionadas con efectos secundarios, complicaciones quirúrgicas y resistencia al tratamiento quimioterapéutico y de terapia molecular (Manzione *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2013). En este sentido, los compuestos híbridos de THQ-isoxazoles presentaron actividad citotóxica en células de hepatocarcinoma (HepG2). A continuación se presenta la discusión de los resultados obtenidos en los análisis de citotoxicidad y estudio del mecanismo de muerte del compuesto híbrido 3j en células HepG2.

El análisis de citotoxicidad mostró que el compuesto híbrido 3J presenta un marcado efecto citotóxico sobre células de hepatocarcinoma (HepG2), el análisis de MTT arrojó una CC_{50} de $5,2 \pm 1,9 \mu\text{M}$ después de 48 h de tratamiento (Figura 24). Como una aproximación para conocer el mecanismo de muerte que desencadena el efecto citotóxico, se realizó el análisis morfológico del híbrido sobre las células de hepatocarcinoma, donde se observaron características típicas de MCP por apoptosis (Figura 25). Sin embargo, no se observó la degradación del ADN genómico en una escalera de fragmentos (Figura 28), y el análisis de anexina V/sytox para la concentración de $25 \mu\text{M}$ no presentó diferencias significativas con respecto al control, para ninguno de los marcajes evaluados. Mientras que la concentración de $50 \mu\text{M}$, presentó aumento en $\sim 40,4\%$ de la población celular marcada con anexina -/ sytox +, una característica típica de necrosis (Figura 29).

Actualmente, la necroptosis es considerada otro tipo de muerte celular regulada que está ganando interés porque podría convertirse en una alternativa ante los casos crecientes de resistencia al tratamiento quimioterapéutico que induce apoptosis (Wu *et al.*, 2012). Este mecanismo de MCP mantiene algunas características apoptóticas, pero también posee morfología necrótica. Ha sido demostrado que sólo se induce necroptosis si hay inhibición

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

farmacológica o ablación genética de la vía apoptótica, sugiriendo que la necroptosis es una alternativa para asegurar la muerte celular cuando la apoptosis falla (Philipp *et al.*, 2016).

Aunque los resultados del marcaje con Anexina V/sytox indican muerte celular por necrosis, el compuesto híbrido 3J 25 μ M disminuye el potencial de membrana mitocondrial (Figura 27), lo cual constituye una característica de inducción de apoptosis (Ly *et al.*, 2003) y difiere con el aumento en el mismo, que se ha reportado para el proceso necroptótico (Linkermann *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2016). Además, el híbrido 3J genera ERO (Figura 26), probablemente como resultado de su efecto sobre la cadena de transporte de electrones que finalmente, afecta el potencial de membrana mitocondrial y la síntesis de ATP (Divakaruni *et al.*, 2014). Aunque inicialmente, este efecto induce MCP por apoptosis, los bajos niveles de ATP, podrían re-direccionar el mecanismo de MCP hacia necroptosis, como lo demuestran los resultados obtenidos y tal como se ha reportado en la literatura, la necroptosis es un tipo de apoptosis abortada causada por la falla energética de las células (Radogna *et al.*, 2015). De esta manera, la mitocondria ejerce control sobre los mecanismos de MCP, mediante el nivel celular de ATP que puede determinar el tipo de muerte celular: altos niveles de ATP desencadena apoptosis, mientras que bajos niveles de ATP llevan a necrosis. Así, los niveles intracelulares de ATP se convierten en interruptores que dirigen los mecanismos de muerte celular de apoptosis a necrosis (Chaabane *et al.*, 2013).

Sin embargo, el híbrido 3J presenta una CC_{50} de 5,2 μ M y el análisis de Anexina V/Sytox para la concentración de 25 μ M, presenta células marcadas en todos los cuadrantes (Figura 29), pero no hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Esto podría indicar que el híbrido genera simultáneamente varios tipos de MCP, lo cual dificulta establecer un MCP predominante. Otros compuestos como 2-metoxi-6-acetil-7-metiljuglona (MAM) y tanshinona IIA han reportado la inducción simultánea de apoptosis y necrosis en células A549 y

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

HepG2, respectivamente. Por otro lado, el híbrido podría inducir muerte celular, en bajas concentraciones, por mecanismos de MCP diferentes de apoptosis o necrosis, lo cual lograría abrir nuevas rutas en la inducción de muerte celular, que podrían ser usadas en las terapias emergentes o en combinación con las existentes. Un comportamiento similar se reportó para el péptido TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ el cual es citotóxico en algunas líneas tumorales e induce MCP por mecanismos diferentes de autofagia, apoptosis y necrosis (Heulot *et al.*, 2016).

3.5 Conclusiones

- El tratamiento con el compuesto híbrido 3c afecta la viabilidad y proliferación de células HeLa; genera cambios en la morfología celular, liberación de citocromo c y fragmentación en el ADN. Lo cual sugiere que el efecto citotóxico del compuesto híbrido 3c es producto del daño del ADN generado por la inducción de apoptosis probablemente por vía intrínseca.
- El híbrido 3J reduce la viabilidad y proliferación en células de adenocarcinoma de pulmón (A549), altera la morfología celular en tres patrones distintos, genera ERO y en altas concentraciones induce apoptosis y necrosis. Esta evidencia experimental sugiere que efecto citotóxico del compuesto híbrido 3J, podría ser inducido por tres mecanismos de MCP distintos, donde a bajas concentraciones es preponderante la autofagia y en altas concentraciones se impone la apoptosis y necroptosis.
- El híbrido 3j presenta un marcado efecto citotóxico en células HepG2, el análisis morfológico presenta características de células en apoptosis, afecta el potencial de membrana mitocondrial, genera ERO y en altas concentraciones presenta características

necroptóticas. Estos resultados sugieren que el híbrido 3j podría inducir simultáneamente varios tipos de muerte celular (apoptosis y necrosis) o que induce apoptosis en una etapa inicial que ante los bajos niveles de ATP, se convierte en necrosis.

3. Respiración en células de hepatoma



4.1 Introducción

La función mitocondrial más importante es la producción de ATP y de metabolitos necesarios para cumplir la demanda bioenergética y biosintética de la célula. La mitocondria usa diversas moléculas, como el piruvato producto de la glucólisis, aminoácidos y ácidos grasos en la matriz mitocondrial, para generar los equivalentes reducidos NADH y FADH₂ en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT); los cuales sirven como donadores de electrones para el complejo I y II de la cadena de transporte de electrones (CTE). A continuación, los electrones son transportados por la ubiquinona al complejo III y por el Citocromo *c* al complejo IV, donde son entregados al oxígeno molecular para formar agua. La transferencia de electrones a través de la CTE está acoplada a bombas de protones, que los expulsan de la matriz al espacio inter-membrana por los complejos I, III y IV. Las bombas de protones generan la fuerza protón motriz que presenta un componente químico (ΔpH) y un componente eléctrico ($\Delta \psi$), los cuales son usados por el complejo V para generar ATP a partir de ADP y Pi. La generación de NADH y FADH₂ a partir de macromoléculas y la formación de energía metabólica para producción de moléculas complejas convierten a la mitocondria en la central del metabolismo catabólico y anabólico (Liemburg-Apers *et al.*, 2015).

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

El correcto funcionamiento celular requiere que la mitocondria esté en comunicación continua con el resto de la célula. Para ello, se han establecido dos tipos de interacción; señalización anterógrada y retrógrada. La señalización anterógrada implica transducción de señal del citosol a la mitocondria, la cual ocurre por la captación rápida de calcio en la matriz mitocondrial ante el aumento de la concentración de calcio citosólico. Este aumento del calcio mitocondrial activa las enzimas del CAT para estimular el metabolismo mitocondrial oxidativo. Por otro lado, la señalización retrógrada se refiere a la señalización de la mitocondria al citosol, sus principales exponentes son el citocromo c que es liberado para iniciar la apoptosis; las especies reactivas de oxígeno (ROS), metabolitos como el citrato, además de la expresión de fosfatasa y quinasas en la matriz mitocondrial y la presencia de plataformas de señalización en la membrana externa mitocondrial (Weinberg & Chandel, 20015).

La importancia de la mitocondria en diversos e importantes procesos celulares, ha planteado diferentes cuestiones con respecto a su injerencia en el desarrollo del cáncer, se ha sugerido que la enfermedad es producto de una mitocondria mutante con sobre-expresión de factores anti-apoptóticos Bcl-2 (Hartung, 2015), se ha establecido relación entre el proceso neoplásico y defectos en diversas funciones mitocondriales y se han relacionado diversos aspectos de la biología mitocondrial que favorecen el desarrollo de la tumorigénesis, los cuales incluyen la biogénesis, la dinámica de fisión y fusión, la muerte celular, señalización, metabolismo, ADN mitocondrial y estrés oxidativo (Bhat *et al.*, 2015).

4.1.1 La biología mitocondrial y el cáncer

El incremento de la masa y/o número de las mitocondrias celulares (biogénesis) es un proceso regulado por el oncogen c-Myc y el sensor metabólico mTOR. La elevada biogénesis

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

mitocondrial debido al incremento del oncogen c-Myc permite un aumento en la capacidad respiratoria que favorece la proliferación celular y por otro lado la sobre-expresión de c-Myc estimula la progresión del ciclo celular y el metabolismo glucolítico indispensable para el crecimiento celular (Vyas *et al.*, 2015). La biogénesis mitocondrial impacta sobre el resultado del tratamiento antitumoral porque le permite a la célula cancerosa con flexibilidad metabólica adaptarse a los blancos del tratamiento y al microambiente del tumor (Deberardinis *et al.*, 2008). Igualmente, la dinámica de fisión/fusión mitocondrial se ve afectada en las células tumorales. Se ha establecido un aumento en la fisión y/o una disminución en la fusión, resultado de un aumento en la expresión de la proteína Drp1, la cual se ha relacionado con un fenotipo migratorio en varios tipos de cáncer, esto sugiere una potencial relación entre la dinámica mitocondrial y la metástasis (Gabay *et al.*, 2014). Asimismo, la dinámica de fisión/fusión, que determina la forma mitocondrial, influye en la susceptibilidad a la apoptosis resultado de la pérdida de la interacción de Bax con las membranas mitocondriales debido a la fragmentación mitocondrial. Esto sumado al desbalance que se presenta entre los factores apoptóticos y anti-apoptóticos, demuestran la habilidad de la célula tumoral para evadir el proceso de muerte celular y la importancia de la mitocondria en la respuesta del tumor al tratamiento por quimioterapia (Fulda, 2016; Hartung, 2015).

En este sentido, se ha establecido que la célula tumoral experimenta una reprogramación metabólica mediada por la mitocondria, donde intervienen importantes vías de señalización como PI3K/AKT la cual activa la glucólisis y promueve el flujo de carbonos de glucosa a vías biosintéticas en la mitocondria; además permite la activación de la ATP citrato liasa, evitando así la acumulación citosólica de citrato (inhibidor alostérico de la glucólisis). Asimismo, la activación del sensor de crecimiento celular mTORC1 tiene variados efectos sobre el

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

metabolismo de la mitocondria, reorientando el uso de los intermediarios del CAT para generar precursores de aminoácidos como glutamato, prolina, glutamina y arginina. También estimula la lipogénesis, un proceso crítico para la proliferación celular, el cual depende de la producción de citrato mitocondrial (Vyas *et al.*, 2015; Weinberg & Chandel, 2015; Hartung, 2015).

Por otro lado, mutaciones en el ADN mitocondrial se han relacionado con defectos en la CTE que contribuye a la tumorigénesis por aumento en las ERO (Vyas *et al.*, 2015). Muchas proteínas involucradas en la glucólisis, transporte electrónico mitocondrial, β -oxidación y el CAT pueden generar superóxido, peróxido de hidrogeno y otras ERO. Esas incluyen el complejo I, II, III, dihidroorotato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, aconitasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa y otras proteínas mitocondriales como monoamino oxidasas (Sabharwal & Schumacker, 2014). En la CTE los complejos I y III han sido los más estudiados, y se ha establecido que en el complejo I la producción de superóxido puede ocurrir en dos sitios, mediante el grupo prostético mononucleótido de flavina (FMN) y el cluster hierro-azufre. Mientras que, el peróxido de hidrógeno podría ser directamente formado en el FMN. En el complejo III el superóxido es producido en la semiquinona (Q_0), en el complejo IV la alta afinidad de enlace por el O_2 asegura la formación de H_2O e impide la formación de ERO. Finalmente, el complejo V no participa de la CTE y directamente no contribuye a la formación de ERO. Sin embargo, perturbaciones en la actividad de este complejo, genera cambios en el potencial de membrana que pueden afectar la generación de ERO a partir de la CTE (Okon & Zou, 2015). Cuando la producción de ERO excede la capacidad antioxidante de la célula o cuando se altera el sistema o está menos activo, el incremento en los niveles de ERO puede inducir daño por estrés oxidativo. Inicialmente, el radical superóxido en presencia de peróxido de hidrógeno genera radicales hidroxilo (reacción de Fenton) muy reactivos que pueden dañar todos

los componentes de la célula, lípidos, proteínas y ADN (Dan Dunn *et al.*, 2015; Liemburg *et al.*, 2015;).

4.1.2 Potenciales dianas farmacológicas mitocondriales para la terapia del cáncer

Los productos de los mismos genes cuyas mutaciones pueden promover transformaciones malignas son también los nuevos objetivos emergentes para el desarrollo de agentes anticáncer. La variabilidad genética que existe en el nivel de expresión de muchos genes y mutaciones incluso entre pacientes con el mismo tumor, plantea la dificultad de suprimir el cáncer dirigiendo la terapia a un solo gen o una sola vía que puede ser alterada entre pacientes. Por ello, es imperativo buscar un objetivo que sea invariante y cuya exploración pueda representar una estrategia para el tratamiento eficiente a través del paisaje de patologías neoplásicas, un objetivo tal lo representan las mitocondrias que sean funcionales en todos los tipos de cáncer, además de su importancia al desencadenar apoptosis y su participación en el metabolismo aberrante en las células malignas (Neuzil *et al.*, 2013; Dong & Neuzil, 2014; Olszewska & Szewczyk, 2013).

La mitocondria como blanco para el tratamiento de tumores, puede permitir un futuro avance en el manejo de enfermedades malignas. En este sentido se han establecido importantes blancos para el tratamiento, como:

- La **hexoquinasa** una importante enzima glucolítica y citosólica, responsable de la fosforilación de la glucosa; su actividad enzimática aumentada se ha relacionado con el crecimiento de los carcinomas y limitación de la respiración mitocondrial, debido a la disminución de fosfato disponible que impide obtener tasas máximas para la respiración en el estado 3 (Neuzyl *et al.*, 2013).

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

- La familia **Bcl-2** está conformada por proteínas apoptóticas y antiapoptóticas que, en las células neoplásicas, interactúan mediante sus dominios BH₃ evitando que las proteínas Bak y/o Bax formen los canales que permiten la salida del Citocromo c (Bhat *et al.*, 2015).
- Inhibidores redox tiol. El aumento en las ERO y la evidente disminución en la capacidad antioxidante en las células cancerosas, las diferencia de las células normales y las hace más vulnerables a fármacos que generan estrés oxidativo. Además, aquellos compuestos que oxidan el grupo tiol o agotan el glutatión (GSH) pueden causar apoptosis, al afectar la mayor defensa antioxidante en las células tumorales (Fulda, 2016).
- La cadena de transporte de electrones (CTE) es otro blanco prometedor en la terapia del cáncer. En este sentido, se han planteado dos mecanismos opuestos que permitirían inducir muerte celular en células cancerígenas. Un mecanismo se enfoca en activar la CTE e inducir apoptosis por aumento de ERO y el otro enfoque se dirige a inhibir la actividad de la CTE con inhibición de la vía glucolítica, para generar crisis energética global, permitiendo la inducción de muerte celular en células tumorales de proliferación rápida (Wen *et al.*, 2013).
- Membrana interna mitocondrial. El alto potencial de membrana que presentan las células tumorales debido a la bioenergética mitocondrial alterada; hace de los cationes lipofílicos que atacan la membrana interna, potenciales fármacos que podrían presentar mayor selectividad por las células tumorales. (Fantin & Leder, 2006).
- El ciclo de los ácidos carboxílicos (CAT) no sólo constituye la fuente de electrones para la CTE además, sus intermediarios son esenciales para la síntesis de macromoléculas.

Fármacos que afecten etapas del CAT podrían afectar el balance energético e inhibir la proliferación tumoral (Olszewska & Szewczyk, 2013).

- El ADN mitocondrial se ha convertido en un importante blanco terapéutico. Diversos fármacos se han diseñado para afectar la función y estabilidad de esta macromolécula, igual que la función de proteínas encargadas de la síntesis de complejos mitocondriales (Dong & Neuzil, 2014 ; Weinber & Chandel, 2014)

Muchos de los agentes con actividad anticáncer que actúan sobre las mitocondrias, encierran una promesa de convertirse en drogas anticáncer, con base a su selectividad por las células cancerosas. Incluso, los potenciales fármacos pueden afectar directamente la mitocondria o tener como blanco cualquier otra locación celular y su interacción con la mitocondria puede ser secundaria. En cualquier caso, la identificación de la mitocondria como el blanco primario o secundario de los compuestos citotóxicos puede facilitar el descubrimiento del mecanismo de acción y de esa manera abrir nuevas perspectivas de su aplicación y de los efectos secundarios que puede tener (Szewczyk & Wojtczak, 2002).

4.2 Materiales y métodos

De acuerdo a los datos obtenidos en el capítulo 1, fueron escogidas dos parejas de compuestos con relación estructural y efecto citotóxico significativo, para determinar su efecto sobre el consumo de oxígeno en hepatocitos y su relación con la formación de especies reactivas de oxígeno. Los métodos usados se describen a continuación:

4.2.1 Células

Fueron usadas células de hepatocarcinoma humano HepG2, cultivadas en medio DMEM de alta glucosa, con 10% de suero bovino fetal (SBF). Los repiques de cada línea celular se realizaron usando una solución de tripsina-EDTA. Las células normales usadas, fueron hepatocitos de feto de rata de acuerdo al procedimiento descrito por Shen et al., 2012.

4.2.2 Determinación de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por el método del MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5- difenil tetrazolio) de acuerdo a lo descrito por Mossman (1983). Se usaron 7.5×10^3 células en placas de 96 pozos, incubadas a 37°C con 5% de atmosfera de CO₂ durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente, se adicionaron soluciones de 5, 25, 50 y 100 µM de cada compuesto (3k, 3e, 3j, 3a) y se incubaron por 12, 24 y 48 horas. Al cabo de este tiempo, fue adicionado 200 µL de MTT (500µg.mL⁻¹ en HBSS) y las células fueron incubadas por 3 horas. Posteriormente, los cristales formados fueron solubilizados en 200 µL de DMSO y se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm, mediante un lector de microplaca.

4.2.3 Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos de rata

“El aislamiento y el cultivo primario de hepatocitos de rata adulta se realizó de acuerdo con el protocolo de Shen y colaboradores (Shen y col., 2012). El aislamiento de hepatocitos se realizó mediante la perfusión del hígado de rata Wistar macho (aproximadamente 200 g de peso), anestesiado con ketamina (87 mg/kg) vía intraperitoneal para realizar el procedimiento quirúrgico. La perfusión se realizó por la infusión *in situ* de solución tampón I estéril (solución salina HBBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, MgCl₂ 0.9 mM, EDTA 0.5 mM y HEPES 25 mM a 37°C) a

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

través de la vena porta hepática. Luego que el hígado empezó a tomar una coloración más clara, se realizó un corte en la vena cava inferior para permitir el flujo de salida, de tal forma que los lóbulos del hígado empezaran a hincharse y el tejido tomara una apariencia pálida. Posteriormente se cambió la solución de perfusión agregando sin interrupción la solución tampón II estéril (solución salina HBBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} , HEPES 25 mM a 37°C) con colagenasa (1 mg/mL). Durante este proceso, se aplicó presión periódica con una torunda sobre la vena cava inferior, completando el tiempo de digestión y conduciendo a un aumento en la disociación celular hepática. Después de perfundir con la colagenasa, el hígado tomó una textura blanda, fue diseccionado y dispuesto en medio de cultivo M199 estéril (suplementado con glutamina 1 mM, NaHCO_3 14 mM, SBF 10%, albúmina bovina sérica 0.2%, HEPES 10 mM, penicilina 120 $\mu\text{g/mL}$ y estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$).

Manteniendo el hígado sumergido en medio M199, las células se desprendieron suavemente con ayuda de un peine fino y esta dispersión se filtró a través de una malla de 100 μm (tamaño de poro) para remover el tejido conectivo y los fragmentos de tejido sin digerir. Las células filtradas se resuspendieron en 40 mL de medio M199 y se centrifugaron a 50xg por tres minutos a 4°C para retirar el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces con el objetivo de lavar las células. A continuación, las células suspendidas en medio M199 se centrifugaron a 200xg por diez minutos a 4°C de manera que se separaran las células muertas (sobrenadante) de las células viables (sedimentadas en el fondo del tubo). Finalmente, el *pellet* de células se resuspendió en medio de cultivo M199 y se determinó la viabilidad celular por tinción con azul de tripán 0,4% (p/v) contando en cámara de *Neubauer* (90 μL de suspensión celular más 10 μL de azul de tripán).

Nota: los animales usados para este procedimiento correspondieron a ratas Wistar machos suministradas y manipuladas por el bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, bajo las disposiciones de la ley 84 de 1989 (Cap. IV, Art. 23-26) y la resolución 8430 de 1993 (Título IV, artículos 83-93) que regulan la investigación con animales en Colombia” (Alvarez, 2016).

4.2.4 Determinación de la viabilidad de los hepatocitos

“Los hepatocitos aislados (con viabilidad $> 60\%$) se cultivaron en cajas de Petri de vidrio de 6 cm (1×10^6 células/caja) en medio de cultivo M199 y se incubaron a 37°C con atmósfera de CO_2 (5%) durante tres horas para total adherencia. Posteriormente, los hepatocitos se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol FM48, FM49 y FM52 (5, 25, 50 y $100 \mu\text{M}$) disueltos en medio de cultivo *Hepatozyme-SFM* (suplementado con estreptomicina $100 \mu\text{g/mL}$) y DMSO 0,1%. Como control negativo se emplearon células, sin adición de droga o compuesto alguno, cultivadas en medio *Hepatozyme-SFM*.

Después de 24 horas de tratamiento, las células se soltaron usando solución de tripsina-EDTA (pH 7,3) y se resuspendieron en medio de cultivo M199 con SFB al 10% para inactivar la tripsina. La viabilidad de los hepatocitos se determinó por tinción con azul de tripán 0,4% (p/v) contando en cámara de *Neubauer* ($90 \mu\text{L}$ de suspensión celular más $10 \mu\text{L}$ de azul de tripán).

Nota: de acuerdo con los principios establecidos en las normas de Buenas Prácticas Clínicas (BPC) publicadas por el INVIMA y la Resolución 2378 de 2008, estos ensayos se desarrollaron como parte de un estudio no clínico en el que se realizaron ensayos dosis-respuesta en células cultivadas *in vitro* siguiendo las orientaciones del numeral 7.3.5 de las normas BPC.

Adicionalmente, esta investigación se considera de no riesgo de acuerdo con los artículos 10 y 11 de la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de la República de Colombia” (Alvarez, 2016).

4.2.5 Análisis morfológico

Células HepG2 (8×10^4 células/pozo) fueron sembradas en placas de 24 pozos e incubadas con atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C por 24 h. Después de la adhesión, las células fueron tratadas con la concentración 25 µM de los compuestos 3k, 3e, 3J y 3a durante 24 h. Posterior al tiempo de tratamiento, las células fueron fijadas con etanol por 5 minutos a temperatura ambiente y teñidas con hematoxilina y eosina. Los cambios morfológicos fueron examinados a través de un microscopio invertido y las imágenes se adquirieron con una cámara Nikon digital Sight DS-U2.

4.2.6 Determinación del consumo de oxígeno en células HepG2

Células HepG2 ($1,0 \times 10^6$) fueron tratadas con los compuestos 3k, 3e, 3j y 3a, con las concentraciones de 5 y 25 µM durante 24 horas. A continuación, las células fueron aisladas con 1 mL de tripsina, resuspendidas en medio de cultivo DMEM y el consumo de oxígeno determinado mediante un equipo Oxygraph-2k (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria) dotado con dos cámaras de oxígeno a 37°C bajo agitación constante. El factor de solubilidad de oxígeno fue de 0,89 para el DMEM y la presión barométrica local fue de (91 Kpa), la concentración de saturación de oxígeno fue 172,42 µM. El consumo de oxígeno fue determinado en tres estados, denominados: basal, respiración en ausencia de inhibidores y/o desacopladores; leak, respiración en presencia de oligomicina (2 µg/mL); y desacoplado, el consumo de oxígeno en presencia del desacoplador FCCP (0,5 µM). El flujo de oxígeno en los estados descritos anteriormente, fue corregido con el descuento de la respiración no mitocondrial, que fue obtenida con la adición de rotenona (0,5 µM) y antimicina (3 µg/mL). Los

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

resultados fueron expresados como el flujo de oxígeno por número de células (pmol/(seg * 1×10^6 células)) como media $\pm$ DS.

4.2.7 Determinación de ERO

La medida intracelular de especies reactivas de oxígeno se realizó por el método de 2',7'-diclorofluoresceína DCFH₂-DA. Las células HepG2 fueron depositadas (veinte mil células por pozo) en una placa oscura de 96 pozos durante 24 horas, hasta adherencia total. Posteriormente, las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) dos veces e incubadas por treinta minutos con una solución de DCFH₂-DA 50 μ M diluido en PBS. A continuación, las células fueron lavadas nuevamente con PBS y se realizó el tratamiento con los compuestos 3k, 3e, 3J y 3a (25 μ M), se usó como control positivo peróxido de hidrógeno 400 μ M. Enseguida se midió la fluorescencia, a 485 longitud de excitación y 525 longitud de emisión, usando un lector Varioskan Flash.

4.2.8 Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados en triplicado en tres ensayos independientes, y los valores obtenidos fueron analizados y expresados como la media $\pm$ desviación estándar (DS). El análisis estadístico fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de un test de tukey.

4.3 Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos de citotoxicidad en HepG2 y hepatocitos, análisis morfológico, consumo de oxígeno en células HepG2 y generación de ERO de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a:

4.3.1 Determinación de la viabilidad de células HepG2

La figura 30 presenta el efecto citotóxico sobre la línea tumoral HepG2 y las estructuras químicas de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a. Estos compuestos afectan la viabilidad de las células HepG2 de manera efectiva después de 48 horas de tratamiento, como lo muestra la figura 30. Igualmente, es posible observar que los compuestos 3j $CC_{50} = 5,2 \pm 1,9$ y el compuesto homólogo 3a $CC_{50} = 6,8 \pm 0,71$, de actividad citotóxica comparable, fueron más citotóxicos que los híbridos 3e ($CC_{50} = 10,9 \pm 4,5$) y 3k ($CC_{50} = 27,6 \pm 1,6$).

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

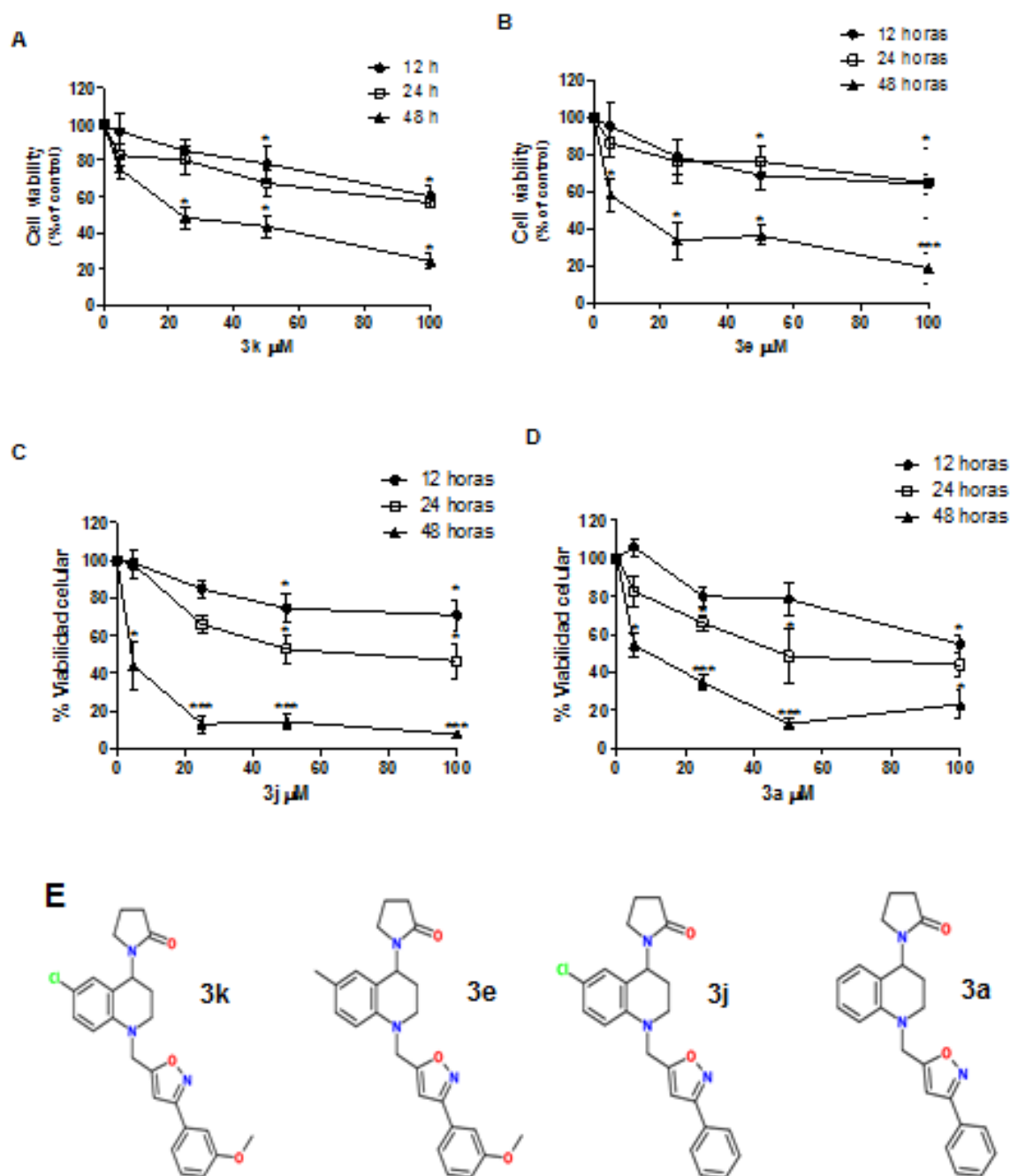


Figura 30. Efecto de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a sobre la viabilidad celular de células HepG2 después de 12, 24 y 48 h de tratamiento. A) Híbrido 3k. B) Híbrido 3e. C) Compuesto 3j. D) Compuesto 3a. E) Estructuras químicas de los híbridos 3k, 3e, 3j y 3a. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de células viables en comparación con el control (los datos presentan mínimo dos experimentos independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.3.2 Efecto sobre la morfología de HepG2

El efecto citotóxico de los compuestos híbridos se evidencia en los cambios que genera en la morfología de las células HepG2. La figura 31A permite observar la morfología típica de las células analizadas y en la figura 31 (B, C, D y E) se presentan los cambios morfológicos generados por el efecto de los compuestos híbridos, relacionados con disminución en la confluencia celular, pérdida del contacto con las células vecinas, desestabilización de la membrana plasmática, disminución de volumen y pérdida de la forma característica de las células HepG2.

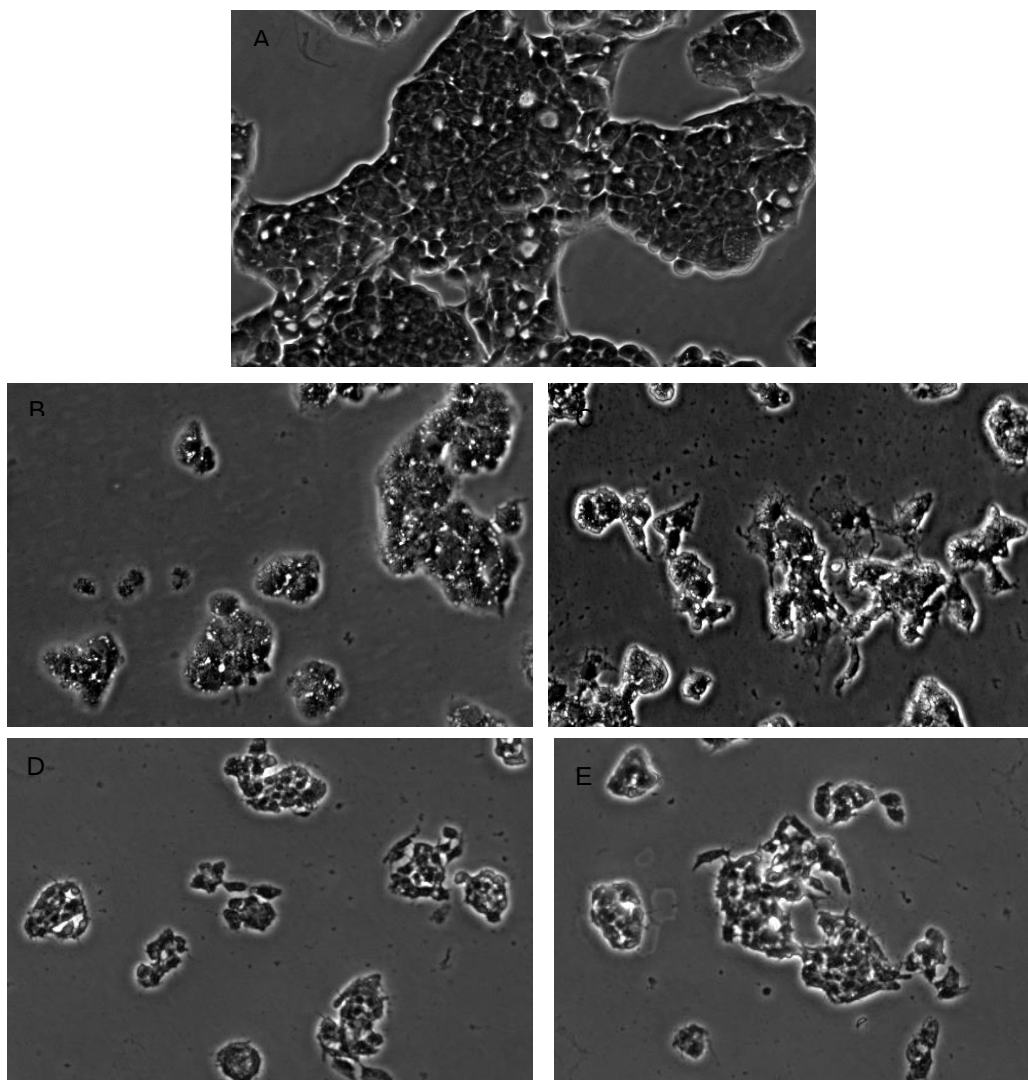


Figura 31. Análisis morfológico del efecto de los híbridos 3k, 3e, 3j y 3a (25 μ M) en células HepG2 por 24 horas de tratamiento. Las imágenes fueron examinadas a través de un microscopio invertido con un objetivo de 40x y las imágenes se adquirieron con una cámara Nikon digital Sight DS-U2. A) Control HepG2, B) híbrido 3k, C) compuesto 3e, D) híbrido 3j, E) compuesto 3a.

4.3.3 Efecto sobre la viabilidad de hepatocitos de rata

La selectividad de los compuestos antitumorales emergentes es una de las características más importantes de los potenciales fármacos. En este sentido, la figura 32 presenta la actividad citotóxica de los compuestos híbridos en células de hepatocarcinoma y en hepatocitos de rata.

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Los resultados permiten inferir que los compuestos híbridos 3k, 3e y 3a no generan efecto citotóxico sobre las células normales a 24 horas de tratamiento. Por su parte, el compuesto 3j muestra efecto citotóxico estadísticamente significativo en concentraciones mayores de 50 μM , esto sugiere que el compuesto usado a bajas concentraciones no presentaría daño a células normales. Los resultados presentados muestran la importancia de indagar sobre el mecanismo que genera su actividad citotóxica y abre posibilidades interesantes relacionadas con su uso farmacológico.

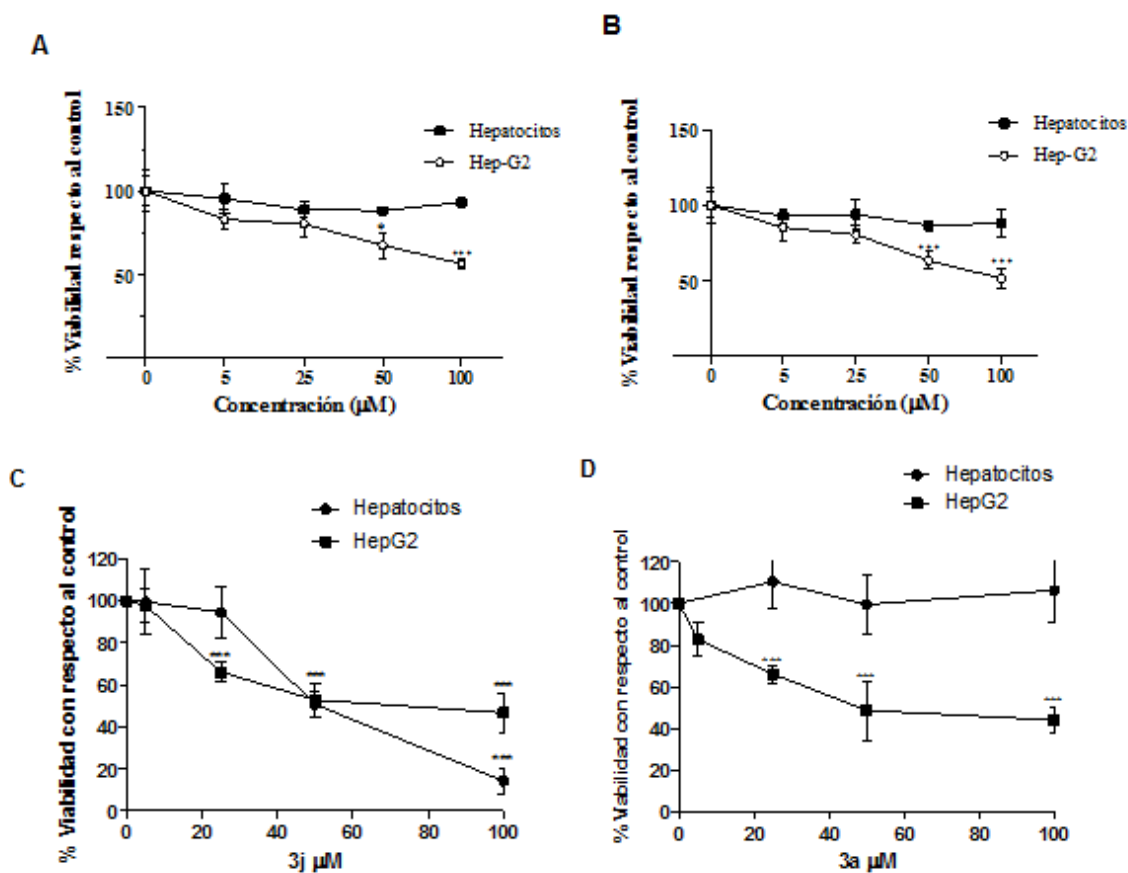


Figura 32. Efecto de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a sobre la viabilidad celular de hepatocitos y células HepG2, después de 24 h de tratamiento. A) Compuesto 3k. B) Híbrido 3e. C) Compuesto 3j. D) Híbrido 3a. Los valores representan la media $\pm$ DS del porcentaje de células viables en comparación con el control (los datos presentan mínimo dos experimentos).

independientes, cada uno por triplicado). Diferencias significativas *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$. Las figuras fueron tomadas de Alvarez, 2016.

4.3.4 Determinación del consumo de oxígeno en células HepG2

Con el objetivo de comprender la actividad citotóxica observada, se consideró la importancia de establecer el efecto de los híbridos evaluados sobre las funciones metabólicas de las células HepG2. En este sentido, las células HepG2 fueron tratadas con las concentraciones de 5 y 25 μM durante 24 horas de exposición a los compuestos (3k, 3e, 3j, 3a) y fue evaluado el consumo de oxígeno en los estados de respiración: basal, leak, desacoplado e inhibido. Los resultados obtenidos muestran que los compuestos evaluados presentan efecto significativo sobre el consumo de oxígeno, en la concentración de 25 μM (figura 33). Además, el compuesto 3j presenta mayor efecto inhibitorio sobre el consumo de oxígeno en todos los estados analizados, así ~74,3% en el estado basal y ~52,6% en leak para la concentración de 25 μM y en el estado desacoplado de ~54,1% y ~81,2% para las concentraciones de 5 y 25 μM , respectivamente (Figura 33). Por su parte, los compuestos 3k y 3a inhiben el estado basal en ~73,1% y ~54,3%, respectivamente. Finalmente, los tres compuestos afectan el estado desacoplado en ~68,8% (3k), 47,4% (3e) y 63,5% (3a).

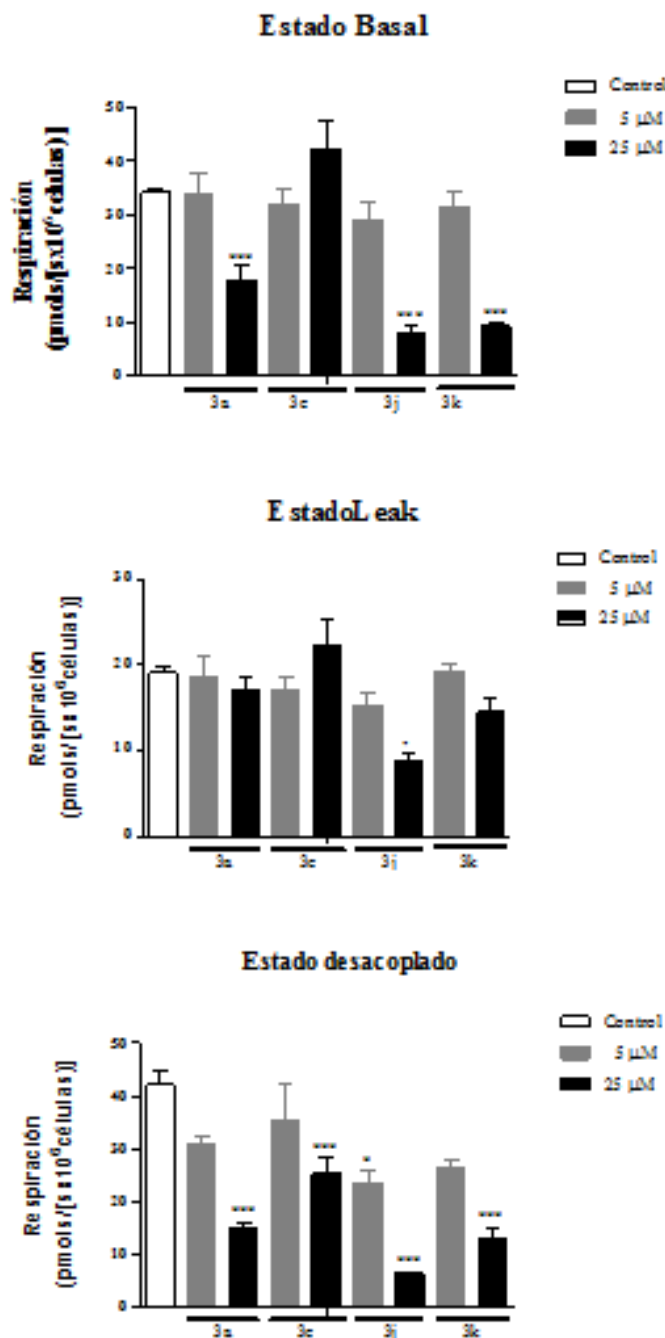


Figura 33. Efecto de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a sobre el consumo de oxígeno en células HepG2 (1×10^6) fueron evaluadas mediante un equipo Oroboros 2-K oxygraph chambers, y el consumo de oxígeno fue evaluado en ausencia de inhibidores y desacopladores (basal), en presencia de oligomicina (leak) y en presencia de FCCP (desacoplado). Los valores representan la media $\pm$ DS de tres experimentos independientes. * y *** representan los valores que presentan diferencias significativas con respecto al control a $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente.

4.3.5 Determinación de ERO

Las alteraciones en el consumo de oxígeno, pueden generar aumento en las ERO que podrían explicar el efecto citotóxico y abrir perspectivas de aplicación de los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a. La figura 34 contiene los resultados obtenidos con el ensayo de DCFH-DA, donde es posible evaluar la generación de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Los resultados muestran que el compuesto 3k no presenta aumento significativo de las ERO en los hepatocitos, mientras que el compuesto 3e presenta un considerable aumento (>300% con respecto al control), superior a los resultados obtenidos con H_2O_2 tomado como control positivo del ensayo. Por su parte, los compuestos híbridos 3j y 3a generan aumento estadísticamente significativo en las ERO en las células HepG2. Es de resaltar que el compuesto 3a desencadena un considerable aumento de ~280% con respecto al control, resultado comparable con aquel obtenido para el H_2O_2 tomado como control positivo del ensayo. Igualmente, es posible observar que los compuestos híbridos que no contienen cloro en la posición 6 de la THQ presentan mayor generación de ERO.

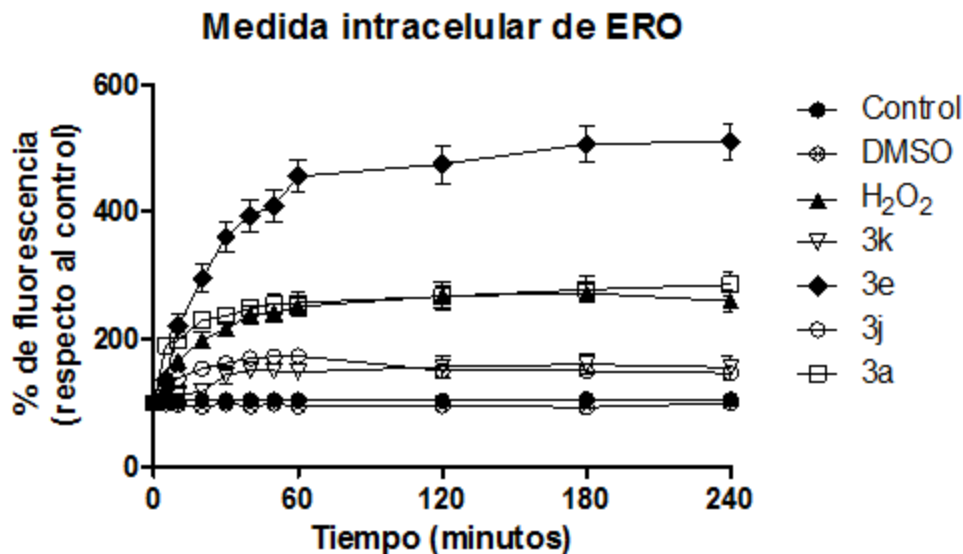


Figura 34. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) después del tratamiento con los compuestos híbridos 3k, 3e, 3j y 3a (25 μ M). Las células HepG2 fueron pre-tratadas con DCFH-DA disuelto en PBS, tratadas con los compuestos híbridos y la lectura de la fluorescencia se realizó durante 240 minutos. Los experimentos representan la media $\pm$ DS del triplicado de tres experimentos independientes. El compuesto 3e, 3j, 3a y el H₂O₂ presentan diferencias significativas con respecto al control $p < 0,05$.

4.4 Discusión

Los isozaxoles y las tetrahydroquinolinas (THQ) son compuestos heterociclos cuyos derivados han presentado diversas propiedades farmacológicas como anti-inflamatorios, antibacteriales, antifúngicos, anticonvulsivos, antivirales, analgésicos, antioxidantes, antituberculosis, antitumorales, antidepresivos y antitumorales (Hou *et al.*, 2013; Reddy *et al.*, 2013; Rudenko *et al.*, 2014; Darwish, 2014; Diana *et al.*, 2014). Con el objetivo de potenciar sus propiedades farmacológicas fueron sintetizados compuestos híbridos de THQ-isozaxoles y su actividad antitumoral fue evaluada en cuatro líneas tumorales y una línea normal. Los resultados obtenidos permitieron escoger cuatro compuestos con relación estructural, que presentaron actividad citotóxica apreciable en células de hepatocarcinoma (HepG2). A continuación se presenta la

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

discusión de los resultados obtenidos, teniendo en cuenta la relación estructural que presentan los compuestos híbridos analizados:

4.4.1 Compuestos híbridos 3k Y 3e

La figura 30E nos permite observar las estructuras químicas de los compuestos 3k y 3e que corresponden a homólogos estructurales que sólo difieren en el sustituyente de la THQ. Igualmente, es posible observar que el compuesto 3e ($CC_{50} = 10,9 \pm 4,5$) presenta mayor efecto citotóxico que su homólogo 3k ($CC_{50} = 27,6 \pm 1,6$), lo cual confirma la influencia del sustituyente de la THQ y muestra que el metilo como donador de densidad electrónica, genera mayor efecto citotóxico que el cloro de naturaleza química opuesta.

El ensayo de MTT (Figura 30) y el análisis morfológico (Figura 31) confirmaron el efecto citotóxico de los híbridos 3k y 3e en las células HepG2; y el análisis en hepatocitos mostró que los compuestos no presentan efecto citotóxico en estas células, después de 24 h de tratamiento (Figura 32). La selectividad de los híbridos pone de manifiesto el potencial quimioterapéutico de estos compuestos, conociendo que el balance entre los efectos terapéutico y toxicológico de un compuesto candidato determina su aplicación farmacéutica (Cavalcanti *et al.*, 2012).

La figura 33 mostró que el híbrido 3k inhibe el estado basal y el estado desacoplado, lo cual indica que ese compuesto altera la CTE, resultado que es consistente con los análisis realizados en mitocondrias aisladas de hígado de rata realizados en el grupo de investigación, donde el compuesto 3k exhibe una inhibición del estado 3 en ~20% en presencia de los dos sustratos oxidables glutamato y succinato, además de inhibición de ~20% en la actividad de la NADH oxidasa y de ~40% en la NADH citocromo c reductasa (Alvarez, 2016). Estos resultados se correlacionan con una clara inhibición en el transporte de electrones.

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Por su parte el compuesto 3e (25 μM), no presenta un aumento significativo en la respiración del estado basal, ni en el estado leak de la respiración de células HepG2, pero si una disminución significativa en el estado desacoplado. Sin embargo, en los análisis realizados en mitocondrias aisladas de hígado de rata, este compuesto genera un aumento en $\sim 20\%$ en el estado 3 (con glutamato como sustrato) y de ~ 30 y 50% en el estado 4, para las concentraciones de 5 y 25 μM , respectivamente (Alvarez, 2016). Estos resultados sugieren que el compuesto 3e inhibe el transporte de electrones en el estado desacoplado de las células cancerígenas, pero también estimula a la mitocondria de células normales para que respire más rápido, sugiriendo que el compuesto híbrido 3e podría corresponder a un inhibidor-desacoplador de la síntesis de ATP. Este comportamiento permitiría explicar su actividad citotóxica, tal como lo evidencian diversos estudios de agentes desacoplantes con actividad antitumoral (Vidau *et al.*, 2011; Pardo-Andreu *et al.*, 2011). Ahora bien, las diferencias en los resultados obtenidos en los dos modelos experimentales, pueden ser producto de la disponibilidad del compuesto en los hepatocitos que podría dificultar el acceso del compuesto a las mitocondrias, y por ende la obtención de efectos significativos en los parámetros de respiración mitocondrial (estados basal y leak).

Como una aproximación para conocer el mecanismo de acción de los híbridos, se estableció si los compuestos aumentaban las ERO. La figura 35 mostró, mediante el ensayo de DCFH-DA, que el híbrido 3e generó un enorme aumento ($>300\%$) en la generación de ERO, con respecto al control. Este resultado podría ser consecuencia de la disminución en el estado desacoplado, el aumento en el consumo de oxígeno en los estados 3 y 4, y en $\sim 25\%$ en la actividad del complejo I, mostrada por el compuesto 3e (Alvarez, 2016). Teniendo en cuenta que la CTE es el principal productor de estas especies reactivas, mediante los complejos I, II, III y ubisemiquinona

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

(Sabharwal & Schumacker, 2014). Por su parte, el híbrido 3k aunque altera la CTE, no generó diferencias significativas en la generación de ERO, con respecto al control.

Aunque los compuestos híbridos 3k y 3e son homólogos estructurales que se diferencian sólo en el sustituyente de la posición 6 de la THQ, presentan diferentes efectos citotóxicos sobre las células HepG2 y sobre la bioenergética mitocondrial, pero no afectan la viabilidad de hepatocitos de hígado de rata. Esto indica que el sustituyente metil en la THQ del compuesto 3e, podría generar un efecto inhibidor-desacoplador, que permite el aumento en las ERO y que genera el efecto citotóxico. Mecanismos similares al observado por el híbrido 3e se han reportado para compuestos quimioterapéuticos usados actualmente como el trióxido arsénico (TRISENOX) y la familia de productos naturales acetogeninas annonaceae (ACG), cuyo efecto citotóxico se ha relacionado con la alteración en el transporte de electrones en la mitocondria, generando el incremento en los niveles de ERO y la posterior muerte de las células tumorales (Fantin & Leder, 2006; Montero & Jassem, 2011).

En definitiva, el compuesto 3k afecta la CTE por inhibición del complejo III y el híbrido 3e podría ejercer un efecto dual de inhibidor-desacoplador al inhibir el complejo III y activar el complejo I. Estos resultados sugieren que los compuestos híbridos 3k y 3e podrían ser usados en terapias conjuntas con inhibidores de glucólisis o inhibidores de importantes cascadas de señalización como AKT/PI3K; y así generar efectos a nivel energético y/o biosintético que permitan eliminar y/o inhibir la proliferación de las células tumorales. Tal como lo muestran los resultados publicados en varios estudios recientes, las células cancerosas parece ser más susceptibles a los tratamientos combinados y a su vez, éstos podrían ser una alternativa en los casos cada vez más comunes de resistencia a la quimioterapia y a la terapia dirigida (Jakub *et al.*, 2013; Joña *et al.*, 2013).

4.4.2 Compuestos híbridos 3j Y 3a

Los compuestos híbridos 3j y 3a corresponden a homólogos estructurales que comparten el sustituyente fenil en la posición 3 del isoxazol y sólo difieren en un sustituyente cloro en la posición 6 de la THQ. El ensayo de MTT mostró que los compuestos presentan actividad citotóxica comparable, el compuesto 3j $CC_{50} = 5,2 \pm 1,9$ y el compuesto homólogo 3a $CC_{50} = 6,8 \pm 0,71$ (Figura 30C y 30D). En cuanto a su toxicidad no es posible establecer diferencias significativas que puedan relacionarse con sus diferencias estructurales. Sin embargo, al avanzar en este documento será posible establecer si hay diferencias en sus efectos en células hepáticas normales, bioenergética mitocondrial y la formación de ERO.

Los bajos valores de las CC_{50} obtenidas para los híbridos 3j y 3a y el evidente efecto de los compuestos sobre la morfología celular (Figura 31C y 31D) demuestran el efecto citotóxico de los compuestos. Sin embargo, uno de los criterios más importantes en una droga para el cáncer es que no genere o genere pocos efectos secundarios en las células normales de los pacientes sometidos a quimioterapia. En este sentido, la figura 32 mostró que el compuesto 3a es selectivo en todas las concentraciones evaluadas y el híbrido 3j en concentraciones altas mayores de 50 μM .

Por su parte, la figura 33 mostró que el compuesto 3j presenta inhibición en ~74,3% en el estado basal y ~52,6% en leak para la concentración de 25 μM y en el estado desacoplado de ~54,1% y ~81,2% para las concentraciones de 5 y 25 μM , respectivamente (Figura 33). Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos con mitocondria aislada de hígado de rata (realizados en el grupo de investigación), donde el compuesto híbrido 3j genera inhibición del consumo de oxígeno en el estado 3 para las concentraciones de 5 y 25 μM de ~45 y 50% para

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

glutamato-malato y de ~25 y 50% para succinato; y en el estado 4, para la concentración de 25 μM de ~25% con el succinato como sustrato (Alvarez, 2016). Estos resultados pueden ser consecuencia de la inhibición de la NADH y succinato citocromo c reductasa en ~40 y 15% y de la ATP asa en ~10%, tal como lo mostró el análisis del efecto del compuesto sobre los complejos de la CTE (Alvarez, 2016). Además, de la despolarización de la membrana mitocondrial que genera el híbrido (ver capítulo 2).

Igualmente, el compuesto híbrido 3a presenta reducción en el consumo de oxígeno en los estados basal y desacoplado a la concentración de 25 μM . Estos resultados son consistentes con aquellos encontrados en los análisis realizados en mitocondria de hígado de rata donde se observó disminución en el consumo de oxígeno en el estado 3 para las concentraciones de 5 y 25 μM de ~50 y 54%, en presencia de glutamato-malato, y de 20 y 40% para succinato; y en el estado 4 para 5 y 25 μM de ~ 25%, usando succinato como sustrato. Probablemente, como resultado de la inhibición en la NADH citocromo c reductasa (~15%) que ejerce el híbrido (Alvarez, 2016).

Estos resultados sugieren que el compuesto híbrido 3j se comporta como un inhibidor de la CTE y consecuentemente de la síntesis de ATP. El efecto que presenta en el estado leak podría indicar que el compuesto tiene un efecto a nivel de membrana o de los complejos de la cadena respiratoria, alterando la conductancia de protones a través de ésta. Sin embargo, la respiración relacionada con el escape de protones depende de la fuerza proton-motriz. De modo que cambios en ésta, pueden generar alteración de la respiración en el estado leak sin cambiar la conductancia del protones de la membrana interna (Divakaruni *et al.*, 2014). Estos resultados confusos se pueden presentar cuando hay alteraciones en la respiración en el estado leak y en el estado desacoplado (como en el caso del presente estudio); lo cual plantea la necesidad de realizar

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

mediciones simultáneas de la respiración en el estado leak y del potencial de membrana, y analizar la diferencia en el consumo de oxígeno al mismo potencial (tratamiento y control), y así establecer si realmente hay alteración en la conducción de protones en la membrana interna o si la disminución en el consumo de oxígeno es producto del potencial de membrana alterado por el efecto inhibitorio en la CTE que genera el compuesto usado en el tratamiento (Divakaruni & Brand, 2011; Kiepert & Jastroch, 2014).

Los análisis realizados en mitocondrias aisladas de hígado de rata, para el efecto del híbrido 3a sobre las enzimas de la CTE, sólo mostraron efecto sobre el complejo III, y se ha establecido que los complejos I, II y III son los principales sitios de formación de ERO en la CTE. Sin embargo, existen más vías asociadas a la CTE, ciclo de Krebs y β -oxidación, donde puede generar radical superóxido y peróxido de hidrógeno. Enzimas como glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, NADH y succinato deshidrogenasa, dihidroorotato deshidrogenasa y la dihidrolipoamida deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa, contienen grupos prostéticos (Flavín adenina dinucleotido, flavín mononucleótido) como estaciones electrónicas que potencialmente podrían generar ERO (Quinian *et al.*, 2014). Otras enzimas como la aconitasa contiene un centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, que potencialmente podría generar ERO, pero también es inactivada por el radical superóxido (Garner, 1997). En este sentido, el evidente aumento en las ERO, como efecto del compuesto 3a podría ser resultado de la inactivación de una o más de las proteínas del CAT descritas anteriormente. Esto a su vez permitiría atribuir el efecto inhibitorio en la CTE a una disminución en los sustratos oxidables que van a participar del proceso de fosforilación oxidativa. Por su parte, la generación de ERO por parte del compuesto híbrido 3j podría ser atribuido a la inhibición en el paso de electrones

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

del complejo I al III, probablemente por acción del radical transitorio ubisemiquinona generador de radical superóxido (Sabharwal & Schumacker, 2014).

Los compuestos híbridos 3j y 3a son homólogos estructurales, que se diferencian sólo en un átomo de cloro como sustituyente de la THQ, presentan efectos citotóxicos comparables sobre las células HepG2, afectan la CTE, generan ERO y no afectan la viabilidad de hepatocitos de hígado de rata, en bajas concentraciones, para el caso del compuesto 3j y en todas las concentraciones evaluadas para el híbrido 3a. En este sentido, es posible notar que el sustituyente cloro en la posición 6 de la THQ genera un efecto inhibitor de la CTE, mientras que el sustituyente metil le aporta mayor capacidad para generar ERO y mayor selectividad con las células cancerígenas, aunque son características diferentes les permiten tener efectos citotóxicos comparables.

En este sentido, la alta selectividad que presenta el híbrido 3a por las células tumorales y altos niveles de ERO podrían constituir un elemento causativo y no una consecuencia del efecto sobre la CTE. La generación de ERO se ha relacionado con el inicio-progresión del cáncer, con la generación de resistencia al tratamiento en terapia dirigida, se ha reportado que agentes citotóxicos clásicos como las antraciclinas, doxorubicina y epirubicina modulan el balance REDOX en la célula, y se ha establecido que las células tumorales son susceptibles a tratamientos que generen estrés oxidativo porque presentan menor defensa antioxidante y niveles mayores de ERO, comparadas con las células normales (Montero & Jassem, 2011; Dunn *et al.*, 2015; Okon & zou, 2015; Fulda, 2016). Así, los altos niveles de ERO generados por la acción del compuesto 3a podrían constituir el mecanismo que altera la CTE y afecta selectivamente la viabilidad de las células tumorales HepG2.

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Ahora bien, el compuesto híbrido 3j es selectivo a bajas concentraciones y presenta un marcado efecto inhibitorio sobre la CTE, afecta el potencial de membrana y por ende la síntesis de ATP. Otros compuestos que se encuentran actualmente en estado preclínico han mostrado efectos similares a los encontrados con el híbrido 3j, la rodamina 123 (Rh123) ha sido asociada con efecto inhibitorio de la ATPasa, la actividad de la rodocianina (MKT-007) se ha relacionado con un efecto a nivel de membrana mitocondrial y el derivado F16 del piridinium se ha reconocido como inhibidor de la respiración mitocondrial (Fantin & Leder, 2006).

En este sentido, el efecto del compuesto 3j sobre la respiración mitocondrial es coherente con la tendencia actual, de orientar el tratamiento hacia inhibidores de la producción de ATP como una estrategia terapéutica viable contra el cáncer. Teniendo en cuenta que el centro de muchos tumores sólidos sobrevive con pocos nutrientes, glucosa y oxígeno. No obstante, la CTE es capaz de funcionar óptimamente en niveles tan bajos de oxígeno como 0,5%. Por lo tanto, los tumores mal perfundidos pueden ser eliminados con fármacos que bloqueen la producción de ATP mitocondrial (Bhal *et al.*, 2015). Asimismo, la inhibición de la producción de ATP mitocondrial se podría sinergizar con terapias que disminuyen la glucólisis, tales como inhibidores clínicamente utilizados de la vía de señalización PI₃K (Weinberg & Chandel, 2015; Hartung, 2015). Una consideración a tener en cuenta es que las células normales también usan ATP mitocondrial y esto limitaría el uso del fármaco; una alternativa al respecto es que las células cancerosas capturen selectivamente los inhibidores del ATP mitocondrial, en comparación con las células normales, o que el efecto sea selectivo a bajas concentraciones que presenten efecto citotóxico sobre las células tumorales, como en el caso de los resultados presentados en este estudio.

4.4.3 Compuestos híbridos 3k Y 3j

A continuación se presenta una discusión en términos de la estructura de los compuestos 3k y 3j basado en el análisis realizado anteriormente a los dos compuestos.

Los compuestos híbridos 3k y 3j son homólogos estructurales que comparten el sustituyente cloro en la posición 6 de la THQ y se diferencian en el sustituyente metoxifenil en la posición 3 del isoxazol. El ensayo de MTT mostró que el híbrido 3j ($CC_{50} = 5,2 \pm 1,9$) presenta mayor citotoxicidad que su homólogo 3k ($CC_{50} = 27,6 \pm 1,6$). Estos resultados muestran que el responsable del marcado efecto citotóxico es el sustituyente fenil del isoxazol.

Por su parte, en la figura 34 es posible observar un patrón de aumento de las ERO similar. Sin embargo, se observa un ligero crecimiento en la línea de tendencia del híbrido 3j en los primeros 60 minutos de monitoreo del ensayo, y que permitieron observar diferencias significativas en la generación de ERO con respecto al control. Lo cual indica que aunque los dos compuestos afectan la CTE (Figura 33), sólo el híbrido 3j aumenta las ERO de forma significativa.

En este sentido, el compuesto híbrido 3k afecta la CTE en los estados basal y desacoplado de células HepG2 (Figura 33) e inhibe el estado 3 en mitocondrias aisladas de hígado de rata (Alvarez, 2016). Por su parte, el compuesto 3j afecta todos los estados de respiración en células HepG2 y los estados 3 y 4 en mitocondrias aisladas. De acuerdo al análisis de las enzimas de la CTE, el híbrido 3k afecta la NADH oxidasa y el complejo III; mientras que el compuesto 3j afecta el complejo III, la ATPasa (Alvarez, 2016) y el potencial de membrana (ver capítulo 2 (compuesto 3j en células HepG2)). Estos resultados indican que los dos compuestos afectan la CTE y como consecuencia la síntesis de ATP. Pero, el híbrido 3j además de afectar el flujo de electrones y el potencial de membrana mitocondrial, afecta de forma directa la formación de

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

ATP, al inhibir la ATPasa. Esto muestra que el sustituyente fenil del isoxazol es el responsable de la disminución efectiva de los niveles de ATP, lo que podría generar una crisis energética en la célula y explicar el marcado efecto citotóxico. Estas observaciones también permiten explicar que el híbrido 3k sea más selectivo que su homólogo 3j, teniendo en cuenta que tal como se ha reportado en la literatura, los compuestos que afectan la CTE emergen como una alternativa en el desarrollo de nuevas terapias, pero también representan un reto en términos de selectividad por las células tumorales, teniendo en cuenta que las células normales generan el ATP que requieren a través de la CTE y podrían verse muy afectadas por el potencial fármaco (Wen *et al.*, 2013; Olszewka & Szewczyk, 2013).

4.5 Conclusiones

- Los compuestos híbridos de THQ-isoxazoles, 3k, 3e, 3j y 3a, presentan efecto citotóxico sobre las células de hepatoma (HepG2) a través de distintos mecanismos de acción antitumoral.
- Los homólogos estructurales 3j y 3a presentan mayores efectos citotóxicos sobre las células HepG2, mientras que los homólogos 3k y 3e presentan mayor selectividad por las células tumorales.
- Los compuestos híbridos homólogos que comparten como sustituyente del isoxazol en la posición 3 el metoxifenil, presentan mayor efecto citotóxico con un sustituyente donador de densidad electrónica como el metil en la posición 6 de la THQ. Sin embargo, cuando los híbridos homólogos comparten el sustituyente cloro en la THQ, presentan mayor efecto citotóxico comparado con el primer caso, con un sustituyente del isoxazol, menos

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

voluminoso, como el fenil. En definitiva, la característica estructural que determina el efecto citotóxico en las células HepG2 es el sustituyente del isoxazol.

- El homólogo estructural 3k inhibe la transferencia mitocondrial de electrones sin producción significativa de ERO; mientras que su homólogo 3e se comporta como un inhibidor-desacoplador que genera altos niveles de ERO, probablemente responsables de su efecto citotóxico.
- El homólogo estructural 3j podría inducir muerte celular por medio de su acción inhibitoria en la CTE y en la síntesis de ATP, mientras que el híbrido 3a aumenta las ERO que podrían indirectamente afectar la CTE. Estas diferencias en los mecanismos de acción antitumoral explicarían las diferencias en selectividad en los homólogos 3j y 3a. Teniendo en cuenta que las células normales generan ATP de preferencia mitocondrial, pero mantienen su defensa antioxidante intacta.

4. Recomendaciones

- Realizar ensayos específicos de apoptosis, necroptosis y autofagia que permitan confirmar el mecanismo de muerte celular inducido por el compuesto híbrido 3j en células cancerígenas HepG2 y A549.
- Evaluar marcadores específicos de apoptosis que permitan confirmar el mecanismo de muerte inducido por el compuesto 3c en las células HeLa; y evaluar la viabilidad celular del compuesto en una línea celular normal de cuello uterino.
- Evaluar el efecto de los compuestos 3j y 3a en enzimas antioxidantes, con el propósito de relacionarlo con la actividad citotóxica y el aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno en células HepG2.
- Realizar estudios *in vivo* del efecto del compuesto 3j en hepatocarcinoma y en células hepáticas normales.

5. Divulgación de resultados

El trabajo “Cytotoxic activity of tetrahydroquinoline-isoxazole hibrid compounds in cáncer cell lines”, presentado en el 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) en Foz do Iguacu del 24 al 28 de agosto de 2015.

El trabajo “Synthesis and in vitro evaluation of cytotoxic effect on cervical cáncer cells (HeLa) of tetrahydroquinoline-isoxazole hybrid derivatives” publicado en el volume 9, issue 5 de la revista Research Journal of Pharmaceutical, Biological and chemical sciences.

Referencias

- Al-Sanea, M.M., El-Deeb, I.M., & Lee S.H. (2013). Design, synthesis and in-vitro screening of new 1h-pyrazole and 1,2-isoxazole derivatives as potential inhibitors for ROS and mapk14 kinases. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34 (2), 437-42. <http://doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.2.437>
- Alvarez M. (2016). Evaluación de la actividad anticancerígena de nuevos derivados polifuncionalizados de las 3-aril-tiazolo [3,4-a] pirazin-5,8-dionas y compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre células de hepatocarcinoma humano HepG2.
- Appaix, F., Minatchy, M., Riva-Lavieille, C., Olivares, J., Antonsson, B., & Saks, V. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1457(3), 175–81.
- Bai, L., & Wang, S. (2014). Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics [Internet]; 2014 [cited 2014 Aug 4]. Available from: www.scopus.com.
- Bhat, T.A., Kumar, S., Chaudhary, AK., Yadav, N., & Chandra D. (2015). Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 20(5),635-643. <http://doi.org/10.1038/srep27513>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

- Brandt, A.P., Gozzi, G.J., Pires, A.D., Martinez, G.R., Dos Santos Canuto, A.V.,... Echevarria, A. (2016). Impairment of oxidative phosphorylation increases the toxicity of SYD-1 on hepatocarcinoma cells (HepG2). *Chemical and Biological Interactions*, 256, 154-160. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.007>
- Bronte, G., Rolfo, C., Giovannetti, E., Cicero, G., Pauwels, P., ...Passiglia, F. (2014). Are erlotinib and gefitinib interchangeable, opposite or complementary for non-small cell lung cancer treatment? biological, pharmacological and clinical aspects. *Critical Review Oncology*, 89(2), 300-13. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.08.003>
- Cairns, R., Harris, I., & Mak, T. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews*, 11:65-95. <http://doi.org/10.1038/nrc2981.2011.03.003>
- Icard, P., Lincet, H. (2012). A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, 423-433. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.07.001>
- Catalá, A. (2013). Five decades with polyunsaturated Fatty acids: chemical synthesis, enzymatic formation, lipid peroxidation and its biological effects, 1-19. <http://doi.org/10.1155/2013/710290>
- Chaabane, W., User, S.D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Los, M.J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 43-58. <http://doi.org/10.1007/s00005-012-0205-y>

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

- Chauhan, R., Siddiqi, A.A., & Dwivedi, J. (2012). An approach to regioselective synthesis of pyrazole and isoxazole derivatives and study of their antimicrobial effect. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1-5.
- Chen, D., Yu, J., & Zhang L. (2016). Necroptosis: An alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1865, 228-236. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003>
- Cragg, G.M., Grothaus, P.G., & Newman, D.J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*, 109, 3012-3014. <http://doi.org/10.1021/cr900019j>
- Cury-Boaventura, M.F., Pompéia, C., & Curi, R. (2004). Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. *Clinical Nutrition*, 23, 721-732. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.12.004>
- Dan, Dunn J., Alvarez, L.A.J., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, 6, 472-485. <http://doi.org/10.1016/j.mito.2015.01.008>
- Darwish, E.S., Atia, K.A., & Farag, A.M. (2014). Synthesis and antimicrobial evaluation of some isoxazole based heterocycles. *Heterocycles*, 89(6), 1393-411. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.03.003>

- Das, B., & Satyalakshmi, G. (2012). Natural products based anticancer agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 9(2), 169-77. [http:// doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.003](http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.003)
- Dasari, B., Jimmidi, R., & Arya, P. (2015). Selected hybrid natural products as tubulin modulators. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 94, 497-508. [http:// doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.03.008](http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.03.008)
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C.B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1), 11-20. [http:// doi.org/10.100216/bmb.20199.321](http://doi.org/10.100216/bmb.20199.321)
- Denton, D., Xu, T., & Kumar, S. (2015). Autophagy as a pro-death pathway. *Immunology Cell Biology*, 93(1), 35-42. [http:// doi.org/10.1038/icb.2014.85](http://doi.org/10.1038/icb.2014.85)
- Desagher, S., & Martinou, J. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Cell biology*, 10, 364-377. [http:// doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01803-1](http://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01803-1)
- Dev S. (2010). Impact of natural products in modern drug development. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 220-227.
- Diana, P., Carbone, A., Barraja, P., Kelter, G., Fiebig, H.H., & Cirrincione, G. (2010). Synthesis and antitumor activity of 2,5-bis(3'-indolyl)-furans and 3,5-bis(3'-indolyl)-isoxazoles, nortopsentin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(12), 4524-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.061>
- Divakaruni, AS., Brand, MD. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology*, 26(3): 192-205. [http:// doi.org/10.1152/physiol.00046.2010](http://doi.org/10.1152/physiol.00046.2010)

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

- Dong LF, & Neuzil J. (2014). Mitochondria in cancer: why mitochondria are a good target for cancer therapy. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 127, 211-27.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 4495-516. [http:// doi.org/10.1080/01926230701320337](http://doi.org/10.1080/01926230701320337)
- Faidallah, H.M, & Rostom, S.A.F. (2013). Synthesis, in vitro antitumor evaluation and DNA-binding study of novel tetrahydroquinolines and some derived tricyclic and tetracyclic ring systems. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 133-43. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.006>
- Fantin, V.R., & Leder, P. (2006). Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene*, 25(34), 4787-97. [http:// doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.03.008](http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.03.008)
- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biology*, 23(12), 620-33. [http:// doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006](http://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006)
- Fulda, S., & Debatin, K. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25: 4798-4811. [http:// doi.org/10.1038/sj.onc.1209608](http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608)
- Fulda, S. (2016). Mitochondria, redox signaling and cell death in cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 397(7),583. [http:// doi.org/10.1016/j.bcan.2016.03.008](http://doi.org/10.1016/j.bcan.2016.03.008)
- Gabay, M., Li, Y., & Felsner, D.W. (2014). MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(6). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a014241>

- Gan-Lu, D., Shan, Z., & Hong, S. (2015). Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: New advances and challenges. *World Journal of Hepatology*, 7(5), 787–798. [http:// doi.org/10.1016/j.bbc.2015.03.003](http://doi.org/10.1016/j.bbc.2015.03.003)
- Gardner, P. (1997). Superoxide driven aconitase FeS center cycling. *Bioscience Reports*, 17, 33-42. [http:// doi.org/10.23/A:1027383100936](http://doi.org/10.23/A:1027383100936)
- Gauthier, A., & Ho, M. (2013). Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology Research*, 43(2), 147-54. [http:// doi.org/10.1111/j.1872-034X.2012.01113.x](http://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2012.01113.x)
- Germano, D., Tinessa, V., Barletta, E., Cannella, L., & Daniele, B. (2013). Targeted therapy for advanced hepatocellular cancer in the elderly: Focus on sorafenib. *Drugs and Aging*, 30(11), 887-92. [http:// doi.org/10.1007/s40266-013-0124-6](http://doi.org/10.1007/s40266-013-0124-6)
- Ghorab, M.M., Ragab, F.A., & Hamed, M.M. (2009). Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(10), 4211-7. [http:// doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.017](http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.017)
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*, 301, 5. [http:// doi.org/10.1016/j.bbc.2000.03.003](http://doi.org/10.1016/j.bbc.2000.03.003)
- Hartung, J. (2015). Cancer might be a failed response to renegade mitochondria. *Journal of Theoretical Biology*, 379, 91-93. [http:// doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.05.001](http://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.05.001)

- Hassan, M., Watari, H., Abualmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*. <http://doi.org/10.1155/2014/150845>
- Heigener, D.F, & Reck, M. (2011). Mutations in the epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung cancer: Impact on treatment beyond gefitinib and erlotinib. *Advance Therapeutics*, 28(2), 126-33. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00607.x>
- Heulot, M., Chevalier, N., Puyal, J., Margue, C., Michel, S., Kreis, S., Kulms, D., Barras, D., Nahimana, A., & Widmann, C. (2016). The TAT-RasGAP317-326 anti-cancer peptide can kill in a caspase-, apoptosis-, and necroptosis-independent manner. *Oncotarget*, 7(39), 64342-64359. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00994>
- Hou, X., Luo, H., Zhong, H., Wu, F., Zhou, M., ... Zhang, W. (2013). Analysis of furo[3,2-c]tetrahydroquinoline and pyrano[3,2-c] tetrahydroquinoline derivatives as antitumor agents and their metabolites by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(11), 1222-30.
- Jakub, R.; Lan-feng, D.; & Jiri, N. (2013). Targeting the Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes for the Induction of Apoptosis and Cancer Treatment. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(3), 377-389. <http://doi.org/10.1016/j.can.2013.03.003>
- Jaña, F., Faini, F., Lapier, M., Pavani, M., Kemmerling, U., Morello, A., Maya, J., Jara, J., Parra, E., & Ferreira, J. (2013). Tumor cell death induced by the inhibition of mitochondrial electron transport: The effect of 3-hydroxybakuchiol. *Toxicology Applied Pharmaceutical*, 272(2), 356-364.

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

- Johnstone, R.W, Ruefli, A, & Scott, W. (2002). A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108, 153-164. [http:// doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00625-6](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00625-6)
- Kamal, A., Bharathi, E.V., Reddy, J.S., Ramaiah, M.J., Dastagir,i D., ...Reddy, M.K. (2011). Synthesis and biological evaluation of 3,5-diaryl isoxazoline/isoxazole linked 2,3-dihydroquinazolinone hybrids as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(2), 691-703. [http:// doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.07.057](http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.07.057)
- Kang, J.I., Hong, J., Choi, J.S., & Lee, S.K. (2016). Columbianadin inhibits cell proliferation by inducing apoptosis and necroptosis in HCT116 colon cancer cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(3), 320-327. [http:// doi.org/10.4062/biomlther.2015.145](http://doi.org/10.4062/biomlther.2015.145)
- Keipert, S., & Jastroch, M. (2014). Brite/beige fat and UCP1 - Is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta Bioenergetics*, 1837(7),1075-1082. <http://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2014.02.008>
- Köhler, J., & Schuler, M. (2013). Afatinib, erlotinib and gefitinib in the first-line therapy of EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma: A review. *Onkologie*, 36(9), 510-8. <http://doi.org/10.1159/000354627>
- Kouznetsov, V., Merchan, D., Arvelo, F., Bello, J., Sojo, F., & Munoz, A. (2010). 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl Substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline Derivatives Obtained Through Imino Diels-Alder Reactions as Potential Antitumoral Agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, 7(9), 632-639. [http:// doi.org/10.2174/157018010792929577](http://doi.org/10.2174/157018010792929577)
- Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989). Quantification of Cells Cultured on 96-Well Plates W.'*Analytical Biochemistry*, 182:16-19. [http:// doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003](http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003)

- Kumar, A., Srivastava, S., Gupta, G., Chaturvedi, V., Sinha, S., & Srivastava R. (2011). Natural product inspired diversity oriented synthesis of tetrahydroquinoline scaffolds as antitubercular agent. *ACS Combinatorial Science*, 13(1), 65-71.
- Kumbhare, R.M., Kosurkar, U.B., Ramaiah, M., Dadmal, T.L., Pushpavalli, S.N., & Pal-Bhadra, M. (2012). Synthesis and biological evaluation of novel triazoles and isoxazoles linked 2-phenyl benzothiazole as potential anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(17), 5424–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.041>
- Lam, K., Lee, K.K., Gambari, R., Wong, R.S., Cheng, G.Y., ...Tong, S. (2013). Preparation of galipea officinalis hancock type tetrahydroquinoline alkaloid analogues as anti-tumour agents. *Phytomedicine*, 20(2), 166-71. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.026>
- Lapennas, S., & Giordano, A. (2009). A cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews*, 8, 547-566. <http://doi.org/10.1038/nrd2907>
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., & Bondy, S.C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemistry Research Toxicology*, 5, 227–231. <http://doi.org/10.1021/tx0026a012>
- Lee, K., Lee, D., Jung, Y., Young, S., & Lee, Y. (2016). The natural flavone eupatorin induces cell cycle arrest at the G2/M phase and apoptosis in HeLa cells. *Applied Biological Chemistry*, 59(2), 193–199. <http://doi.org/10.1007/s13765-016-0160-0>
- Li, C., Han, X., Zhang, H., Wu, J., & Li, B. (2016). The interplay between autophagy and apoptosis induced by tanshinone IIA in prostate cancer cells. *Tumour Biology*, 37(6), 7667-74. <http://doi.org/10.4093/dmj.2013.37.5.333>

- Liemburg-Apers, D.C., Willems, P.H.G.M., Koopman, W.J.H., & Grefte, S. (2015). Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Archives Toxicology*, 89(8), 1209-1226. [http:// doi.org/10.1007/s00204-015-1520](http://doi.org/10.1007/s00204-015-1520)
- Lin, C.Y., Chang, T.W., Hsieh, W.H., Hung, M.C., Lin, I.H., Lai, S.C., & Tzeng, Y.J. (2016). Simultaneous induction of apoptosis and necroptosis by Tanshinone IIA in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell Death Discovery*, 2, 16065. [http:// doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.65](http://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.65)
- Linkermann, A., & Green, D. (2014). Necroptosis. *New England Journal of Medicine*, 370(5), 455–465. [http:// doi.org/10.1056/NEJMr1310050](http://doi.org/10.1056/NEJMr1310050)
- Liu, H., Liu, F., Zou, D., & Dai, G. (2005). Asymmetric synthesis of novel tetrahydroquinoline derivatives with a sugar building block and their bioactivities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(7), 1821–1824. [http:// doi.org/10.1039/c8cc04732d](http://doi.org/10.1039/c8cc04732d)
- Ly, J.D., Grubb, D.R., & Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8(2), 115-28.
- Ma, X., & Wang, Z. (2009). Anticancer drug discovery in the future: An evolutionary perspective. *Drug Discovery Today*, 14, 1136-1142. [http:// doi.org/10.1016/j.drudis.2009.09.006](http://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.09.006)
- Maira, F., Catania, A., Candido, S., Russo, A.E., McCubrey, J.A., ... Libra, M. (2012). Molecular targeted therapy in melanoma: A way to reverse resistance to conventional drugs. *Current Drug Delivery*, 9(1), 17-29. [http:// doi.org/10.1038/j.bbcan.2012.08.003](http://doi.org/10.1038/j.bbcan.2012.08.003)

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

- Mallumbres, M., & Bardacid, M. Cell cycle, CDK and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews*. 2009; 9: 153-166. [http:// doi.org/10.1152/hysrev.00025.2010.003](http://doi.org/10.1152/hysrev.00025.2010.003)
- Manziona, L., Grimaldi, A.M., Romano, R., Ferrara, D., & Dinota, A. (2008). Hepatocarcinoma: from pathogenic mechanisms to target therapy. *Oncology Review*, 2, 214–222. <http://doi.org/10.4081/oncol.2008.214>
- Marchetti, P., Pavan, B., Simoni, D., Baruchello, R., Rondanin, R., ...Mischiati, C. (2016). A novel hybrid drug between two potent anti-tubulin agents as a potential prolonged anticancer approach. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 91, 50-63. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.05.032>
- Monneret C. (2010). Current impact of natural products in the discovery of anticancer drugs. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 68, 218-232. <http://doi.org/10.1016/pharma.2010.04.004>
- Montero, A.J., & Jassem, J. (2011). Cellular Redox Pathways as a Therapeutic Target in the Treatment of Cancer. *Drugs*, 71(11), 1385-1396. [http:// doi.org/10.2165/11592590-000000000-00000](http://doi.org/10.2165/11592590-000000000-00000)
- Morgan D. (2007). The cell cycle. *New Science press Ltd*, 140-152. <http://doi.org/10.1093/icb/icm060>
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65(1-2),55–63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Muñoz, A., Sojo, F., Arenas, D.M., Kouznetsov, V.V., & Arvelo, F. (2011). Cytotoxic effects of new trans-2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their interaction with antitumoral drugs gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 189(3), 215–21. [http:// doi.org/10.1016/j.cbi.2010.11.010](http://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.11.010)
- Nakayama, M., Arai, Y., & Nishimura, K. (2012). Side effects of sorafenib and countermeasures. *Acta Urologica Japonica*, 58(11), 635-7. Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L.M, Quintanilla-Vega, B., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., & Franco, R. (2014). Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxidants & Redox Signal*, 21(1), 66-85. [http:// doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003](http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003)
- Neuzil, J., Dong, L.F., Rohlena, J., Truksa, J., & Ralph, S.J. (2013). Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion*, 13(3), 199-208. [http:// doi.org/10.1016/j.mito.2012.07.112](http://doi.org/10.1016/j.mito.2012.07.112)
- Noleto, G.R., Petkowicz, C.L.O., Mercê a, L.R., Nosedá, M.D., Méndez-Sánchez, S.C, ...Reicher, F. (2009). Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(5),749–57. [http:// doi.org/10.1016/j.jiorgbio.2009.01.018](http://doi.org/10.1016/j.jiorgbio.2009.01.018)
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358. [http:// doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

- Okon, I.S, & Zou, M-. (2015). Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacology Research*, 100,170-174. [http:// doi.org/10.1016/j.phrs.2015.06.013](http://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.06.013)
- Olszewska, A., & Szewczyk, A. (2013). Mitochondria as a pharmacological target: magnum overview. *IUBMB Life*, 65(3), 273-81. [http:// doi.org/10.1002/iub.1147](http://doi.org/10.1002/iub.1147)
- Palanisamy, P., Jenniefer, S.J., Muthiah, P.T., & Kumaresan, S. (2013). Synthesis, characterization, antimicrobial, anticancer, and antituberculosis activity of some new pyrazole, isoxazole, pyrimidine and benzodiazepine derivatives containing thiochromeno and benzothiepine moieties. *RSC Advances*, 3(42), 19300-10. <http://doi.org/10.1016/j.jscs.2013.11020>
- Palusa, S.K.G., Udupi, R.H., & Himabindu, V. (2011). Synthesis, antimicrobial and anti-inflammatory studies of isoxazole analogues of rosuvastatin. *Der Pharma Chemica*, 3(3): 39-50.
- Pardo-Andreu, G.L., Nuñez-Figueredo, Y., Tudella, V.G., Cuesta-Rubio, O., Rodrigues, F.P., Pestana, C.R., Uyemura, S.A., Leopoldino, A.M., Alberici, L.C., & Curti, C. (2011). The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler. *Mitochondrion*, 11, 255–63. [http:// doi.org/10.1016/j.mito.2010.10.008](http://doi.org/10.1016/j.mito.2010.10.008)
- Parzych, K.R., & Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20(3), 460-73. [http:// doi.org/10.1089/ars.2013.5371](http://doi.org/10.1089/ars.2013.5371)
- Philipp, S., Sosna, J., & Adam, D. (2016). Cancer and necroptosis: friend or foe? *Cellular and Molecular Life Science*, 73(11-12), 2183-2193. [http:// doi.org/10.1007/s00018-016-2193-2](http://doi.org/10.1007/s00018-016-2193-2)

Quinlan, C.L., Goncalves, R., Hey-Mogensen, M., Yadava, N., Bunik, V., & Brand, M. (2014).

The o₂-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I. *The Journal of Biological Chemistry*, 289, 8312-8325. [http:// doi.org/10.1046/j.1432-1033.03204](http://doi.org/10.1046/j.1432-1033.03204)

Radogna, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2015). Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochemistry Pharmacology*, 94(1), 1-11. [http:// doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.018](http://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.018)

Reddy-Guduru, S.K., Chamakuri, S., Chandrasekar, G., Kitambi, S.S., & Arya, P. (2013). Tetrahydroquinoline-derived macrocyclic toolbox: The discovery of antiangiogenesis agents in zebrafish assay. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(7), 666-70. [http:// doi.org/10.1021/ml400026n](http://doi.org/10.1021/ml400026n)

Reilly, T.P., Bellevue, F.H., Woster, P.M., & Svensson, CK. (1998). Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone, *Biochemistry. Pharmacology*, 55(6), 803–810. [http:// doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00547-9](http://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00547-9)

Rieger, A.M., Nelson, K.L., Konowalchuk, J.D., & Barreda, D.R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*, 24, 2597. [http:// doi.org/10.3791/2597](http://doi.org/10.3791/2597)

Rosell, R., Bivona, T.G., & Karachaliou, N. (2013). Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet*, 382(9893), 720-31. [http:// doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003](http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003)

- Rudenko, D.A., Shavrina, T.V., Shurov, S.N., & Zykova, S.S. (2014). Synthesis and antioxidant activity of tricyclic compounds containing a 5,6,7,8-tetrahydroquinoline moiety. *Pharmaceutical Chemistry Journal*.
- Sabharwal, S.S., & Schumacker, P.T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?. *Nature Review Cancer*, 14(11), 709-21. [http:// doi.org/10.1038/nrc3803](http://doi.org/10.1038/nrc3803)
- Shang, H.S., Chang, C.H., Chou, Y.R., Yeh, M.Y., Au, M.K., Lu, H.F., Chu, Y.L., Chou, H.M., Chou, H.C., Shih, Y.L., & Chung, J.G. (2016). Curcumin causes DNA damage and affects associated protein expression in HeLa human cervical cancer cells. *Oncology Reports*, 36(4), 2207-15. [http:// doi.org/10.3892/or.2016.5002](http://doi.org/10.3892/or.2016.5002)
- Shen, Y.C., Ou, D.L., Hsu, C., Lin, K.L., Chang, C.Y., Lin, C.Y., Liu, S.H., & Cheng, A.L. (2013). Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 108(1), 72-81. [http:// doi.org/10.1038/bjc.2012.559](http://doi.org/10.1038/bjc.2012.559)
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., & Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5(5), 415-8.
- Su, Z., Yang, Z., Xie, L., Dewitt, J.P., & Chen, Y. (2016). Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death Differ*, 23(5), 748-756. [http:// doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.008](http://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.008)
- Sun, H., Wang, W., Che, Y., & Jiang, X. (2016). Fungal secondary metabolites rasfonin induces autophagy, apoptosis and necroptosis in renal cancer cell line. *Mycology*, 7(2), 81-87. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.019>

- Szewczyk, A., & Wojrczak, L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacology Review*, 54, 101-127. [http:// doi.org/10.1002/iub.1147](http://doi.org/10.1002/iub.1147)
- Tanaka T. (2013). Role of apoptosis in the chemoprevention of cancer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine (Taiwan)*, 5(3), 89-91. [http:// doi.org/10.1046/j.1464-410X.2013.03.46](http://doi.org/10.1046/j.1464-410X.2013.03.46)
- Tartarone, A., Lazzari, C., Lerosé, R., Conteduca, V., Improta, G., ...Zupa, A. (2013). Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors gefitinib/erlotinib and to ALK inhibitor crizotinib. *Lung Cancer*, 81(3), 328-36. [http:// doi.org/10.1155/2012/123253](http://doi.org/10.1155/2012/123253)
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 700–714. [http:// doi.org/10.1038/nrm2970](http://doi.org/10.1038/nrm2970)
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal Immunology Methods*, 184, 39–51. [http:// doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-1](http://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-1)
- Vidau, C., González-Polo, R. a., Niso-Santano, M., Gómez-Sánchez, R., Bravo-San Pedro, J.M., Pizarro-Estrella, E., Blasco, R., Brunet, J.L., Belzunces, L.P., & Fuentes, J. M. (2011). Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology*, 32, 935–43. <http://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.04.006>

Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M.C. (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, 166(3), 555-566.

[http:// doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002](http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002)

Walsh, M.J., Brimacombe, K.R., Veith, H., Bougie, J.M., Daniel, T., ...Leister, W. (2011). 2-oxo-N-aryl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-6-sulfonamides as activators of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(21), 6322-7.

Weinberg, S.E., & Chandel, N.S. (2015). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy.

Nature Chemical Biology, 11(1), 9-15. [http:// doi.org/10.1038/nchembio.1712](http://doi.org/10.1038/nchembio.1712)

Wen, S., Zhu, D., & Huang, P. (2013). Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Medicinal Chemistry*, 5(1), 53-67. [http:// doi.org/10.4155/fmc.12.190](http://doi.org/10.4155/fmc.12.190)

Wu, W., Liu, P., & Li, J. (2012). Necroptosis: an emerging form of programmed cell death.

Critical Review in Oncology Hematology, 82(3), 249-58. <http://doi.org/10.1038/cdd.2012.0005>

Yaoxian, W., Hui, Y., Yunyan, Z., Yanqin, L., Xin, G., & Xiaoke W. (2013). Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. *Cancer Cell International*, 13:71. [http:// doi.org/10.1186/1475-2867-13-71](http://doi.org/10.1186/1475-2867-13-71)

Zhang, X., Yang, X., Huang, X., Wang, W., Shi, R., ...Xu, Y. (2012). Sorafenib in treatment of patients with advanced hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, 11(5), 458-66.

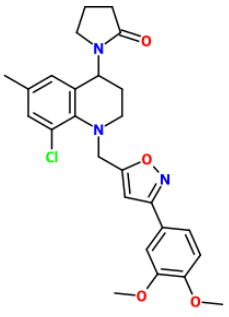
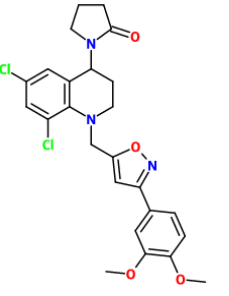
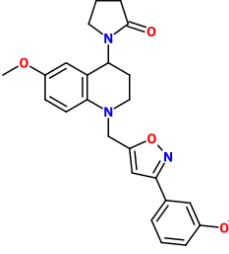
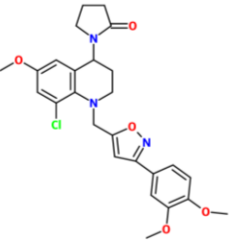
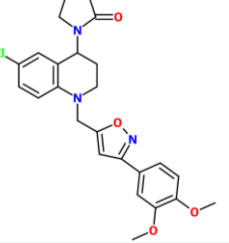
Zhu, Y., Cheng, Y., & Li, A. (2013). Mechanisms of drug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 29(6), 752-5. <http://doi.org/10.1016/j.bn.2013.03.018>

Apéndice A. Estructuras químicas y nomenclatura de los compuestos evaluados en el proyecto

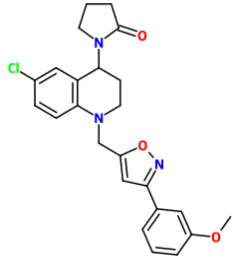
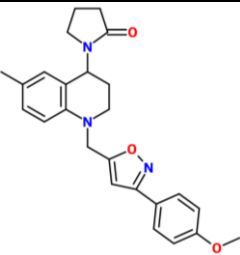
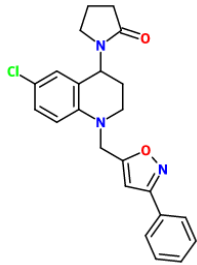
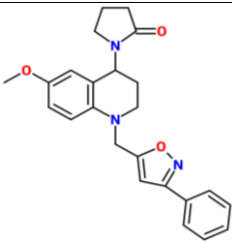
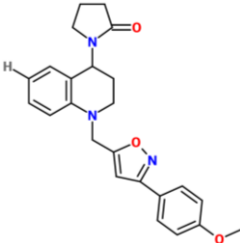
Tabla A. Híbridos de tetrahydroquinolinas e isoxazoles

CÓDIGO	ESTRUCTURA	PESO MOLÉCULAR (gramos)	NOMBRE IUPAC
3f		477,5	5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol
3l		498,0	5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol
3i		493,5	5-((6'-metoxi-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol
3c		463,5g	5-((4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol

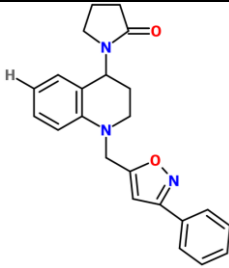
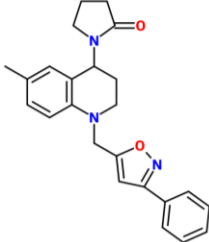
NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

3n		447,6g	3-(3,4-dimetoxifenil)-5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3p		468.1	3-(4,5-dimetoxifenil)-5-((6',8'-dicloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3h		433,5	3-(4-metoxifenil)-5-((6'-metoxi-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3o		463,6	3-(4,5-dimetilfenil)-5-((6'-metoxi-8'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3m		433,6	3-(4,5-dimetilfenil)-5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

3k		438,9	3-(4-metoxifenil)-5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3e		418,4	3-(4-metoxifenil)-5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3j		407,9g	3-(fenil)-5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3g		403,4	3-(fenil)-5-((6'-metoxi-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3b		404,4	3-(4-metoxifenil)-5-((4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol

NUEVOS HÍBRIDO CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

3a		373,5	3-(fenil)-5-((4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
3d		387,5	3-(fenil)-5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol