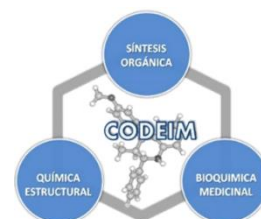


**Evaluación de la actividad anticancerígena de nuevos derivados polifuncionalizados de las
3-aril-tiazolo [3,4-*a*] pirazin-5,8-dionas y compuestos híbridos de tetrahidroquinolina-
isoxazol sobre células de hepatocarcinoma humano Hep-G2**

Marilyn Rocio Alvarez Santos



Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2017

**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 Hep-G2**

Marilyn Rocio Alvarez Santos

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Química

Directora

Stelia Carolina Méndez

Doctora en Ciencias-Bioquímica

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, GIBIM

Co-Director

Arnold Rafael Romero Bohórquez

Doctor en Química

Grupo de Investigación de Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal, CODEIM

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2017

“...Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como la oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber...”

Albert Einstein

A mi amado Mao

Agradecimientos

A la vida por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica e investigativa.

A mi familia por su amor y su apoyo incondicional, por sus consejos y por su voz de aliento para continuar con la realización de mi proyecto de vida.

A mi esposo, por acompañarme en esta etapa de mi vida, por apoyarme y animarme siempre, por ese amor que me da la fortaleza para enfrentar las dificultades y que me ha enseñado a atesorar y disfrutar cada momento, cada bendición.

A la profesora Stelia, por haberme acogido en su equipo de trabajo, por sus enseñanzas y su orientación para el desarrollo de mi trabajo de grado; por su compromiso incondicional, su motivación y su optimismo. Tuve la fortuna de hallar en mi directora, no sólo la orientación académica, sino también una voz amiga.

Al Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander y a mis compañeros del laboratorio 402 por los conocimientos compartidos y por los gratos momentos de esparcimiento vividos. A Mauricio Urquiza por compartir su experiencia en el estudio del cáncer, por su orientación y sus consejos. A Luis Carlos por compartir conmigo sus conocimientos de bioenergética, por su esfuerzo y dedicación para el aislamiento de hepatocitos junto con la profesora Stelia. A Yenny, con quien nos apoyamos mutuamente para el desarrollo de nuestros trabajos de investigación, por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo, y por ser una amiga que siempre me motivó a perseverar.

Al Grupo de investigación en compuestos orgánicos de interés medicinal (CODEIM) de la Universidad Industrial de Santander, por su interés en desarrollar este trabajo colaborativo. Al profesor Arnold por su orientación en química orgánica, por su disponibilidad para resolver inquietudes. A Javier y a Fausto por su buena disposición para la síntesis de los compuestos que se requerían para los ensayos de actividad anticancerígena.

Al Bioterio de la Universidad Industrial de Santander y a don Jesús por su colaboración para el suministro de los animales requeridos para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Grupo de Investigación Biomédica Traslacional de la Fundación Cardiovascular por poner a disposición sus instalaciones para realizar algunos de los ensayos comprendidos en este trabajo.

Al Instituto Insuasty Oncología e Investigación por la donación de la droga Oxaliplatino para los ensayos de viabilidad celular.

A la Universidad Industrial de Santander, mi alma mater, y a mi apreciada Escuela de Química por el apoyo económico para continuar con mis estudios de posgrado, al ser beneficiaria del programa de créditos condonables durante dos semestres.

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

Al programa Jóvenes Investigadores e Innovadores 2015 de COLCIENCIAS, del cual fui beneficiaria durante los últimos semestres de mi maestría.

Tabla de contenido

Introducción	17
1 Marco de referencia y antecedentes	22
1.1 El cáncer en cifras	22
1.2 Carcinoma hepatocelular: riesgos, diagnóstico y tratamiento	23
1.3 Línea celular Hep-G2: modelo <i>in vitro</i> para estudiar el cáncer de hígado	27
1.4 Compuestos heterocíclicos: andamios moleculares para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer	28
1.4.1 Las tiazolidinas.	29
1.4.2 Las dicetopiperazinas	34
1.4.3 Las tetrahydroquinolinas	37
1.4.4 Los isoxazoles	42
1.5 Mecanismos de muerte celular y su rol en el tratamiento del cáncer.....	44
1.5.1 La apoptosis: principal mecanismo de muerte en la terapia contra el cáncer	45
1.5.2 La autofagia: sobrevivir o morir	50
1.5.3 La necrosis regulada: una nueva alternativa en la terapia contra el cáncer	56

1.5.4 Interconexión entre las vías apoptóticas, necróticas y autofágicas	65
1.5.5 Inducción de formas mezcladas de muerte celular	66
1.5.6 ¿Cómo diferenciar apoptosis de necroptosis?	68
1.6 Bioenergética mitocondrial	69
1.6.1 Fosforilación oxidativa y cadena respiratoria mitocondrial	71
1.6.2 Mitocondrias aisladas: modelos para el estudio de mecanismos de acción	80
1.7 Especies reactivas de oxígeno y sus dos caras en la terapia del cáncer	82
1.7.1 Generación y regulación de las especies reactivas de oxígeno	83
1.7.2 Señalización protumorigénica promovida por las especies reactivas de oxígeno	86
1.7.3 Señalización antitumorigénica promovida por las especies reactivas de oxígeno	88
2. Objetivos	90
2.1 Objetivo general	90
2.2 Objetivos específicos	90
3. Materiales y métodos	91
3.1 Compuestos	91
3.2 Evaluación de la actividad anticancerígena de las moléculas 3-aril-tiazolo [3,4-a] pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol	91

3.2.1 Cultivo celular.....	91
3.2.2 Determinación de la viabilidad celular	92
3.2.3 Evaluación de la morfología celular	92
3.2.4 Electroforesis de ADN para evaluar proceso de muerte celular	93
3.2.5 Determinación de especies reactivas de oxígeno	94
3.2.6 Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos de rata.....	94
3.2.7 Determinación de la viabilidad de los hepatocitos.....	96
3.3 Evaluación de la actividad de los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre la función bioenergética mitocondrial	97
3.3.1 Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata	97
3.3.2 Determinación del consumo de oxígeno	98
3.3.3 Actividad enzimática mitocondrial	98
3.4 Análisis estadístico.....	102
3.5 Disposición de los residuos biológicos y químicos	103
4. Resultados y discusión	105
4.1 Evaluación de la actividad anticancerígena de las moléculas 3-aril-tiazolo [3,4-a] pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol	105

4.1.1 Viabilidad celular	105
4.1.2 Morfología celular.....	112
4.1.3 Electroforesis de ADN.....	115
4.1.4 Especies reactivas de oxígeno.....	116
4.2 Evaluación de la actividad de los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre la función bioenergética mitocondrial	118
4.2.1 Consumo de oxígeno.....	118
4.2.2 Actividad enzimática mitocondrial	122
5. Conclusiones	128
6. Recomendaciones.....	131
7. Divulgación de resultados	132
Referencias.....	133
Apéndices.....	147

Lista de figuras

Figura 1. Estructuras químicas de agentes quimioterapéuticos usados para el tratamiento de CHC.	25
Figura 2. Estructura química del Sorafenib..	25
Figura 3. Estructuras químicas de las drogas a) oxaliplatino y b) gemcitabina.....	26
Figura 4. Células Hep-G2..	27
Figura 5. Estructuras químicas de heterociclos con amplio espectro de actividad biológica..	29
Figura 6. Estructura química de los compuestos ATCCA 1 y 2.	32
Figura 7. Derivado 3 de la tiazolidina.....	32
Figura 8. Moléculas 4 y 5 que incorporan la tiazolidina.....	33
Figura 9. Estructuras 6 y 7 derivadas del tiazol.	33
Figura 10. Estructura química de la 2,5-dicetopiperazina y algunos de sus derivados.	34
Figura 11. Estructura química del derivado 8 de la 2,5-dicetopiperazina.	35
Figura 12. Derivado natural 9 de la 2,5-dicetopiperazina.....	36
Figura 13. Derivados <i>N</i> -1-monoalilados de la 2,5-dicetopiperazina.	37
Figura 14. Derivados de tetrahydroquinolina con actividad anticancerígena.....	37
Figura 15. Derivado de THQ inhibidor de anhidrasas carbónicas (CAs)..	38

Figura 16. Derivado de THQ 17 intercalador de ADN.....	39
Figura 17. Derivado de THQ 18.....	39
Figura 18. Derivados de tetrahydroquinolina denominados por los autores I-BET726 y I-BET295..	40
Figura 19. Derivado de THQ 19 inhibidor de HDAC.	41
Figura 20. Inhibidor dual BET/HDAC denominado DUAL946..	42
Figura 21. Dimetilisoxazol I-BET151.	42
Figura 22. Derivados de isoxazol 20 y 21.....	43
Figura 23. Compuesto 22.....	43
Figura 24. Derivados del isoxazol 23 y 24..	44
Figura 25. Pasos claves en las vías de señales apoptóticas extrínseca e intrínseca.	47
Figura 26. Mecanismos de señalización de la autofagia.....	53
Figura 27. Vía de señalización y reguladores de la necroptosis..	58
Figura 28. Estructura general de la mitocondria.....	71
Figura 29. Cadena respiratoria mitocondrial...	72
Figura 30. Descripción de la estructura molecular del complejo I.	73
Figura 31. Estructura cristalina de la succinato deshidrogenasa mitocondrial.	75

Figura 32. Representación esquemática del complejo III mitocondrial.	76
Figura 33. Representación esquemática del complejo IV mitocondrial.	77
Figura 34. Esquema de la estructura del complejo V mitocondrial.	78
Figura 35. Generación y regulación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.	84
Figura 36. Formación de cristales del compuesto JK102-25 μ M en cultivo de células Hep-G2.	107
Figura 37. Comparación de la viabilidad de células Hep-G2 tratadas a diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas) con el compuesto (A) FM48, (B) FM49 y (C) FM52.	109
Figura 38. Comparación de la viabilidad de células Hep-G2 vs. hepatocitos después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de (A) FM48, (B) FM49 y (C) FM52.	111
Figura 39. Cambios morfológicos observados en células Hep-G2 después de 24 horas de tratamiento con los compuestos FM48, FM49 y FM52 a la concentración de 25 μ M.	113
Figura 40. Análisis de fragmentación de ADN separado por electroforesis en gel de agarosa al 1% de células Hep-G2 tratadas por 24 horas con los derivados FM48, FM49 y FM52 en concentraciones de 25 y 50 μ M.	115
Figura 41. Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) de células Hep-G2 tratadas con los compuestos FM48, FM49 y FM52 a la concentración de 25 μ M, usando H ₂ O ₂ (400 μ M) como control positivo.	117

Figura 42. Consumo de oxígeno (A) en presencia de ADP (estado 3) y (B) en ausencia de ADP (estado 4), vía complejo I (sustrato glutamato) y vía complejo II (sustrato succinato) bajo la acción de FM48, FM49 y FM52. 119

Figura 43. Coeficiente de control respiratorio vía complejo I (sustrato glutamato) y vía complejo II (sustrato succinato) bajo la acción de FM48, FM49 y FM52.. 120

Figura 44. Determinación de la actividad enzimática de (A) NADH oxidasa, (B) NADH deshidrogenasa y (C) NADH citocromo *c* reductasa en presencia de FM48, FM49 y FM52 (25 μ M). 123

Figura 45. Determinación de la actividad enzimática de (A) succinato oxidasa, (B) succinato deshidrogenasa y (C) succinato citocromo *c* reductasa en presencia de FM48, FM49 y FM52 (25 μ M). 124

Figura 46. Determinación de la actividad enzimática de la citocromo *c* oxidasa en presencia de FM48, FM49 y FM52 (25 μ M). 125

Figura 47. Determinación de la actividad ATPasa de mitocondrias fragmentadas en presencia de FM48, FM49 y FM52 (25 μ M). 125

Lista de tablas

Tabla 1. Comparación de marcadores de necroptosis y apoptosis.....	68
Tabla 2. Actividad citotóxica de los compuestos derivados de tiazolidina-dicetopiperazina sobre diferentes líneas celulares de cáncer tras 48 horas de tratamiento.....	106
Tabla 3. Actividad citotóxica de los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol FM48, FM49 y FM52 sobre diferentes líneas celulares de cáncer tras 48 horas de tratamiento.	108
Tabla 4. Relación ADP/O vía complejo I y complejo II bajo la acción de FM48, FM49 y FM52. *p<0,05; **p<0,01.	121

RESUMEN

TÍTULO: 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 TETRAHIDROQUINOLINA-ISOXAZOL SOBRE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO Hep-G2 *

AUTORA: MARILYN ROCIO ALVAREZ SANTOS**

PALABRAS CLAVE: HEPATOCARCINOMA, HÍBRIDOS DE TIAZOLIDINA-DICETOPIERAZINA, HÍBRIDOS DE TETRAHIDROQUINOLINA-ISOXAZOL, ACTIVIDAD CITOTÓXICA, MUERTE CELULAR, BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL.

DESCRIPCIÓN:

La necesidad de identificar nuevos compuestos que tengan potencial anticancerígeno y que puedan emplearse como terapia alternativa para el carcinoma hepatocelular (CHC), motivó el diseño y la síntesis de nuevos andamios moleculares de tiazolidina-dicetopiperazina (TZD-DKP) y de tetrahydroquinolina-isoxazol (THQ-ISX). El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la actividad anticancerígena de estos nuevos compuestos sobre células de hepatocarcinoma humano Hep-G2.

Inicialmente se determinó el efecto de las moléculas TZD-DKP y THQ-ISX sobre la viabilidad de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549, melanoma B16F10, adenocarcinoma cervical HeLa, hepatocarcinoma Hep-G2 y células no cancerígenas de riñón Vero, para escoger los compuestos con el mejor perfil citotóxico sobre las células Hep-G2. A partir de estos resultados se seleccionaron los derivados de THQ-ISX **FM48**, **FM49** y **FM52**, y se evaluó su selectividad sobre células Hep-G2 respecto a hepatocitos normales y su efecto sobre la morfología, la fragmentación de ADN y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células de hepatocarcinoma humano Hep-G2. Adicionalmente, se estudió la acción de los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52** sobre la bioenergética de mitocondrias aisladas de hígado de rata para determinar si su actividad citotóxica podría estar asociada con alteraciones en la cadena respiratoria.

Los resultados sugieren que los derivados de THQ-ISX **FM48**, **FM49** y **FM52** presentan citotoxicidad significativa sobre células Hep-G2, sin afectar a hepatocitos normales. Su actividad citotóxica estaría relacionada con la inducción de apoptosis y mecanismos de muerte celular no apoptóticos, que para el caso de **FM49** y **FM52** podrían estar asociados con un aumento en la producción de EROs, debido a posibles alteraciones en la actividad enzimática de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial.

* Trabajo de investigación.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D.

Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Codirector: Arnold Rafael Romero Bohórquez, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: ANTICANCER ACTIVITY OF NEW POLIFUNCIONALIZED DERIVATIVES OF 3-ARYL-THIAZOLO [3,4-a] PYRAZIN-5,8-DIONES AND HYBRID MOLECULES OF TETRAHYDROQUINOLINE-ISOXAZOLE ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS Hep-G2 *

AUTHOR: MARILYN ROCIO ALVAREZ SANTOS**

KEYWORDS: HEPATOCELLULAR CARCINOMA, THIAZOLIDINE-DIKETOPIPERAZINE HYBRIDS, TETRAHYDROQUINOLINE-ISOXAZOLE HYBRIDS, CYTOTOXIC ACTIVITY, CELL DEATH, MITOCHONDRIAL BIOENERGETIC.

DESCRIPTION:

The need to identify new compounds with anticancer potential that can be used as alternative therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), this led to the design and synthesis of new molecular scaffolds of thiazolidine-diketopiperazine (TZD-DKP) and tetrahydroquinoline-isoxazole (THQ-ISX). The aim of this research was studying the anticancer activity of these new compounds on human hepatocellular carcinoma, Hep-G2.

To choose the most cytotoxic compounds on Hep-G2 cells, at first it was determined the effect of TZD-DKP and THQ-ISX molecules on cell lines viability: A549 lung adenocarcinoma cells, B16F10 melanoma cells, HeLa cervical adenocarcinoma cells, Hep-G2 hepatocellular carcinoma, and Vero kidney non-cancerous cells. From these results, the THQ-ISX derivatives **FM48**, **FM49** and **FM52** were selected, and their selectivity on Hep-G2 with respect to normal hepatocytes was evaluated, and their effect on morphology, DNA fragmentation and reactive oxygen species (ROS) levels on Hep-G2. Besides, it was studied of the **FM48**, **FM49** and **FM52** action on liver mitochondrion isolated to determine if their cytotoxic activity could be associated with respiratory chain alterations.

Results suggest that THQ-ISX molecules **FM48**, **FM49** and **FM52** have significant cytotoxicity on Hep-G2 cells, without affecting normal hepatocytes. This cytotoxic activity would be related to the induction of apoptotic and non-apoptotic cell death mechanisms, that for the case of **FM49** and **FM52** could be associated with the ROS increase, probably it due to enzymatic activity alterations on complex I and complex III of the respiratory chain.

* Master thesis.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D.
Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Arnold Rafael Romero Bohórquez, Ph.D.

Introducción

Las estadísticas nacionales y mundiales muestran que la mayoría de pacientes diagnosticados con carcinoma hepatocelular (CHC) no tienen la opción de acceder a terapias potencialmente curativas como resecciones quirúrgicas o trasplante de hígado, por lo que su única alternativa es la quimioterapia disponible actualmente la cual carece de eficacia debido a la variabilidad de los tumores, a los efectos secundarios y al desarrollo de resistencia primaria durante el tratamiento (Carr, 2014; Edeline *et al.*, 2009). Esto constituye una situación desalentadora para la mayoría de personas diagnosticadas con este tipo de cáncer en el que las tasas de incidencia y mortalidad son similares, sugiriendo que la probabilidad de prolongar la vida sometándose a estos tratamientos es muy baja (Instituto Nacional de Cancerología, 2015; GLOBOCAN, 2012).

Por lo tanto, la necesidad de identificar nuevos compuestos que tengan potencial anticancerígeno y puedan emplearse como terapia alternativa para el CHC, ha conducido a la síntesis de nuevos compuestos con actividad anticancerígena; siendo la hibridación molecular la estrategia metodológica predilecta para la unión de dos moléculas con diferente actividad biológica y diferente mecanismo de acción, que permita potenciar sus propiedades farmacológicas (Asati, Mahapatra, & Bharti, 2014). Uno de los equipos investigadores atraídos por el diseño de esta clase de compuestos ha sido el Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) de la Universidad Industrial de Santander, en el que se sintetizaron recientemente una serie de nuevos derivados de tiazolidina-dicetopiperazina (Cala Gómez, 2015) y de tetrahydroquinolina-isoxazol (Marín Güiza, 2014).

Con la motivación de contribuir al estudio de los efectos bioquímicos y la actividad citotóxica de estos nuevos compuestos, surgió la colaboración interdisciplinaria entre el CODEIM y el Grupo

de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander, que dio vida a este trabajo de investigación el cual tuvo como objetivo principal evaluar 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 Hep-G2.

Para contextualizar el desarrollo de este trabajo, en la sección dos se presenta el marco de referencia en el que se describen las características del carcinoma hepatocelular, las propiedades citotóxicas reportadas para los compuestos heterocíclicos de interés, los mecanismos de muerte celular y la función bioenergética mitocondrial. A continuación, en las secciones tres y cuatro se describen de manera detallada los objetivos y la forma en que se abordaron a través de la metodología. Para ello, inicialmente se estudió el efecto de las moléculas de tiazolidina-dicetopiperazina y de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre la viabilidad de diferentes líneas celulares de cáncer (A549, B16F10, HeLa y Hep-G2) y células normales (Vero), con el fin de seleccionar los compuestos con el mejor perfil citotóxico sobre las células Hep-G2. Fue así como se escogieron los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol **FM48**, **FM49** y **FM52** para evaluar su selectividad respecto a hepatocitos normales y su efecto sobre la morfología, la fragmentación de ADN y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las células de hepatocarcinoma. Adicionalmente, se estudió la acción de estos derivados sobre la bioenergética de mitocondrias aisladas de hígado de rata para determinar si su actividad citotóxica podría estar asociada con alteraciones en la cadena respiratoria.

De esta forma, tal como se expone en las secciones cinco y seis, se pudo establecer que los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol (**FM48**, **FM49** y **FM52**) presentan una citotoxicidad significativa sobre células Hep-G2, sin afectar a hepatocitos normales; la cual estaría relacionada

con la inducción de apoptosis y mecanismos de muerte celular no apoptóticos, que pueden ser desencadenados por un aumento en la producción de EROs, debido a posibles alteraciones en la actividad enzimática de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial.

Finalmente, estos resultados son un indicio del potencial anticancerígeno de los híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol (**FM48**, **FM49** y **FM52**) y motivan nuevas investigaciones para determinar sus mecanismos de acción para futuras pruebas en modelos *in vivo* y ensayos clínicos contra el tratamiento del hepatocarcinoma.

1. Marco de referencia y antecedentes

1.1 El cáncer en cifras

Se calcula que cada año se presentan en el mundo más de once millones de casos nuevos de cáncer, de los cuales aproximadamente el 80% se presentan en los países menos desarrollados. De acuerdo con el estudio publicado por el Instituto Nacional de Cancerología (INC) para el período de 2000-2006 en Colombia se presentaron anualmente alrededor de 70.887 casos nuevos de cáncer (sin incluir datos sobre el cáncer de piel): 32.316 en hombres y 38.571 en mujeres. En los hombres, la tasa de incidencia ajustada por edad para todos los cánceres incluidos en el estudio fue de 186,6 por 100.000 habitantes, mientras que en las mujeres fue de 196,9. En el año 2010 el 16,9% del total de defunciones en el país fueron ocasionadas por cáncer (33.450), 16.381 en hombres y 17.069 en mujeres (Murillo *et al.*, 2012). En contraste, para el área metropolitana de Bucaramanga las tasas crudas de incidencia de cáncer reportadas en el período 2000-2004 para un tamaño de muestra de 100.000 habitantes por sexo, fueron 98 casos nuevos en hombres y 120 casos nuevos en mujeres (Uribe P. & Meza D., 2007).

De acuerdo con el proyecto GLOBOCAN 2012, el cáncer primario de hígado, principalmente el carcinoma hepatocelular (CHC), afecta significativamente a los países en vía de desarrollo abarcando el 83% de los 782.000 casos nuevos de cáncer reportados a nivel mundial, y representando el quinto tipo de cáncer más común en hombres (554.000 casos, 7,5% del total) y el noveno en mujeres (228.000 casos, 3,4%). Por otro lado, se estima que el CHC es la segunda causa más común de muerte por cáncer en el mundo, siendo responsable de aproximadamente 746.000 muertes (9,1% del total) en el 2012. El número de casos de CHC que se presenta anualmente varía de un país a otro debido a que cada población está expuesta a diferentes factores de riesgo (Carr, 2014).

En el contexto colombiano, el CHC ocupa el quinto lugar en tasas de mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer (3,94%) (GLOBOCAN 2012). Para el año 2011, se reportaron en Colombia 1596 muertes como consecuencia de un tumor maligno de hígado: 753 hombres y 843 mujeres. En el departamento de Santander, las estadísticas sobre la incidencia del cáncer de hígado para el período 2002-2006, indican que anualmente se presentaron 30 casos en hombres y 36 casos en mujeres. Mientras que, en el periodo de 2007-2011 la mortalidad por este tipo de cáncer en el departamento registró 211 muertes de hombres y 178 muertes de mujeres (Instituto Nacional de Cancerología, 2015).

1.2 Carcinoma hepatocelular: riesgos, diagnóstico y tratamiento

La carcinogénesis hepática consiste en una transformación celular que involucra un proceso de múltiples etapas, donde la inflamación crónica del hígado acompañada por ciclos sostenidos de deterioro y regeneración de los hepatocitos promueve el desarrollo de fibrosis hepática, cirrosis y eventualmente, carcinoma hepatocelular (CHC) (Shimoda & Wands, 2012). Al igual que otras neoplasias malignas, el CHC representa una enfermedad en la que se acumulan muchas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores afectando las vías de señales de transducción asociadas con la proliferación y la viabilidad celular, como es el caso de la vía Wnt/ β -catenina, la vía de receptores tirosina-quinasas ErbB/ERK/PI3K y la cascada de señales de receptores de insulina IGF/IRS/ERK/PI3K (Nault & Zucman-Rossi, 2014; Shimoda & Wands, 2012).

Los factores de riesgo más comunes para el desarrollo del CHC incluyen: cicatrización del hígado (cirrosis), infección viral crónica por hepatitis B o hepatitis C, consumo excesivo de alcohol, obesidad y consumo de alimentos que han sido contaminados por toxinas fúngicas

causantes de cáncer (p. ej. Aflatoxina B₁), entre otros (Cardoso *et al.*, 2016; Carr, 2014; Grandhi *et al.*, 2016).

Una vez se ha diagnosticado el CHC sólo el 30-40% de los pacientes se consideran elegibles para recibir un tratamiento potencialmente curativo (grupo 1), incluyendo modalidades como la ablación, la resección quirúrgica y el trasplante de hígado, con una supervivencia esperada ~70% a los 5 años. Consecuentemente, la mayoría de los pacientes diagnosticados con CHC (~70%) no son aptos para recibir tratamientos quirúrgicos y reciben algunas formas de quimioterapia con la esperanza de prolongar su vida, clasificándose en dos grupos: pacientes que son tratables, pero con un estado más avanzado de la enfermedad (grupo 2); y pacientes que tienen un estado muy avanzado y extendido de CHC o con tratamiento previo fallido (grupo 3) (Cao, Phan & Yang, 2012; Carr, 2014).

El CHC es reconocido como uno de los tumores más quimio resistentes, con una tasa total de respuesta a la quimioterapia sistémica (medicamentos administrados directamente en el torrente sanguíneo) inferior al 10%, debido a su eficiencia limitada y al incremento de toxicidad en presencia de cirrosis (Alves *et al.*, 2015; Carr, 2014; Edeline *et al.*, 2009). Los agentes quimioterapéuticos con mayor actividad contra CHC son: la doxorubicina (adriamicina), el cisplatino y el 5-fluorouracilo (figura 1) cuyo mecanismo de acción conduce a daños en el ADN, y presentan mejores resultados cuando se usan en tratamientos combinados ya que pueden alcanzar una tasa de respuesta hasta del 26% frente al 11% que se obtiene en un tratamiento con doxorubicina, por ejemplo (Abou-Alfa, 2006; Cao *et al.*, 2012; Marin *et al.*, 2008).

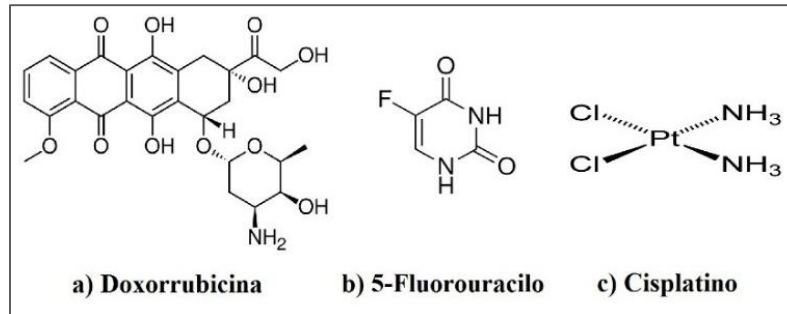


Figura 1. Estructuras químicas de agentes quimioterapéuticos usados para el tratamiento de CHC. Tomadas de Drug Bank, 2016.

Uno de los procedimientos más utilizados para tratar a los pacientes diagnosticados en el grupo 2, que no tienen CHC metastásicos, es la quimioembolización trans-arterial (TACE). Este tratamiento posibilita altas dosis de terapia dirigida, protegiendo el tejido sano del hígado y el resto del cuerpo de la toxicidad implícita al tratamiento. Para ello se emplea lipiodol como agente embolizante (que disminuye o elimina el flujo vascular) en combinación con agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina (Marin *et al.*, 2008). Cuando la quimioembolización o la radioembolización fracasan o son perjudiciales, o cuando hay presencia de CHC metastásico se usa la terapia oral con Sorafenib (figura 2) (Carr, 2014).

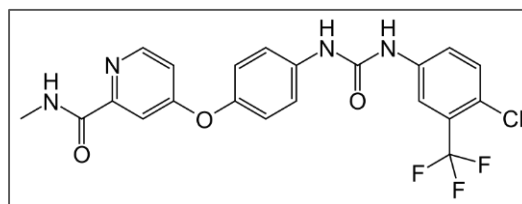


Figura 2. Estructura química del Sorafenib. Tomada de Drug Bank, 2016.

El Sorafenib es el primer inhibidor molecular aprobado por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento del CHC avanzado. Este fármaco es un inhibidor multiquinasas que actúa sobre componentes moleculares de las vías de señales de proteínas quinasas activadas por mitógenos (RAF/MEK/ERK), y sobre el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)/receptor β (Cardoso *et al.*, 2016; Grandhi *et al.*, 2016). Se ha

demostrado que la terapia empleando únicamente Sorafenib reduce en un 31% el riesgo de muerte durante un año y prolonga el promedio de supervivencia y el tiempo de progresión de la enfermedad hasta por tres meses, superando la quimioterapia convencional (Cao *et al.*, 2012; Carr, 2014). Con el objetivo de mejorar su eficacia, el Sorafenib ha sido evaluado en combinación con otros agentes quimioterapéuticos: doxorubicina, octreotida y oxaliplatino; tegafur/uracilo, cisplatino y gemcitabina, evidenciándose un avance en la supervivencia respecto a la monoterapia con Sorafenib, pero en pequeña proporción (Alves *et al.*, 2015).

Por otra parte, también se ha podido determinar que el régimen de gemcitabina más oxaliplatino (GEMOX) (figura 3) podría ser prometedor basado en la ausencia de toxicidad renal y hepática en pacientes con cirrosis, y por su interesante eficacia en pruebas de fase II. Los estudios sugieren que la terapia con GEMOX podría indicarse como un tratamiento de primera línea para pacientes quienes podrían beneficiarse con una disminución en el tamaño del tumor, y que además podría ser una opción terapéutica después de la discontinuación del Sorafenib, en la ausencia de un tratamiento validado de segunda línea (Alves *et al.*, 2015). Sin embargo, ningún régimen ha demostrado ser eficaz en prolongar la supervivencia de los pacientes con CHC. Por lo tanto, el uso de quimioterapia sistémica en CHC aún no es recomendada por las asociaciones científicas (Alves *et al.*, 2015).

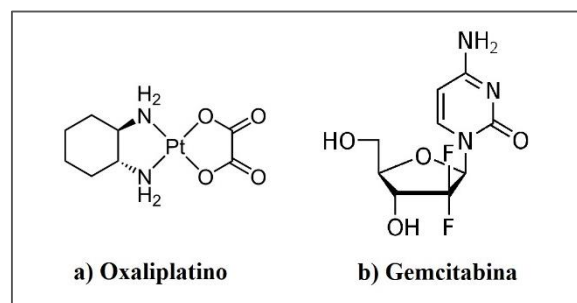


Figura 3. Estructuras químicas de las drogas a) oxaliplatino y b) gemcitabina. Tomadas de Drug Bank, 2016.

Finalmente, cabe resaltar que una limitación importante en la batalla clínica que se libra contra el CHC es la marcada variabilidad de respuesta de estos tumores a la quimioterapia disponible y el desarrollo de resistencia primaria durante el tratamiento. Por lo tanto, es inútil y peligroso para el hígado intentar superar esta resistencia con altas dosis de agentes quimioterapéuticos, especialmente en presencia de daño hepático crónico, como en el caso de la cirrosis, que requiere modificar el tratamiento (Carr, 2014; Marin *et al.*, 2008).

1.3 Línea celular Hep-G2: modelo *in vitro* para estudiar el cáncer de hígado

Hep-G2 (figura 4) es una línea celular de carcinoma de hígado humano usada a menudo como un modelo *in vitro* para el entendimiento de la hepatocarcinogénesis, la detección de agentes citotóxicos, el estudio de dianas farmacológicas, la identificación de disfunciones mitocondriales, el estudio del metabolismo del hígado y la toxicidad de xenobióticos entre otros (Costantini *et al.*, 2013; Kamalian *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2015). Esta línea celular fue obtenida a partir del tejido hepático de un hombre caucásico americano de 15 años de edad con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado, contiene reordenamientos distintivos del cromosoma 1 y otros cromosomas anormales. Las células Hep-G2 poseen una morfología epitelial con propiedades adherentes, crecen en monocapa y tienen un promedio de 55 cromosomas por célula, sin evidencia alguna de genoma del virus de Hepatitis B (ATCC, 2016; Costantini *et al.*, 2013).

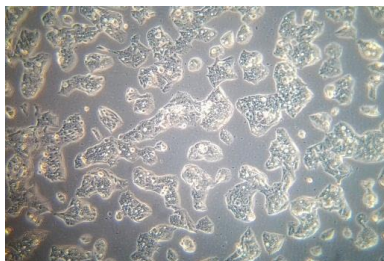


Figura 4. Células Hep-G2. Imagen adquirida en el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, división de Bioquímica Celular.

Se ha demostrado que las células Hep-G2 retienen características asociadas a los hepatocitos, debido a que expresan un perfil proteico con un número considerable de proteínas de plasma típicas de éstos (p. ej. albúmina, la transferrina, alfa 2-macroglobulina, alfa 1-antitripsina, plasminógeno, entre otros) (ATCC, 2016; Qiu *et al.*, 2015). Adicionalmente, las células Hep-G2 expresan la mayoría de las enzimas que metabolizan los fármacos y una gran cantidad de evidencia experimental ha demostrado que estas células responden diferencialmente a los tratamientos farmacológicos dando lugar a diferentes efectos sobre el ciclo celular y los procesos de muerte celular (Qiu *et al.*, 2015).

Por otra parte, se ha identificado que las células Hep-G2 poseen una mutación en el gen de la subunidad *ND6* del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual conlleva a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que actúan como moléculas de señalización protumorigénicas (Gao *et al.*, 2011).

1.4 Compuestos heterocíclicos: andamios moleculares para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer

Para la quimioterapia del cáncer es necesario avanzar en el desarrollo de drogas anticancerígenas con mayor eficiencia y habilidad para mitigar los efectos secundarios. Esto no sólo ha llevado a que los productos naturales sean utilizados como fármacos, sino que también ha inspirado la generación de compuestos sintéticos basados en sus farmacóforos, entre los cuales se destacan compuestos heterocíclicos como las tiazolidinas, las dicetopiperazinas, los isoxazoles y las tetrahydroquinolinas (figura 5). Estos fragmentos estructurales se consideran privilegiados en la química medicinal debido a su amplio espectro de actividad biológica y a su afinidad por diferentes dianas moleculares, resaltando su potencial citotóxico y anticancerígeno (Zhang *et al.*, 2010).

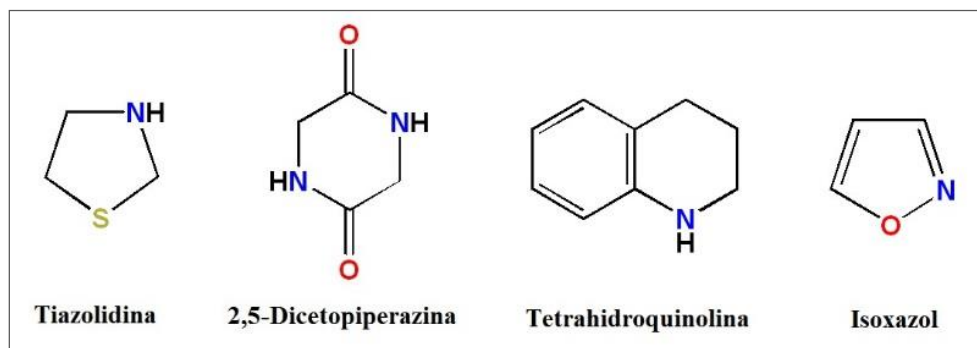


Figura 5. Estructuras químicas de heterociclos con amplio espectro de actividad biológica. Dibujadas en el software ChemBioDraw.

Considerando que, el objeto de estudio de este trabajo comprende la evaluación de la actividad anticancerígena de nuevos híbridos moleculares de tiazolidina-dicetopiperazina y de tetrahydroquinolina isoxazol (Cala Gómez, 2015; Marín Güiza, 2014), cuya actividad biológica no había sido explorada. A continuación, se describen las propiedades citotóxicas que se le han atribuido a diferentes derivados de los heterociclos de tiazolidina, dicetopiperazina, tetrahydroquinolina e isoxazol reportados en la literatura, los cuales se han enumerado de acuerdo al orden de presentación en el texto.

1.4.1 Las tiazolidinas

Las tiazolidinas son una clase de compuestos heterocíclicos que tienen un anillo saturado de cinco miembros con un grupo tioéter y un grupo amino en las posiciones uno y tres (Zhang *et al.*, 2010). Estas moléculas representan un importante andamio molecular, ya que se han relacionado con una serie de respuestas biológicas que incluyen actividades antimicrobiana, antihistamínica, antiinflamatoria, anticonvulsiva, anticancerígena entre otras, presentando un bajo grado de toxicidad. Esto ha conllevado a que los científicos desarrollen una gran variedad de compuestos asociados a la estructura de la tiazolidina, con el propósito de obtener nuevas moléculas con buena actividad farmacológica para el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Pandey *et al.*, 2011).

Compuestos derivados de la tiazolidina (p.ej. las tiazolidin-2,4-dionas, TZDs) han sido implicadas con cascadas de señalización que son altamente reguladas en los cánceres humanos, tales como: quinasas reguladas por señales extracelulares *Raf/MEK (ERK)*, la fosfoinositol 3-quinasa (*PI3K/Akt*) y los receptores activados por proliferadores del peroxisoma, *PPARs* (Asati *et al.*, 2014). Los *PPARs* constituyen un grupo importante de proteínas que pertenecen a la familia de receptores nucleares que funcionan como factores que modulan la transcripción del ADN al unirse a elementos de respuesta específicos de ciertos genes blanco (Asati *et al.*, 2014; Cariou, Charbonnel & Staels, 2012; Parra & Mejía, 2001). Se ha demostrado que las TZDs son posibles agonistas de la isoforma *PPAR γ* que se expresa principalmente en el tejido adiposo y se detecta en una amplia variedad de células cancerígenas (p. ej. pulmón, mama, colon, próstata y vejiga). El mecanismo de acción de estos heterociclos sobre dichos receptores, promueve una alta regulación de proteínas de señales de transducción como *Raf* y *PI3K* inhibiendo la proliferación y diferenciación celular (Asati *et al.*, 2014). Es así como estos derivados de la tiazolidina juegan un importante rol en el efecto antitumoral por la inducción de mecanismos antiproliferativos como la apoptosis y la detención del ciclo celular tanto de forma dependiente como independiente de *PPAR γ* (Cariou *et al.*, 2012). Sin embargo, no está claro el mecanismo por el cual los ligandos *PPAR γ* inhiben el crecimiento de las células cancerígenas (Asati *et al.*, 2014).

También se ha determinado que diferentes derivados de la tiazolidina tienen efectos sobre las mitocondrias mediante una posible interacción con proteínas como Mitoneet, o por acciones directas con los complejos respiratorios deteriorando la respiración oxidativa y activando múltiples cascadas de señal *downstream*. La disminución de la función mitocondrial conduce rápidamente a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y al agotamiento del trifosfato de adenosina (ATP), lo que sucesivamente puede activar la proteína quinasa activada por el monofosfato de

adenosina, AMP (*AMPK*) e inducir una respuesta al estrés que puede contribuir a la apoptosis, un mecanismo de muerte celular clave para el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Feinstein *et al.*, 2005).

La combinación de la tiazolidina con otros heterociclos ha sido una aproximación útil para la construcción de nuevas moléculas, ayudando a obtener nuevos perfiles farmacológicos como mayor selectividad y menor toxicidad. La literatura muestra que se han sintetizado una gran variedad de derivados de la tiazolidina a los que se le ha evaluado su actividad anticancerígena.

Tal es el caso de compuestos como las amidas 2-ariltiazolidin-4-ácido carboxílico (ATCAAs) que mostraron ser potentes agentes citotóxicos contra el cáncer de próstata, siendo el compuesto **1** (figura 6) el más citotóxico al presentar la menor concentración para inhibir el crecimiento del 50% de la población celular (CI_{50}), con un valor de 0,55 μ M. Su estudio de relación estructura actividad (*SAR*) reveló que la posición de los sustituyentes sobre el fenilo y el centro de tiazolidina estaban altamente correlacionados con su actividad anticancerígena, proponiendo como posible mecanismo de acción la inducción de apoptosis (Gududuru *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Posteriormente, para mejorar la selectividad y la potencia de los compuestos ATCAAs, Li y colaboradores sintetizaron nuevas series de análogos que tuvieron una potente actividad antiproliferativa y selectiva contra células de melanoma, siendo el compuesto **2** (figura 6) más selectivo que el Sorafenib. El estudio *SAR* reveló que tanto la longitud como la composición de la cadena lateral son críticas para su actividad, y que la selectividad tiene una fuerte dependencia de las sustituciones en el anillo fenilo. Cabe resaltar que todos los análogos ATCCAs que se han reportado han sido preparados y testeados como mezclas diastereoméricas (Zhang *et al.*, 2010).

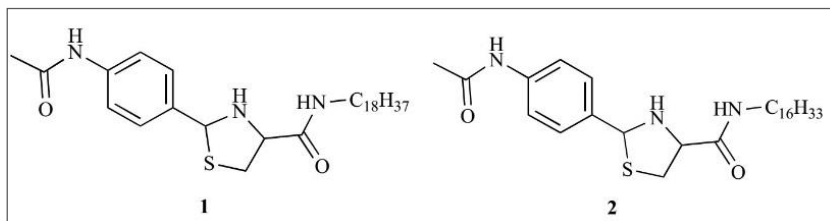


Figura 6. Estructura química de los compuestos ATCCA **1** y **2**.
Tomada de Zhang *et al.*, 2010.

Además, se determinó que amidas de 2,4-tiazolidindiona-5-ácido acético como **3** (figura 7) inhiben la proliferación (CI_{50}) de las líneas celulares de cáncer de cérvix HeLa (33 μM), de adenocarcinoma de colon HT29 (35 μM), de adenocarcinoma de mama MCF-7 (36 μM) y de carcinoma de pulmón A549 (30 μM) (Alegaon & Alagawadi, 2012).

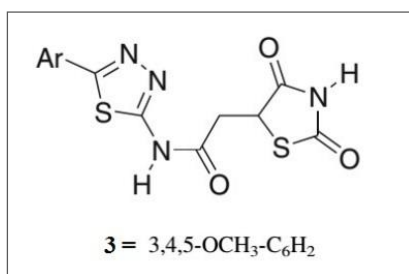


Figura 7. Derivado **3** de la tiazolidina.
Tomada de Alegaon & Alagawadi, 2012.

Por su parte, el compuesto **4** (figura 8) derivado de [4-((oxiacetamida)tiazolidin-3-il)2,7-dimetil-1,8-naftiridina] mostró una alta actividad inhibitoria contra la línea celular Hep-G2 (concentración inhibitoria, CI_{50} de 0,041 μM) (Ahmed, Alfooty & Khalifah, 2014). Mientras que el compuesto **5** (figura 8), derivado de la bistiazolidinona, presentó una potente actividad anticancerígena contra la línea celular de hepatocarcinoma humano Hep-G2 (CI_{50} de 7,5 μM), además de su capacidad para detener el ciclo celular en la fase G2/M en células Hep-G2 y en la fase G0/G1 en células de carcinoma de cérvix Siha (Avecilla *et al.*, 2017).

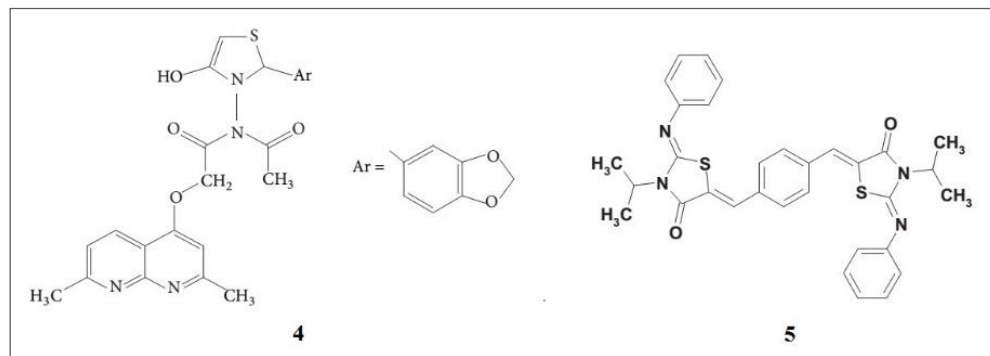


Figura 8. Moléculas **4** y **5** que incorporan la tiazolidina.

Tomada de Ahmed *et al.*, 2014; AVECILLA *et al.*, 2017.

También se encuentran estudios recientes sobre derivados del tiazol como el de Mohammadi-Farani y colaboradores quienes sintetizaron una nueva serie de derivados 2-feniltiazol-4-carboxamidas **6** (figura 9) cuya actividad anticancerígena se evaluó *in vitro* en líneas celulares de cáncer humano SKNMC (neuroblastoma), Hep-G2 y MCF-7. Los ensayos de citotoxicidad indicaron que el derivado *para*-nitro (R= 4-NO₂) y el análogo *meta*-cloro (R= 3-Cl) ejercieron la actividad inhibitoria más alta sobre las células SKNMC (CI₅₀ de 11,6 μM) y Hep-G2 (CI₅₀ de 10,8 μM) (Mohammadi-Farani *et al.*, 2014). Por otra parte, Zaharia y colaboradores encontraron que *p*-toluensulfonil-hidrazinotiazoles **7** (figura 9) con sustituyentes metilo, fenilo y acetilo, y derivados *p*-toluensulfonil *N,N*-diacetil-hidrazinotiazoles con sustituyente metilo tenían actividad cancerígena significativa (CI₅₀ < 10 μM) contra células de próstata (DU-145) y de hepatocarcinoma (Hep-G2) (Zaharia *et al.*, 2010).

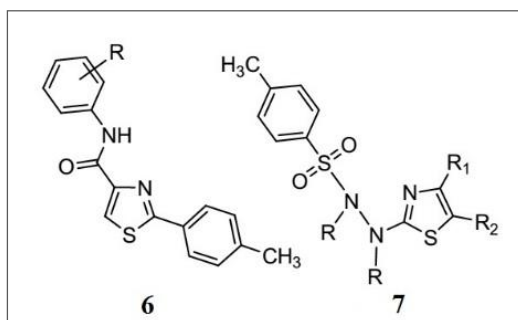


Figura 9. Estructuras **6** y **7** derivadas del tiazol.

Tomadas de Mohammadi-Farani *et al.*, 2014; Zaharia *et al.*, 2010.

1.4.2 Las dicetopiperazinas

Aunque las piperazinas han sido conocidas por más de un siglo, sólo recientemente las 2,5-dicetopiperazinas han llamado la atención debido a que su peculiar sistema heterocíclico se encuentra en varios productos naturales que constituyen una fuente novedosa de compuestos biológicamente activos. El amplio espectro de propiedades biológicas de las 2,5-dicetopiperazinas (p. ej. antitumoral, antiviral, antifúngica, antibacteriana) las ha convertido en un andamio importante para el diseño y síntesis de nuevos agentes terapéuticos, que en combinación con estructuras químicas simples han demostrado tener potencial activo (Martins & Carvalho, 2007). Un ejemplo significativo es la plinabulina (figura 10), molécula semisintética desarrollada de la fenilhistina natural (figura 10), que además de ser un agente de alteración vascular se halla en pruebas clínicas de fase dos como una droga anticancerígena (Liao *et al.*, 2014).

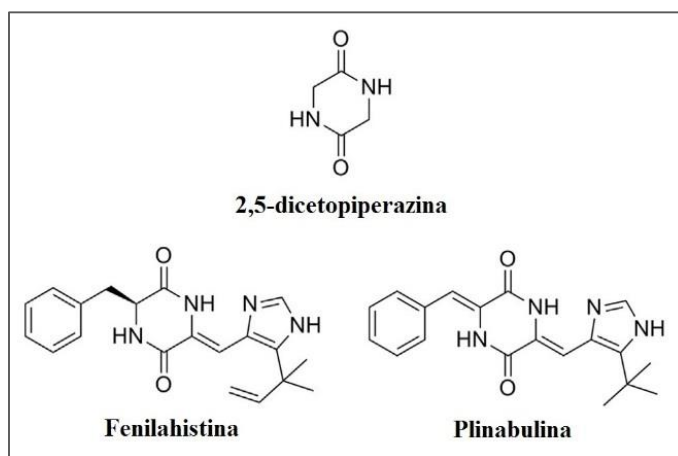


Figura 10. Estructura química de la 2,5-dicetopiperazina y algunos de sus derivados.
Tomada de Liao *et al.*, 2014.

Algunas de las propiedades químicas más interesantes de las 2,5-dicetopiperazinas para la química medicinal son su resistencia a proteólisis, la imitación de grupos farmacóforos peptídicos, la estereoquímica de los grupos sustituyentes (definida y controlada en un máximo de cuatro combinaciones), la rigidez conformacional, y los grupos aceptores y donadores para la formación

de enlaces de hidrógeno (favoreciendo las interacciones con receptores biológicos). Esto les concede características farmacodinámicas y farmacocinéticas favorables (Martins & Carvalho, 2007; Milne & Kilian, 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que los dipeptidos cíclicos, como las 2,5-dicetopiperazinas, tienen potencial anticancerígeno mediando la activación de los sistemas celulares que pueden estimular la reparación del ADN dañado, y/o la erradicación definitiva de las células dañadas a través de la apoptosis (Milne & Kilian, 2010). Por este motivo, las 2,5-dicetopiperazinas se han convertido en estructuras privilegiadas para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para tratar enfermedades como el cáncer.

Considerando que los derivados no protegidos de 2,5-dicetopiperazina tienen baja solubilidad, Liao y colaboradores diseñaron y sintetizaron nuevos derivados mono protegidos de la 2,5-dicetopiperazina, donde el compuesto **8** (figura 11) tuvo una fuerte actividad anticancerígena con CI_{50} entre 0,5-4,5 μ M sobre líneas celulares de cáncer gástrico BGC-823, cáncer de cérvix (HeLa), hepatocarcinoma (Huh-7), cáncer de mama (MCF-7), adenocarcinoma de pulmón (H1975), y especialmente sobre células de linfoma pulmonar U937 (CI_{50} = 0,5 μ M) y células de leucemia K562 (CI_{50} = 0,9 μ M) (S. Liao *et al.*, 2014).

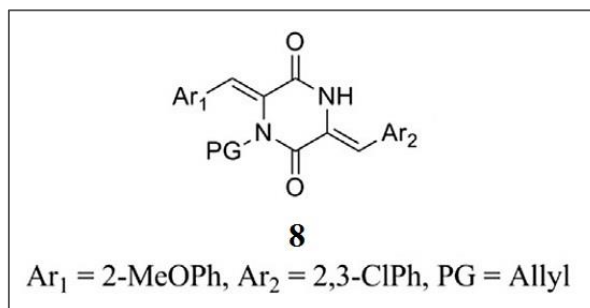


Figura 11. Estructura química del derivado **8** de la 2,5-dicetopiperazina.
 Tomada de Liao *et al.*, 2014.

Por otra parte, Mollica y colaboradores demostraron que el derivado natural de la 2,5-dicetopiperazina, desoximiceliamida, compuesto **9** (figura 12), presenta una potente actividad

anticancerígena con valores de CI_{50} en el rango de 2 a 23 μM sobre líneas celulares de glioma humano Hs683 y U373, de cáncer de pulmón humano A549, de melanoma humano SKMEL-28, de adenocarcinoma de mama MCF-7 y de melanoma murino B16F10. También se resaltó la importancia de la presencia de la cadena lateral geraniloxil y el doble enlace exocíclico de la 2,5-dicetopiperazina para la actividad observada (Mollica *et al.*, 2014).

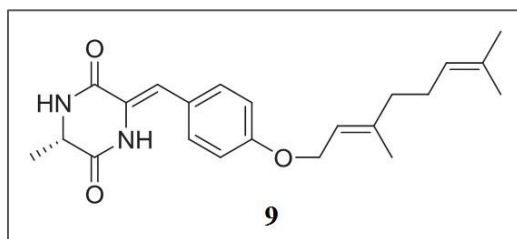


Figura 12. Derivado natural **9** de la 2,5-dicetopiperazina.
Tomada de Mollica *et al.*, 2014.

En un trabajo más reciente se diseñaron y sintetizaron nuevas series de derivados *N*-1-monoalilados de la 2,5-dicetopiperazina (figura 13) a los cuales se les evaluó su actividad citotóxica sobre ocho líneas celulares de cáncer (glioma U937, leucemia K562 y HL60, carcinoma pulmonar A549, adenocarcinoma de mama MCF-7, cáncer cervical HeLa, cáncer de próstata DU145 y de colon HT29). Los resultados de citotoxicidad mostraron que la posición del grupo metoxi en el anillo fenilo es importante para la actividad, ya que la sustitución con el grupo 4-metoxifenil fue mejor que con el grupo 2-metoxifenil, y se observó que la cadena alquílica con 3 a 6 grupos metileno benefició la actividad. Acorde con esto, el derivado **3c** (figura 13) con el grupo 4-metoxifenil y la cadena lateral de pentilideno fue el que exhibió mayor actividad inhibitoria contra las líneas celulares de cáncer testeadas (CI_{50} = 0,36-1,9 μM), evidenciándose la inducción de apoptosis en células de glioma U937 después de 48 horas de tratamiento a la concentración de 1 μM (Liao *et al.*, 2016).

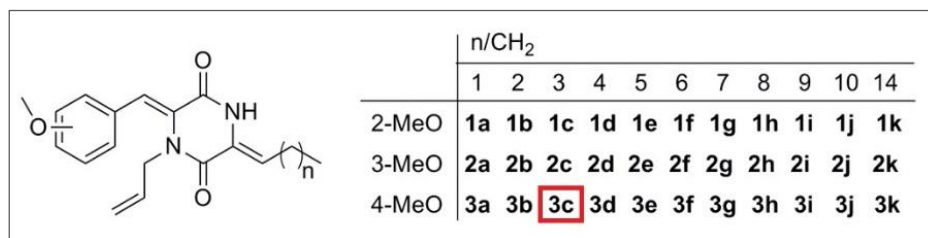


Figura 13. Derivados N-1-monoalilados de la 2,5-diketopiperazina. Tomada de Liao *et al.*, 2016.

1.4.3 Las tetrahydroquinolinas

El sistema de anillo de la tetrahydroquinolina (THQ), es un motivo estructural muy común y se encuentra en numerosos productos naturales biológicamente activos y en agentes terapéuticos farmacológicamente relevantes. Debido a su importancia para el desarrollo de drogas y la química medicinal, se continúa trabajando en nuevas metodologías para la síntesis de derivados de tetrahydroquinolina que sean muy activos en un campo específico de investigación (Sridharan, Suryavanshi, & Men, 2011).

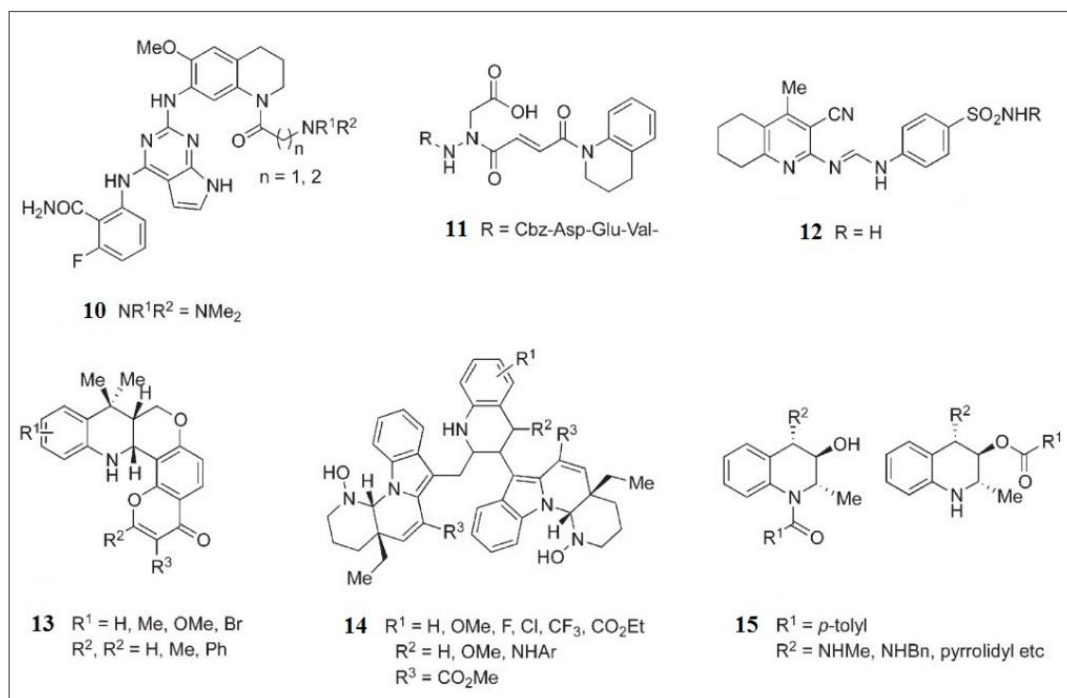


Figura 14. Derivados de tetrahydroquinolina con actividad anticancerígena. Tomada de Sridharan *et al.*, 2011.

En lo que respecta a la quimioterapia del cáncer, diferentes derivados de THQ han demostrado ser inhibidores de receptores tirosina-quinasa IGF-1R (**10**), de caspasas (**11**) y de quinasas dependientes de ciclina CDKs (**12**, **13** y **14**) (figura 14). Además se cuenta con derivados 2-metiltetrahidroquinolina como **15** que tienen una actividad moduladora en la resistencia multidroga (MDR), que representa uno de los principales obstáculos para una quimioterapia satisfactoria del cáncer (Sridharan *et al.*, 2011).

También se encuentran derivados de THQ que actúan como inhibidores de las anhidrasas carbónicas (CAs), como el compuesto **16** (figura 15) que tiene potencial actividad anticancerígena *in vitro* contra células de cáncer de mama MCF-7 (Ghorab, Ragab & Hamed, 2009). Las CAs son metaloenzimas de zinc que catalizan la hidratación reversible del dióxido de carbono para generar bicarbonato y protones, y están involucradas en la regulación del pH, la secreción de electrolitos, las reacciones biosintéticas que requieren como sustratos CO₂/bicarbonato tales como la gluconeogénesis, lipogénesis, ureagénesis y la síntesis de pirimidinas. Por lo tanto, la inhibición de las CAs juega un rol importante en el tratamiento del cáncer mediante la reducción de la provisión de bicarbonato para la síntesis de nucleótidos y de otros componentes celulares como los lípidos de membrana (Afzal *et al.*, 2014).

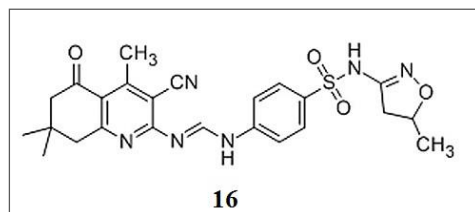


Figura 15. Derivado de THQ inhibidor de anhidrasas carbónicas (CAs).
Tomada de Afzal *et al.*, 2014.

Adicionalmente, Faidallah & Rostom sintetizaron una serie de nuevos derivados de THQ que se comportan como agentes intercaladores del ADN, siendo el compuesto **17** (figura 16) el más

activo con un amplio espectro de inhibición del crecimiento de diferentes líneas celulares de cáncer ($CI_{50}= 46,9 \mu\text{M}$) y de actividad antitumoral, en ambos casos con una buena afinidad por el ADN (Afzal *et al.*, 2014).

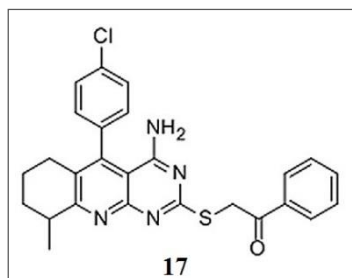


Figura 16. Derivado de THQ **17** intercalador de ADN.
Tomada de Afzal *et al.*, 2014.

Compuestos de tipo 1,2,3,4-tetrahidroquin-8-ol como la estructura **18** (figura 17) son citotóxicos para diferentes líneas celulares de cáncer humano (cáncer de pulmón A549, cáncer de mama MDA-MB-231, sarcoma SaoS2, hepatoma SKHep-1 y carcinoma hepatocelular Hep3B) con valores de CI_{50} en el rango de 12,9 a 32,5 μM . Confirmando la inducción de apoptosis del compuesto **18** (30 μM) sobre células Hep3B, debido a los cambios morfológicos y a la reversión de la actividad cuando se incubaban previamente con inhibidores de caspasas (Lam *et al.*, 2013).

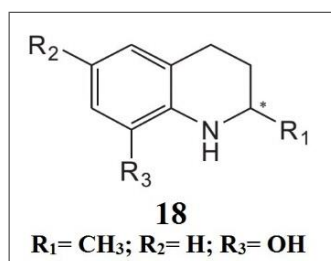


Figura 17. Derivado de THQ **18**.
Tomada de Lam *et al.*, 2013.

Recientemente se ha comprobado que diferentes derivados de la THQ actúan como inhibidores de proteínas que contienen bromodominios (BCPs) y de histonas desacetilasas (HDACs) las cuales constituyen moduladores epigenéticos que han emergido como dianas prometedoras para fines

terapéuticos, convirtiéndose en objetivos para la generación de nuevas drogas anticancerígenas (Zhang *et al.*, 2016).

Los bromodominios (BRD) son lectores de cromatina que reclutan enzimas reguladoras de cromatina, incluyendo aquellas que “escriben” y “borran” modificaciones en las histonas para orientar y regular la expresión génica. La desregulación de bromodominios extraterminales (BETs) en la familia de BCPs (p. ej. BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) ha sido implicada en el desarrollo de cánceres tales como el carcinoma de línea media NUT y la leucemia mieloide aguda (AML). No obstante, se ha demostrado que los inhibidores de BET pueden bloquear la proliferación de células cancerígenas e inducir apoptosis en un amplio rango de tipos de tumores (Z. Zhang *et al.*, 2016). Ejemplo de ello se tienen los derivados de THQ nombrados I-BET726 e I-BET295 (figura 18), que exhiben una excelente selectividad por el BET de una amplia familia de BCPs (Atkinson *et al.*, 2014).

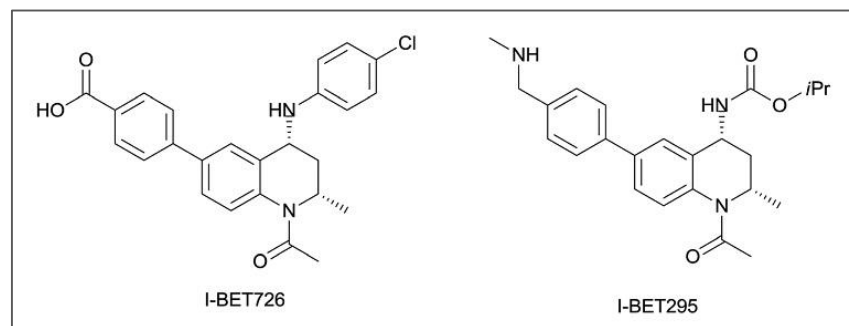


Figura 18. Derivados de tetrahidroquinolina denominados por los autores I-BET726 y I-BET295. Tomada de Atkinson *et al.*, 2014.

Por su parte, las HDACs son “borradores” epigenéticos que catalizan la remoción de los grupos acetilo de los residuos de lisina sobre la estructura de la histona para inducir la condensación de la cromatina y de esta forma inhibir la transcripción. Las HDACs juegan un papel clave en la coordinación de la interacción de vías de señales intracelulares con el remodelamiento de la cromatina y la función del factor de transcripción para mediar específicamente la expresión génica

durante la activación, la proliferación y la diferenciación celular. Una gran cantidad de evidencia apunta a que la desregulación de la actividad de las HDACs está relacionada con muchas enfermedades oncológicas y no oncológicas, teniendo en cuenta que la acetilación de las histonas también promueve la transcripción por la unión a proteínas implicadas en la activación genética, tales como las BCPs (Z. Zhang *et al.*, 2016).

Un ejemplo de compuestos con potencial inhibitorio sobre la actividad HDAC es el derivado de THQ **19** con un grupo 4'-OMe (figura 19), el cual exhibe una actividad antiproliferativa considerable contra células de hepatocarcinoma humano Hep3B, cáncer de colon HTC116, adenocarcinoma de pulmón A549 y células de carcinoma de próstata PC-3 (Liu *et al.*, 2014).

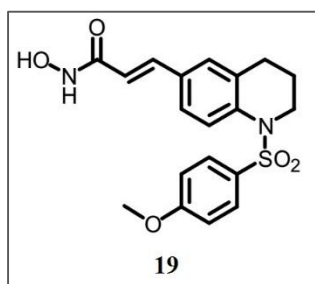


Figura 19. Derivado de THQ **19** inhibidor de HDAC.
Tomada de Liu *et al.*, 2014.

Diferentes estudios han sugerido que los inhibidores de BETs y HDACs inducen efectos genéticos y biológicos similares, y actúan en sinergia para matar células de linfoma murino. Por lo tanto, la combinación de inhibidores de HDACs y de BETs podría ser una aproximación factible para el desarrollo de drogas contra el cáncer (Z. Zhang *et al.*, 2016). Esto motivó a Atkinson y colaboradores a desarrollar una pequeña molécula con actividad dual BRD/HDAC (llamada DUAL946, figura 20) por la fusión de un centro de THQ activo sobre BRD con un motivo de ácido hidroxámico inhibidor de HDAC. DUAL 946 inhibió tanto a BET como a proteínas HDAC de clase I y IIb, y su actividad se confirmó al observar la inhibición del crecimiento de células NMC

y AML, acompañada por la inhibición del factor de necrosis tumoral, $TNF\alpha$ (Atkinson *et al.*, 2014).

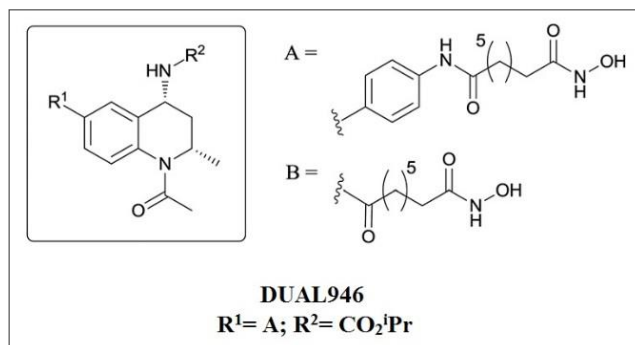


Figura 20. Inhibidor dual BET/HDAC denominado DUAL946.
Tomada de Atkinson *et al.*, 2014.

1.4.4 Los isoxazoles

Los isoxazoles son potenciales farmacóforos dotados de actividad: anticancerígena, neuroprotectora, anti-obesidad, antidepresiva, insecticida, antidiabética y anti-inflamatoria (Chouaib *et al.*, 2016; Tzanetou *et al.*, 2014).

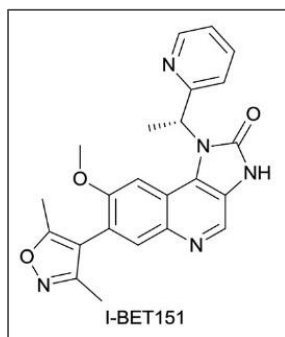


Figura 21. Dimetilisoxazol I-BET151.
Tomada de Atkinson *et al.*, 2014.

Al igual que las THQ, estructuras derivadas del isoxazol pueden actuar como inhibidores de BET y de HDAC (Neelarapu *et al.*, 2011). Recientemente, se ha probado que los dimetilisoxazoles son efectivos para la inhibición de BET, siendo I-BET151 (figura 21) un derivado representativo de esta serie, el cual tiene propiedades farmacocinéticas tales como biodisponibilidad y vida media.

Esto sugiere que los derivados dimetilisoxazoles representan un buen punto de inicio para la exploración de nuevos compuestos activos para la terapia del cáncer (Zhang *et al.*, 2016).

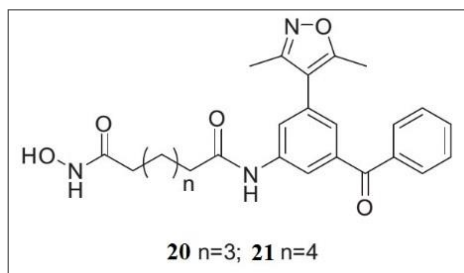


Figura 22. Derivados de isoxazol **20** y **21**.
Tomada de Z. Zhang *et al.*, 2016.

También se encuentran inhibidores duales BRD/HDAC, como los compuestos **20** y **21** (figura 22) que poseen potente actividad antiproliferativa contra líneas celulares de leucemia humana K562 y MV4-11 (Zhang *et al.*, 2016).

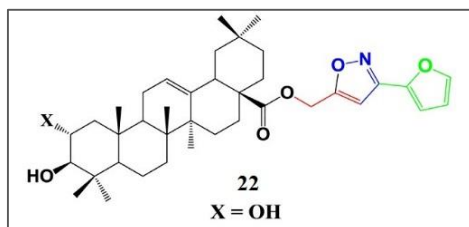


Figura 23. Compuesto **22**.
Tomada de Shouaib *et al.*, 2016.

Por otra parte, compuestos como **22** (figura 23) que tienen el motivo isoxazol, no sólo exhiben una actividad anticancerígena significativa sobre las líneas celulares de cáncer mamario murino EMT-6 y adenocarcinoma colorrectal humano SW480, sino que presentan una alta actividad anti-inflamatoria (Chouaib *et al.*, 2016). Mientras que, moléculas como **23** y **24** (figura 24) tienen mejor actividad contra células de cáncer de próstata PC-3 con CI_{50} de 8,2 y 13,6 μ M, respectivamente (Rehman *et al.*, 2014).

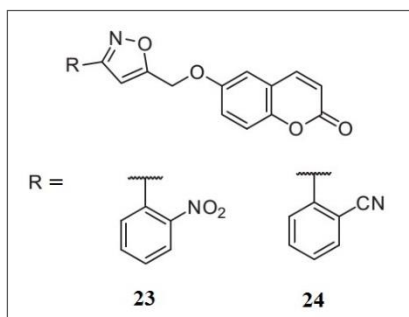


Figura 24. Derivados del isoxazol **23** y **24**.
Tomada de Rehman *et al.*, 2014.

1.5 Mecanismos de muerte celular y su rol en el tratamiento del cáncer

La eliminación de las células no deseadas o dañadas a través de la muerte celular es esencial para los procesos biológicos fundamentales tales como el desarrollo animal, la homeostasis del tejido y la respuesta al estrés. Por lo tanto, su desregulación contribuye a la generación de un gran número de enfermedades humanas como el cáncer y la inflamación. Durante la transformación oncogénica, las células neoplásicas se vuelven resistentes a la muerte celular, lo que permite que sobrevivan y adquieran mutaciones oncogénicas adicionales. Esto ha convertido a las vías de señalización de muerte celular en objetivos estratégicos para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer (D. Chen & Zhang, 2016; Meng *et al.*, 2016).

La muerte celular puede clasificarse en varias formas de acuerdo con sus características morfológicas y bioquímicas, incluyendo apoptosis, necrosis y autofagia, las cuales a menudo se encuentran reguladas por vías de señalización similares, participan en sitios subcelulares y organelos comunes, e incluso comparten moléculas iniciadoras y efectoras (Nikoletopoulou *et al.*, 2013). La apoptosis y la necrosis representan las dos modalidades de muerte celular más distintivas y mejor entendidas; dependiendo del contexto celular y el disparador de muerte, ambos procesos suelen cooperar en una interacción equilibrada que involucra la autofagia, o actúan de forma complementaria para facilitar la destrucción celular (Chaabane *et al.*, 2013; Nikoletopoulou *et al.*,

2013). Inicialmente la apoptosis se consideraba el único proceso de muerte celular programada, altamente regulado, mientras que la necrosis se describía como un proceso pasivo y aleatorio sin mucha regulación. No obstante, esta visión cambió en las dos últimas décadas debido a diferentes estudios que condujeron a la identificación de formas reguladas de necrosis, como la necroptosis; donde la evidencia acumulada indica que la necroptosis funciona como un mecanismo guardián para matar las células cancerosas que no mueren por apoptosis, sugiriendo su papel fundamental en la biología y la terapia del cáncer (Chen & Zhang, 2016; Su *et al.*, 2016).

1.5.1 La apoptosis: principal mecanismo de muerte en la terapia contra el cáncer

El mecanismo de muerte celular programada más común y mejor comprendido es la apoptosis, un proceso biológico esencial y crítico para la embriogénesis y la homeostasis de los tejidos (Goodman, 2008; Rang *et al.*, 2015). La apoptosis depende de una cascada de cisteína proteasas llamadas caspasas, que están presentes en las células en su forma inactiva (zimógeno). Éstas se clasifican en caspasas iniciadoras (p. ej. caspasa 8) que convergen en un conjunto de caspasas efectoras (p. ej. caspasa 3) provocando el evento apoptótico (Goodman, 2008; Rang *et al.*, 2015). La activación de estas caspasas efectoras depende de dos vías principales: la vía extrínseca (también conocida como vía mediada por receptores de muerte) la cual juega un importante rol en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos; y la vía intrínseca (o vía mitocondrial) que usualmente responde a señales externas como la pérdida del factor trófico y a daños internos como daños en el ADN (Goodman, 2008; Rang *et al.*, 2015). Como consecuencia de la activación de las caspasas, la célula se transforma en un agregado de moléculas unidas a la membrana, las cuales son reconocidas por los macrófagos que terminan fagocitando los restos celulares (Rang *et al.*, 2015).

Numerosas evidencias sugieren que muchas enfermedades del hígado, entre ellas el cáncer, están asociadas con un proceso de apoptosis disfuncional de los hepatocitos (células principales que integran el hígado). Por esta razón, conocer los mecanismos moleculares de la apoptosis, no sólo permite comprender la naturaleza de las enfermedades hepáticas (como el cáncer), sino también facilita el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Shi *et al.*, 2010).

1.5.1.1 Mecanismos moleculares de la apoptosis

La apoptosis hepática puede ser inducida a través de la vía extrínseca o intrínseca, como se muestra en la figura 25. La vía extrínseca o de receptores de muerte es iniciada en la membrana celular por la unión de ligandos extracelulares a dicha familia de receptores. Entre estos se destacan el factor de necrosis tumoral (*TNF- α*), el ligando *Fas* (p. ej. *FasL*) y el factor de necrosis tumoral asociado a ligandos inductores de apoptosis (*TRAIL*). Los receptores de muerte son altamente expresados en los hepatocitos, quizás debido a la presión evolutiva para eliminar los virus hepatótrofos. Por otra parte, la vía intrínseca o mitocondrial se amplifica en el citosol por una serie de consecuencias intracelulares como daño del ADN, ausencia de factores de crecimiento y trastornos metabólicos. Estas dos vías están estrechamente relacionadas, ya que a menudo se requiere la vía mitocondrial para amplificar las señales de muerte apoptótica relativamente débiles inducidas por la vía extrínseca (Shi *et al.*, 2010).

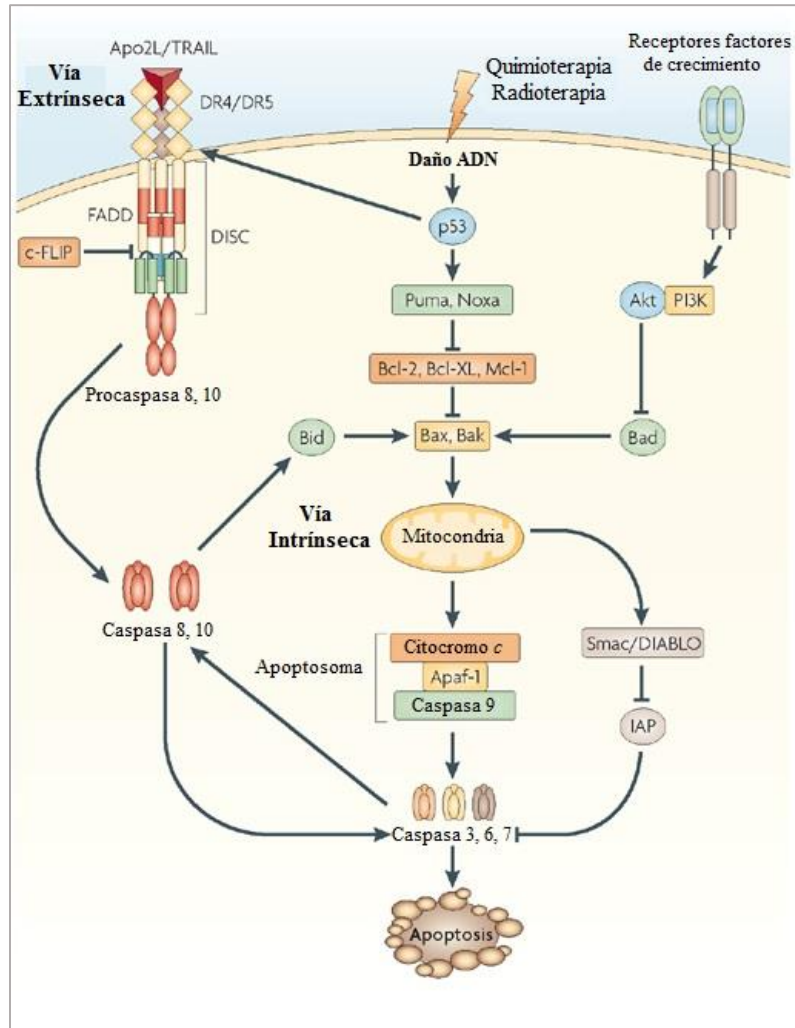


Figura 25. Pasos claves en las vías de señales apoptóticas extrínseca e intrínseca. La vía intrínseca es activada por p53 regulando positivamente a *Noxa* y *Puma*, las cuales activan a *Bax* y *Bak* promoviendo la liberación del citocromo *c* mitocondrial que se une al adaptador *Apaf-1* para reclutar a la procaspasa iniciadora 9 en un complejo denominado apoptosoma. La caspasa 9 activada regula positivamente a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 desencadenando la apoptosis. Las proteínas mitocondriales *Smac/DIABLO* incrementan la apoptosis al unirse a las proteínas inhibidoras de apoptosis (*IAP*), revirtiendo su control sobre varias caspasas. En presencia de factores de crecimiento, la quinasa *Akt* inhibe la vía intrínseca por la fosforilación de *Bad*. Por otra parte, la vía extrínseca se da en respuesta a ligandos pro-apoptóticos como *Apo2-L/TRAIL* que se unen a receptores pro-apoptóticos *DR4* y/o *DR5* en la superficie de la membrana celular, induciendo el reclutamiento del dominio de muerte asociado a la proteína adaptadora *Fas (FADD)* y las procaspasas iniciadoras 8 y 10, formando el complejo inductor de señalización de muerte *DISC*. Esto conduce a la activación autocatalítica de las caspasas que se liberan en el citoplasma y activan las caspasas efectoras 3,6 y 7 dando inicio a la apoptosis. Finalmente, aunque las vías extrínseca e intrínseca pueden ocurrir de manera separada, también se pueden relacionar por la activación de *p53* y por la regulación positiva de la caspasa-8 sobre *Bid*, que subsecuentemente estimula a *Bax* y *Bak* para involucrar la vía intrínseca. Adaptado de Ashkenazi, 2008.

1.5.1.1.1 Apoptosis mediada por los receptores de muerte (vía extrínseca)

Los receptores de muerte *Fas*, el receptor del factor de necrosis tumoral-1 (*TNFR1*) y los receptores *TRAIL* han sido investigados arduamente en las enfermedades del hígado. Los receptores *Fas* están ampliamente expresados en diferentes tipos de células hepáticas incluyendo los hepatocitos (Shi *et al.*, 2010). La vía extrínseca es activada por la adhesión de un ligando (*FasL*) al receptor *Fas*, seguido por la unión secuencial de: la proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte asociado a la proteína *Fas* (llamada *FADD*), y la procaspasa 8. Este conjunto de moléculas forma el complejo de señales inductoras de muerte (*DISC*), que activa la caspasa 8 a través de la proteólisis de la procaspasa 8 (Goodman, 2008). *DISC* está modulado por varios mecanismos inhibitorios, incluyendo *c-FLIP*, que al interactuar con *FADD*, bloquea el proceso de activación de las caspasas (figura 25) (Ashkenazi, 2008).

Se han definido dos tipos de células de acuerdo a la respuesta apoptótica cuando *Fas* activa la vía de señales de muerte celular. En las células tipo I, la caspasa 8 y probablemente la caspasa 10 son activadas después de la formación del complejo *DISC*, de forma que la caspasa 8 puede activar directamente las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7). Mientras que en las células tipo II, como los hepatocitos, se requiere la participación mitocondrial para amplificar la señal de los receptores de muerte. En los hepatocitos, pequeñas cantidades de caspasa 8 escinden el dominio *BH3* de la proteína *Bid*, generando la *Bid* truncada (*tBid*) que se transloca a la mitocondria e induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial promoviendo la liberación de citocromo *c* y caspasa 9, y activando las caspasas efectoras que dan lugar a la apoptosis (Shi *et al.*, 2010).

Bajo ciertas circunstancias, la citosina pro inflamatoria *TNF- α* producida por macrófagos activos, puede actuar como un ligando proapoptótico del receptor de *TNFI* (*TNFR1*),

desencadenando la señalización apoptótica en los hepatocitos. No obstante, la principal función fisiológica de *TNF- α* no es promover la apoptosis, sino participar en la vía de supervivencia (supresión de la activación de caspasas y moléculas proapoptóticas) mediada por el factor nuclear kappa B (*NF- κ B*). De manera que, la estimulación de la apoptosis por *TNF- α* sólo se produce si se bloquea la actividad de *NF- κ B* (Ashkenazi, 2008; Shi *et al.*, 2010).

Por otra parte, el ligando *TRAIL* puede unirse a sus receptores de muerte afines *DR4* y *DR5* (regulados por *p53*), y a los receptores “señuelo” *DcR1* y *DcR2*. Tras esta unión, la apoptosis se induce rápidamente en las células de cáncer humano, pero no en células normales como los hepatocitos. No obstante, *TRAIL* puede sensibilizar a los hepatocitos infectados con virus de la hepatitis B o C a seguir un proceso de apoptosis mediado por la caspasa 9 y la vía mitocondrial (Shi *et al.*, 2010).

1.5.1.1.2 Vía de apoptosis mitocondrial (vía intrínseca)

La disfunción de las mitocondrias juega un papel esencial en la apoptosis de los hepatocitos. Varias proteínas pro-apoptóticas que residen en el espacio intermembrana de las mitocondrias son esenciales para la apoptosis independiente y dependiente de las caspasas. La permeabilización de la membrana externa de la mitocondria causa la liberación de proteínas proapoptóticas incluyendo el citocromo *c*, el factor inductor de apoptosis (*AIF*) y la endonucleasa G. El citocromo *c*, el factor activador de la proteasa apoptótica (*APAF-1*) y la procaspasa 9 forman un complejo conocido como apoptosoma, resultando en la activación de la caspasa 9 y garantizando la ejecución de la apoptosis (figura 25). Simultáneamente, *Smac/DIABLO* (segundo activador de caspasas derivado de las mitocondrias/proteínas de unión con bajo pI asociada a inhibidores de proteínas apoptóticas, *IAP*) y la serina proteasa *Omi* (o *HtrA2*, proteína A2 que requiere alta temperatura) son liberadas

para promover la activación de las caspasas debido a antagonistas de los inhibidores de proteínas apoptóticas (*IAPs*) (Guicciardi *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2010).

La vía mitocondrial es regulada por los miembros de la familia *Bcl-2* que comprende la subfamilia de proteínas anti-apoptóticas como *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *A1* y *Mcl-1*; y las subfamilias de proteínas pro-apoptóticas: agrupadas en multidominios homólogos de la proteína *Bcl-2* (*BH*) como *Bax*, *Bak* y *Bok*; y aquellas proteínas que sólo presentan homología con el dominio *BH3* (*Bad*, *Bik*, *Bid*, *Puma*, *Bim*, *Bmf* y *Noxa*). Estas proteínas proapoptóticas son activadas por la proteína *p21*, que a su vez se activa por la acción de *p53* (Ashkenazi, 2008; Rang *et al.*, 2015). Las proteínas que sólo son homólogas en el dominio *BH3* promueven la apoptosis mediante la modulación de las interacciones entre los miembros de las otras subfamilias. Por ejemplo, la regulación antagónica de las proteínas antiapoptóticas de la familia *Bcl-2* sobre las proteínas proapoptóticas de dominio *BH3*, conlleva a la activación de *Bax/Bak* dando como resultado la liberación de citocromo *c* y *Smac/Diablo*, y la disfunción mitocondrial (figura 25) (Ashkenazi, 2008; Guicciardi *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2010).

Para el caso de los hepatocitos, que son células de tipo II, resulta particularmente relevante la función de la proteína *Bid* en las lesiones hepáticas, debido a que ésta juega un rol importante al servir de puente entre la vía extrínseca y la vía mitocondrial para promover la apoptosis (figura 25) (Guicciardi *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2010).

1.5.2 La autofagia: sobrevivir o morir

La supervivencia celular depende de manera crítica de un suministro continuo de energía, por lo cual se cuenta con una red metabólica que coordina el estado energético de la célula. Durante los períodos de inanición, esta red de energía puede ser mantenida por un periodo considerable

mediante el uso de los almacenamientos de energía en reservas tales como grasas y glucógeno. No obstante, cuando estas reservas se agotan la supervivencia puede ser prolongada por el proceso de autofagia a través del cual la célula comienza a catabolizar sus componentes citoplasmáticos (Berridge, 2014).

La autofagia está relacionada con numerosos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la supervivencia, el metabolismo, el desarrollo, la infección, la inmunidad y el envejecimiento celular (Chaabane *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2015); y suele desencadenarse por la escasez de nutrientes, aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs), hipoxia, estimulación de drogas y estrés a nivel del retículo endoplasmático (*ER*) (Berridge, 2014; Su *et al.*, 2015).

Fisiológicamente, la autofagia consiste en una estrategia y un mecanismo celular para sobrevivir bajo condiciones de estrés, que cuando es sobreactivado puede conducir a la muerte celular (Su *et al.*, 2015). La muerte celular inducida por la autofagia es un proceso independiente de caspasas, que se define morfológicamente por la ausencia de condensación de la cromatina (no presenta escalera de ADN) y una masiva vacuolización en el citoplasma (Kumar *et al.*, 2015; Zhenyi Su *et al.*, 2015).

Debido a la función celular que cumple la autofagia, las alteraciones en su maquinaria de ejecución pueden provocar diversas enfermedades humanas, tales como el cáncer, desórdenes metabólicos y neurodegenerativos (Berridge, 2014; Chaabane *et al.*, 2013; Zhenyi Su *et al.*, 2015).

1.5.2.1 Mecanismo molecular de la autofagia

El proceso de autofagia depende de una secuencia ordenada de eventos que comienza con el proceso de inducción por el que una pequeña región del retículo endoplasmático (*ER*), y quizás también de la mitocondria, empieza a formar un brote en forma de copa que está definido por la

acumulación local del fosfolípido *PtdIns3P*. Después que este brote se separa del *ER*/mitocondria, un proceso de nucleación vesicular agranda esta copa para formar una membrana que envuelve un gran volumen del citoplasma conteniendo organelos tales como ribosomas y mitocondrias para formar una pseudo vacuola. Esta vesícula pseudo vacuola se fusiona posteriormente con los lisosomas para formar un autofagosoma, donde todos los componentes macromoleculares son descompuestos en metabolitos que pueden alimentar a la mitocondria para proveer ATP para la supervivencia.

Gran parte del control de la autofagia es llevado a cabo por una gran familia de proteínas codificadas por los genes relacionados con la autofagia (*Atg*). El principal regulador de la autofagia es la diana de rapamicina (*TOR*), que no sólo controla los factores de crecimiento, sino también el estado energético de la célula. Los factores de crecimiento actúan a través de la *PtdIns* quinasa-3 de clase 1 (*PI 3-K*) que estimula la vía de señalización de *PtdIns* quinasa-3 para mantener la habilidad de *TOR* para inhibir la autofagia. Como parte de este mecanismo, la activación de *PtdIns* 3, 4, 5 P_3 , dependiente de la proteína quinasa B (*PKB*), inhibe el complejo *TSC1/TSC2* que sirve para remover la inhibición de *Rheb* que es responsable de la activación de *TOR* (figura 26). Bajo condiciones donde la energía empieza a ser limitada, decae el efecto inhibitorio de *TOR* y se da inicio a la autofagia (Berridge, 2014; Wu, 2014).

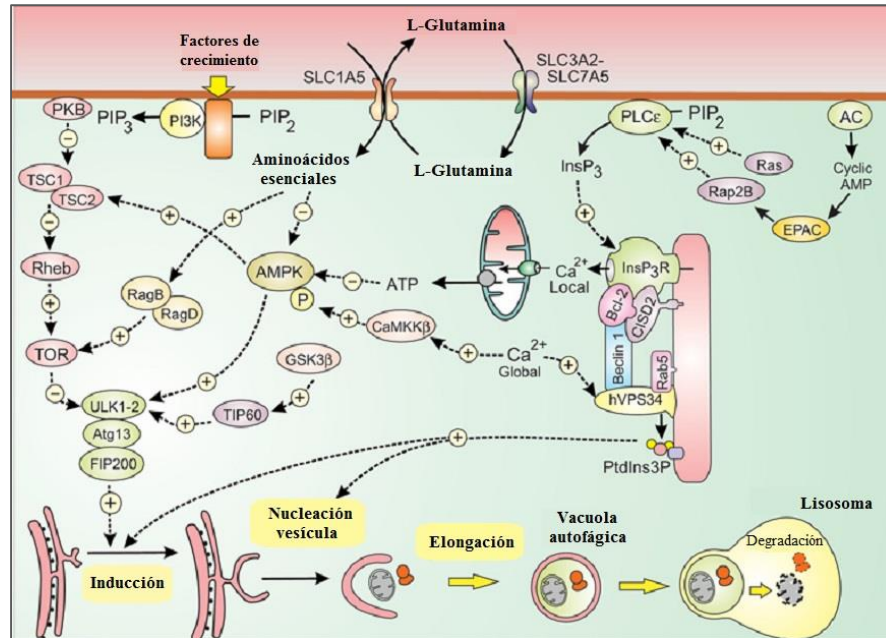


Figura 26. Mecanismos de señalización de la autofagia. Cuando la diana de rapamicina (*TOR*) es inhibida por una variedad de vías de señalización, el complejo *ULK1/Atg13/FIP200* se activa para estimular la inducción de la autofagia. El proceso de nucleación vesicular se da a partir de un complejo macromolecular que controla la quinasa *hVPS34* responsable de la formación del fosfolípido *PtdIns3P*. A continuación, por extensión y rompimiento del retículo endoplasmático (*ER*), se forma una vacuola autofágica que engulle mitocondrias y ribosomas, los cuales se degradan por fusión con los lisosomas (autofagosoma). En la figura, el signo (+) indica señalización activadora y el signo (-) señalización inhibitoria. Adaptado de Berridge, 2014.

Un factor importante para la señalización de la autofagia, es la concentración de aminoácidos esenciales disponibles en la célula, ya que estos activan la familia de GTPasas *Rag* formando el heterodímero *RagB/RagD* que promueve la activación de *TOR*, e inhibe la vía de señalización de la quinasa *AMPK*. Para mantener el nivel de aminoácidos esenciales, la glutamina que se acumula en la célula, tras ingresar por el transportador específico *SLC1A5*, es intercambiada por aminoácidos esenciales a través del transportador heterodimérico bidireccional *SLC7A5/SLC3A2* (figura 26). Sin embargo, cuando la disponibilidad de aminoácidos escasea, se activa la vía de señalización *AMPK* regulando positivamente a la proteína *TSC2* que bloquea a *Rheb* y a *TOR* induciendo el proceso de autofagia (figura 26). Un mecanismo similar, ocurre cuando se agotan

los niveles de ATP, dado que aumenta la concentración de AMP el cual estimula la activación de *AMPK* (Berridge, 2014; Mariño *et al.*, 2014).

Adicionalmente, la autofagia puede ocurrir por una vía independiente de *AMPK* que ocurre cuando las células son privadas de factores de crecimiento, los cuales dependen de la quinasa glucógeno sintasa *GSK3 β* que fosforila la proteína interactiva *Tat 60 (TIP60)*, para acetilar a la quinasa *ULK1* sobre los residuos de lisina 162 y 606 para promover la autofagia (figura 26) (Berridge, 2014). Bajo condiciones ricas en nutrientes, *TOR* activo fosforila e inactiva *ULK1* y *Atg13* para inhibir la autofagia; mientras que, cuando los nutrientes disminuyen y *TOR* está inactivo, estos fosfatos inhibitorios son removidos y el complejo *ULK1/Atg13/FIP200* es capaz de promover la autofagia activando el paso inicial de inducción por el que la membrana es removida del retículo endoplasmático (*ER*) para iniciar la formación de la vacuola autofágica. Este paso también es facilitado por *Atg4L* que actúa junto con la proteína integral de membrana *p150* para estimular la quinasa *hVPS34*, para producir el fosfolípido *PtdIns3P* que define la membrana que está brotando del *ER*. Este complejo *hVPS34/p150* es el que orienta el siguiente paso de nucleación y elongación vesicular (Berridge, 2014; Chaabane *et al.*, 2013; Mariño *et al.*, 2014).

Durante el proceso de nucleación vesicular, *hVPS34* puede ser activado por dos mecanismos: por su interacción con *Rab5* o por el bloqueo de su inhibidor *Beclina-1* (miembro de la familia *Atg*). Un número de proteínas se unen a *Beclina-1* para regular positiva o negativamente su actividad. Los reguladores positivos incluyen a la molécula activadora *ambra-1*, al rubicon y a la proteína asociada al gen de resistencia a la radiación UV (*UVRAG*) (figura 26). Por otra parte, la inhibición de *Beclina-1* depende de su interacción con el receptor *InsP₃ (InsP₃R)* a través de un mecanismo modulado por otras proteínas como *Bcl-2* y la proteína *CISD2* que contiene un dominio hierro-azufre. La habilidad de *Beclina-1* para inhibir *hVPS34* depende de su interacción con el

complejo formado por *Bcl-2*, *CISD2* y *InsP3R* (figura 26) (Berridge, 2014; Mariño *et al.*, 2014). Así, la fosforilación de *Bcl-2* por la quinasa *JNK1* causa que la *Beclina-1* se disocie de *Bcl-2*, resultando en la activación de *hVPS34* y la formación de *PtdIns3P* necesaria para activar la nucleación vesicular. Una de las funciones de *PtdIns3P* es reclutar a la proteína autofágica que interacciona con el dominio *WPP* (*WIP-1*), que es una proteína fosfatasa serina/treonina que se conoce también como *PMM1D* (Berridge, 2014; DeVorkin, Choutka & Gorski, 2014).

El receptor *InsP3R*, además de jugar un rol importante en la activación de *hVPS34*, también es responsable de la liberación interna de calcio para contrarlar la autofagia (Chaabane *et al.*, 2013). Allí se llevan a cabo diferentes mecanismos para activar las isoformas de la fofolipasa C (p.ej. *PLC ϵ* activada por la proteína *Ras* o por los componentes *EPAC/Rab2b* de la vía de señalización *AMPK*) con el objetivo de elevar el nivel de *InsP $_3$* e inducir la liberación de calcio (figura 26) (Berridge, 2014). Niveles elevados de calcio pueden activar quinasas como la calmodulina *CaMKK β* que actúa para estimular *AMPK*, resultando en la inhibición de *TOR* y la promoción de la autofagia. Otra acción global del calcio consiste en estimular a *hVPS34* para aumentar la formación del *PtdIns3P* que conduce la formación temprana del transporte de membrana (Berridge, 2014).

Finalmente, tras la nucleación vesicular, se inicia el proceso de elongación de la membrana llevado a cabo por una serie de proteínas de la familia *Atg* dando lugar al autofagosoma o vacuola autofágica que se funde con los lisosomas mediante proteínas tipo *SNARE*, liberando varias enzimas lisosomales que se encargan de hidrolizar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos para obtener nutrientes que alimenten la célula (Mariño *et al.*, 2014; Nikolettou *et al.*, 2013).

1.5.3 La necrosis regulada: una nueva alternativa en la terapia contra el cáncer

En contraste con la apoptosis, que representa actualmente el tipo de muerte celular regulada más estudiado, la necrosis se consideraba un tipo de muerte celular accidental sin regulación alguna, que ocurría debido a estrés fisiológico como cambios drásticos en la temperatura, choques osmóticos y cambios de pH. Sin embargo, esta concepción ha cambiado en los últimos años al descubrir que existen tipos de necrosis estrechamente regulados. Estos tipos de muerte celular regulada están resumidos bajo el término de “necrosis regulada” y están caracterizados morfológicamente por: hinchamiento celular, granulación citoplasmática y, finalmente, la fuga de la membrana celular con la liberación de sus componentes en los alrededores (Berghe *et al.*, 2014).

La necroptosis es una forma de necrosis regulada, caracterizada por inducir respuestas inflamatorias que podrían ser benéficas para la terapia anticancerígena, razón por la cual está siendo enfocada como una alternativa para eliminar células tumorales y como futuro tratamiento de pacientes con cáncer (Meng *et al.*, 2016; Philipp, Sosna & Adam, 2016). El equilibrio entre las propiedades anticáncer que se pueden explorar de la necroptosis y sus limitaciones al actuar de manera protumorigénica determinan si este tipo de muerte celular puede ser usada como una herramienta prometedora para el diagnóstico temprano de tumores, la prevención de metástasis y el tratamiento anticáncer (Philipp, Sosna & Adam, 2016).

1.5.3.1 Mecanismo molecular de la necroptosis

La necroptosis es a menudo desencadenada por estímulos que también inducen la apoptosis por vía extrínseca, tales como los miembros de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral (*TNF*), incluyendo *TNF- α* , el ligando *FAS* (*FASL* o *CD95*), y el ligando inductor de apoptosis relacionado con *TNF* (*TRAIL*). Tras la estimulación del ligando, los receptores activados por estos

estímulos (p.ej. *TNFR*, *Fas* y *DR4/DR5*) se asocian con la quinasa 1 que interactúa con el receptor (*RIP1*) a través de sus respectivos dominios de muerte y reclutan inhibidores celulares de proteínas apoptóticas (*cIAPs*) tales como *cIAP1* y *cIAP2*, para formar un complejo (complejo I) asociado a la membrana plasmática el cual conduce a la activación de los promotores de supervivencia *NF-κB* y proteínas quinasas activadas por mitógenos (*MAPKs*) (figura 27) (Chen & Zhang, 2016; Newton & Manning, 2016). Durante este proceso, *RIP1* se convierte a su forma poliubiquitinada por los *cIAPs* y otras ubiquitin ligasas E3 de factor 2 y 5 asociadas al receptor *TNF* (*TRAF2* y *TRAF5*). La auto-ubiquitinación y la subsecuente degradación de los *cIAPs*, la cual es estimulada por el activador secundario de caspasas derivado de la mitocondria (*Smac*) o por moléculas pequeñas que imitan a *Smac* (también conocidas como inhibidores *IAP*), promueven la desubiquitinación de *RIP1* por desubiquitininasas, incluyendo la cilindromatosis (*CYLD*) y A20. Esto resulta en la disociación de *RIP1* de la membrana plasmática y su conversión de proteína pro-supervivencia a proteína pro-muerte (Berghe *et al.*, 2014; Chen & Zhang, 2016; Su *et al.*, 2016).

RIP1 unida al dominio de muerte asociado a *FAS* (*FADD*) recluta la procaspasa-8 (complejo IIa) (figura 27), conduciendo a la activación de la caspasa-8 y a la inducción de la apoptosis. La caspasa-8 activada inhibe la necroptosis escindiendo los reguladores centrales de la necroptosis tales como *RIP1* y *RIP3* (Meng *et al.*, 2016). Si la actividad de la caspasa-8 es abolida por inhibidores de caspasas (p. ej. *zVAD*) o por eliminación genética, el modo de muerte celular cambia a necroptosis (Chen & Zhang, 2016; Hanson, 2016; Meng *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2016).

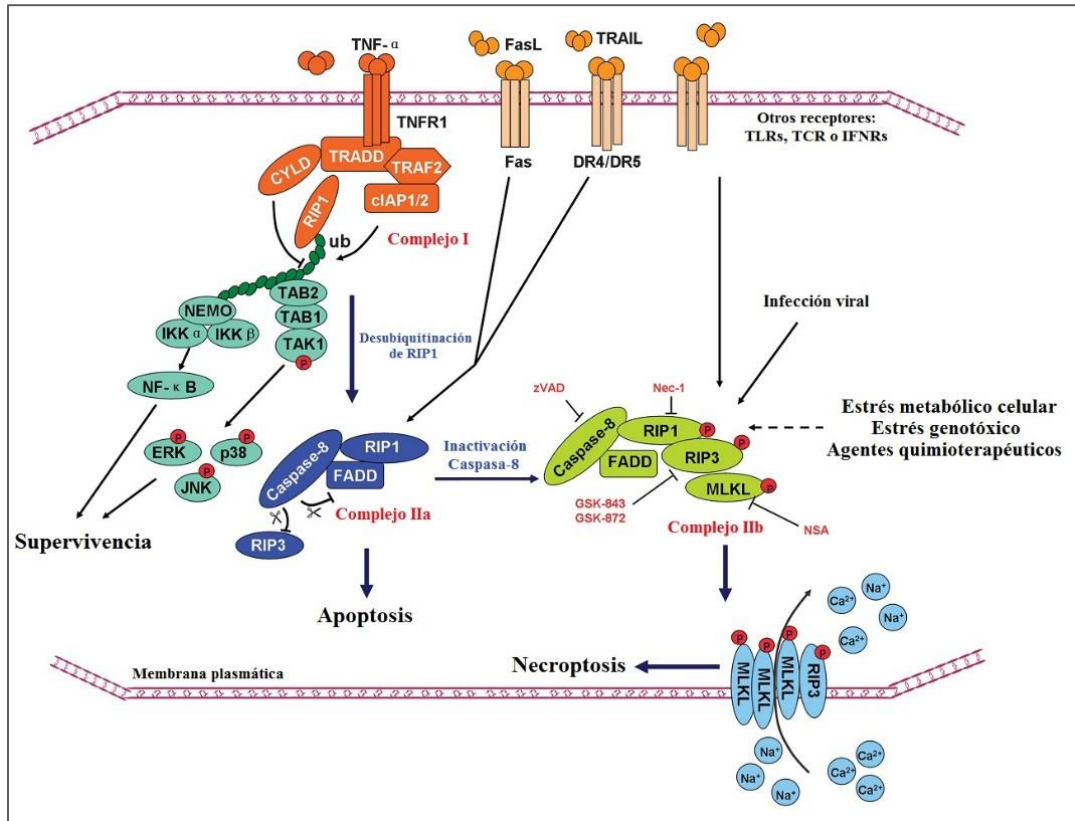


Figura 27. Vía de señalización y reguladores de la necroptosis. La necroptosis puede ser desencadenada por la unión de *TNF-α* a la superfamilia de receptores *TNF* (p. ej. *TNFR*, *Fas* y *DR4/DR5*), por receptores tipo *Toll* (p. ej. *TLR3* y *TLR4*), receptores de células *T*, receptores de interferón, estrés celular metabólico y genotóxico, o algunos compuestos anticancerígenos. En la necroptosis inducida por *TNF-α*, su unión a los receptores *TNF* conduce la formación del Complejo I (*cIAP1*, *cIAP2*, *CYLD*, *RIP1* y *TRAF2*). Los *cIAPs* promueven la poliubiquitinación de *RIP1* para inhibir el Complejo IIa (caspasa 8, *FADD* y *RIP1*) y la formación del complejo IIb (caspasa 8, *FADD*, *RIP1*, *RIP3*) bloqueando la apoptosis o la necroptosis mediada por *RIP1*, y favoreciendo la supervivencia celular. Adicionalmente, la *RIP1* poliubiquitinada recluta a *NEMO* y *TAB2* que median la activación del factor *NF-κB* y las quinasas *MAPKs* (p.ej. *ERK*, *JNK*, *p38*), respectivamente. No obstante, *CYLD* desubiquitina a *RIP1* y promueve el empaquetamiento de los complejos IIa y IIb. Si la caspasa 8 está activada, se escinden *RIP1*, *RIP3* y *CYLD* bloqueando la necroptosis, pero en presencia de inhibidores de la caspasa 8 (p. ej. *zVAD*) es posible formar el complejo IIb que inicia la necroptosis. El complejo *RIP1-RIP3-MLKL* llamado necrosoma, es el mediador de la señalización necroptótica *downstream* que conlleva a la permeabilización de la membrana, la reducción del ATP citosólico y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs). *Nec-1*: inhibidor de *RIP1*; *GSK-843/-872*: inhibidor de *RIP3*; y *NSA*: inhibidor de *MLKL*). Adaptado de Su *et al.*, 2016.

RIP3 y *RIP1* se unen la una a la otra mediante sus respectivos dominios de interacción homotípica (*RHIM*) para formar un complejo funcional de señalización amiloide, conllevando a la autofosforilación (serina 227) y la oligomerización de *RIP3*, que recluta y fosforila a la pseudoquinasa de linaje mixto *MLKL* (complejo IIb) (figura 27). A diferencia de *RIP3*, que es una proteína promotora de la supervivencia, *RIP1* es pleiotrópica, es decir, puede ser un regulador tanto positivo como negativo de la necroptosis y de *RIP3* (Chen & Zhang, 2016; Hanson, 2016; Meng *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2016).

Estudios de química biológica y genética han identificado a *MLKL* como el principal ejecutor de la necroptosis corriente abajo de *RIP1/RIP3*. Normalmente, *MLKL* se mantiene como un monómero inactivo en el citosol por su dominio de tipo quinasa. Luego de la activación, *RIP3* se une a *MLKL* a través de su dominio quinasa para promover la fosforilación de *MLKL* en los residuos de treonina 357 y serina 358, lo que desestabiliza la estructura monomérica de *MLKL* y promueve su oligomerización (figura 27) (Chen & Zhang, 2016; Su *et al.*, 2016). La *MLKL* oligomerizada, la cual tiene afinidad por lípidos fosfatidilinositol y cardiolipina, transloca del citosol a las membranas celular e intracelular, interrumpiendo su integridad para promover la muerte necroptótica (Berghe *et al.*, 2014; Chen & Zhang, 2016).

Para explicar cómo la *MLKL* oligomerizada causa la muerte celular se han propuesto diferentes mecanismos. El complejo formado por *RIP1*, *RIP3* y *MLKL* (también llamado necrosoma) puede promover la fosforilación de la forma larga del miembro 5 de la familia de fosfoglicerato mutasas (*pGAM5L*), la cual estimula la autofosforilación de la forma corta de *pGAM5L* (*pGAM5S*). *pGAM5S* se une subsecuentemente al factor de fisión mitocondrial, la proteína 1 relacionada con la dinamina (*Drp1*), e incentiva su actividad GTPasa para promover la fisión mitocondrial y la muerte celular (Hanson, 2016). Sin embargo, el rol de *pGAM5-Drp1* y la mitocondria en la

necroptosis parecen ser dependientes del contexto (Chen & Zhang, 2016). También se sugirió que *MLKL* oligomerizada puede promover la entrada de calcio a través del canal de calcio de la proteína *TRPM7*, o la entrada de sodio, para provocar la muerte celular. Sin embargo, aún no es claro si la afluencia de iones observada en las células es una causa o una consecuencia de la muerte celular necroptótica (Chen & Zhang, 2016; Su *et al.*, 2016). Adicionalmente, la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), debido a la alteración de la integridad de la membrana mitocondrial por parte de *MLKL*, también puede contribuir a la muerte por necrosis. Por lo tanto, aún no se ha dilucidado el mecanismo de acción corriente abajo de *MLKL* en la necroptosis (Chen & Zhang, 2016; Hanson, 2016; Newton & Manning, 2016).

Es importante resaltar que, el aumento en la concentración de calcio intracelular conlleva a la activación de calpainas, proteasas de cisteína no lisosomales que son ubicuamente y constitutivamente expresadas en células mamíferas. Las calpainas activadas pueden escindir los reguladores antiapoptóticos *Bcl-XL* y *Bax*, como también a las caspasas 7, 8 y 9. Las calpainas juegan un papel importante en la inducción de muerte celular por necrosis dependiente de especies reactivas de oxígeno (EROs), porque ellas escinden los transportadores mitocondriales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, resultando en una alta concentración de calcio en la mitocondria que conduce a la producción constante de EROs y a la disminución del ATP. El calcio también puede estimular la actividad de la óxido nítrico sintasa (*NOS*) y, por ende, la producción de óxido nítrico, el cual se comporta como un inhibidor del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, desencadenando una fuerte producción de EROs en el complejo III (citocromo *c* oxidoreductasa) (Chaabane *et al.*, 2013).

La necroptosis también puede darse por otros estímulos, además de los ligandos de receptores de muerte, incluyendo la participación de los receptores tipo *Toll 3* y *4* (*TLR3* y *TLR4*) activados

por lipopolisacáridos (*LPS*) y el ARN de doble hebra (*dsRNA*), o por análogos tales como el ácido polinosínico-poliacidídico (*poly(I:C)*); la estimulación de receptores de células, interferones (*IFNs*), daño al ADN e infección viral (Berghe *et al.*, 2014; Chen & Zhang, 2016; Hanson, 2016). Agentes anticancerígenos y de estrés genotóxico también pueden inducir la necroptosis dependiente de *RIP1/RIP3* (Su *et al.*, 2016). Dependiendo de los estímulos, *RIP3* puede ser activada a través de mecanismos dependientes o independientes de *RIP1* (Chen & Zhang, 2016). Por otra parte, también se han desarrollado varios inhibidores de la necroptosis, incluyendo el inhibidor de *RIP1* necrostatina-1 (*Nec-1*), los inhibidores de *RIP3* *GSK843* y *GSK872*, y el inhibidor de *MLKL* necrosulfonamida (*NSA*) (Chaabane *et al.*, 2013; Chen & Zhang, 2016; Jaramillo & Tibiche, 1976; Meng *et al.*, 2016; Newton & Manning, 2016).

1.5.3.2 Otras formas de necrosis regulada

Además de la necroptosis, se han descrito otras formas de necrosis regulada. Tal es el caso de los agentes alquilantes del ADN, la toxicidad del glutamato, el estrés oxidativo, la hipoxia y la isquemia los cuales pueden desencadenar la necrosis dependiente de la polimerasa poli ADP-ribosa (*PARP1*), la cual cataliza la poli ADP-ribosilación de las proteínas involucradas en la respuesta al daño del ADN. La muerte celular dependiente de *PARP1*, también conocida como partánatos, es mediada por la translocación del factor inductor de apoptosis (*AIF*) desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el núcleo, y por la activación de las proteasas calpaínas (Berghe *et al.*, 2014; Chen & Zhang, 2016; Hanson, 2016). La muerte celular necrótica mediada por *PARP1* se debe a la crisis energética causada por el agotamiento del dinucleótido nicotinamida (NAD^+) y, por ende, del ATP. Las células que usan la glucólisis aeróbica para respaldar su bioenergética, como las células cancerígenas, son más sensibles a esta forma de muerte (Chen & Zhang, 2016; Nikolettou *et al.*, 2013).

Otra forma de necrosis regulada es mediada por la función mitocondrial del supresor de tumores *p53*. En respuesta al estrés oxidativo, *p53* se acumula en la matriz mitocondrial provocando la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (*PTP*) y la necrosis por la interacción con el regulador de *PTP*, la ciclofilina D (*CYPD*), conduciendo al agotamiento del ATP y la muerte celular. En este caso, la actividad asesina de *p53* es independiente de su función de activación transcripcional (Berghe *et al.*, 2014; Chen & Zhang, 2016; Hanson, 2016).

Adicionalmente, otras modalidades de muerte celular no apoptóticas como la piroptosis y la ferroptosis, se consideran tipos de necrosis regulada (Chen & Zhang, 2016; Hanson, 2016). La piroptosis es un tipo de muerte celular atípica identificada en macrófagos, que resulta de la presión osmótica generada por la formación de poros (dependiente de la caspasa-1) en la membrana plasmática, la cual provoca que se disipen los gradientes iónicos celulares y se libere rápidamente el contenido citosólico, produciendo una respuesta inflamatoria (Berghe *et al.*, 2014). Por su parte, la ferroptosis es un tipo de muerte necrótica dependiente de hierro que se lleva a cabo por la excesiva producción celular de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediada por reacciones de tipo Fenton. La ferroptosis se caracteriza morfológicamente por la condensación y la ruptura de la membrana externa mitocondrial, y para su ejecución requiere de: hierro intracelular, transportador transferrina, lipoperoxidación y lisosomas funcionales (Berghe *et al.*, 2014; Hanson, 2016).

En general, estas formas de necrosis no son consideradas necroptosis ya que no hay evidencia de que éstas requieran del *RIP1* o *RIP3*. No obstante, sigue siendo difícil distinguir las diferentes formas de necrosis debido a que se carece de marcadores moleculares distintivos (Chen & Zhang, 2016).

1.5.3.3 La necroptosis como mecanismo guardián contra el cáncer

Gran cantidad de evidencia clínica y experimental ha demostrado que los defectos apoptóticos (sobre-expresión de proteínas antiapoptóticas, mutaciones de proteínas proapoptóticas y pérdida de caspasas) son la causa más frecuente de resistencia del cáncer, uno de los principales obstáculos para una terapia eficiente. Debido a que el proceso neoplásico está dirigido por las mutaciones oncogénicas que aumentan el número de células tumorales por la activación del ciclo celular y/o la inhibición del proceso normal de apoptosis, las células cancerígenas están predispuestas genéticamente a la resistencia apoptótica. Adicionalmente, como las terapias anticancerígenas convencionales, independientemente de sus dianas y mecanismos, inducen principalmente apoptosis, la resistencia a la terapia parece ser inevitable a causa de la progresión de las vías antiapoptóticas, haciendo que las células cancerígenas adquieran ventajas selectivas contra la apoptosis volviéndolas más implacables y resistentes a los tratamientos (Meng *et al.*, 2016). Es por esto que la necrosis regulada o la necroptosis juega un papel fundamental como mecanismo alternativo de muerte para regular la progresión celular y el avance del tumor; resaltando su potencial para inducir la respuesta inmune a través de la liberación de patrones moleculares asociados al daño (*DAMPs*) en el microambiente del tejido. Como consecuencia, las células necroptóticas pueden reclutar células inflamatorias para examinar el grado de daño del tejido, remover los residuos asociados a la necroptosis y, ayudar al remodelamiento y la reparación tisular (Chen & Zhang, 2016).

Se ha demostrado que algunas células cancerígenas resistentes a la inducción de apoptosis por agentes quimioterapéuticos (particularmente aquellos que dañan el ADN), pueden ser resensibilizadas a la muerte celular por necroptosis. Por ejemplo, la quimioterapia basada en el cisplatino es actualmente el tratamiento estándar para el cáncer de esófago localizado, pero las

células han encontrado varias estrategias para evadir la apoptosis. No obstante, *RIP3* y la producción autocrina de *TNF- α* contribuyen a que las células sean susceptibles a la inducción de necrosis por el cisplatino, cuando la vía apoptótica se ha suprimido o está ausente, en células de cáncer de esófago localizado (Chen & Zhang, 2016; Meng *et al.*, 2016). También se ha encontrado que la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa-3 alfa (*GSK3A*) o beta (*GSK3B*) y la administración de agentes que dañan el ADN, p. ej. el 5-fluorouracilo (*5-FU*), conducen a la necroptosis dependiente de *RIP1* en células cancerígenas de colon con p53 inactivo (Philipp *et al.*, 2016).

Por otra parte, el etopósido, una droga inhibidora de la topoisomerasa, demostró suprimir la expresión de *cIAP*, induciendo de este modo la necroptosis a través del complejo que contiene a *RIP1*. La droga antimetabólica taxol puede inducir la necroptosis dependiente de *RIP1* mediada a través de la doble fosforilación de *FADD* por las quinasas mitóticas *Aurora-A* y *Plk*. Mientras que, El *5-FU*, el etopósido y la camptotecina inducen la necroptosis dependiente de *RIP1/MLKL*, pero independiente de *RIP3* en células de cáncer colorrectal deficientes de caspasa-3 (Chen & Zhang, 2016).

La necroptosis también puede ser inducida por inhibidores quinasa, productos naturales o inmuno-moduladores. El sorafenib, una droga inhibidora multiquinasa aprobada por la Administración de drogas y alimentos (*FDA*) de Estados Unidos, puede causar necroptosis dependiente de *RIP1* en células de cáncer de próstata a través de la inducción de la autofagia. También se determinó que la combinación del sorafenib con Givinostat (inhibidor histona desacetilasa) induce la necroptosis dependiente de *RIP1* mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la activación de la proteína *Bim* de la familia *Bcl-2* (Meng *et al.*, 2016). Por otra parte, se encontró que la estaurosporina, inhibidor de la proteína quinasa c

ampliamente usado como inductor de apoptosis, promueve la necroptosis dependiente de *RIP1/MLKL* en células de linfoma U-937, bajo condiciones que comprometen a las caspasas. Mientras que, el derivado chalcona 24 induce necroptosis dependiente de *RIP1/RIP3* a través de la promoción de la autofagia y la degradación de *cIAP*. Es importante destacar que, la necroptosis desencadenada por estos agentes está acompañada a menudo por la autofagia, que puede ser la responsable de la supresión de la apoptosis y el sesgo hacia la necroptosis (Chen & Zhang, 2016).

1.5.4 Interconexión entre las vías apoptóticas, necróticas y autofágicas

La evidencia sugiere que la autofagia y la apoptosis son inducidas simultáneamente por el dominio de muerte *FADD*, al menos en células epiteliales normales, pero desde que la muerte celular por apoptosis progrese más rápido, ésta será la forma de muerte celular dominante. Por su parte, la completa aparición de la autofagia o la necrosis emerge solamente cuando se inhibe la actividad de las caspasas (Chaabane *et al.*, 2013). Por ejemplo, la necrosis se ve favorecida por el bloqueo de las caspasas, al perderse su efecto inhibitorio sobre *PARP1* el cual se convierte a su forma hiperactivada y consume enormes cantidades de ATP (para la poliADP-ribosilación del ADN y la maquinaria de proteínas para la reparación del ADN dañado), agotando las reservas energéticas, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y conduciendo a la necrosis (Chaabane *et al.*, 2013; Chen & Zhang, 2016; Mariño *et al.*, 2014; Nikolettou *et al.*, 2013). Esto implica que los niveles intracelulares de ATP son determinantes en la interacción entre la apoptosis y la necrosis (niveles altos de ATP permiten a la célula experimentar la apoptosis, mientras que niveles bajos favorecen la necrosis) y que las mitocondrias son organelos claves en este contexto (Nikolettou *et al.*, 2013).

Por su parte, la muerte celular necrótica y la autofagia están interconectadas por una cascada de señalización que involucra a *RIP1*, y es negativamente regulada por la caspasa-8. El proceso de autofagia suele darse en primer lugar como un intento de supervivencia, bloqueando la necrosis y limpiando el daño oxidativo en la mitocondria. No obstante, la necrosis puede exhibir una rápida arremetida, involucrando la producción de EROs, la reducción del ATP citoplasmático y otros eventos celulares (Chaabane *et al.*, 2013; Nikolettou *et al.*, 2013; Vandenabeele *et al.*, 2010).

1.5.5 Inducción de formas mezcladas de muerte celular

Varios estudios han demostrado que algunas drogas e inhibidores quinasa inducen de manera simultánea apoptosis, necroptosis y autofagia en células cancerígenas. Además, la combinación de inductores necroptóticos con tratamientos estándar aumenta esta forma de muerte celular. Por ejemplo, el ácido gambógico y el 5-fluorouracilo (*5-FU*) tienen efectos sinérgicos sobre células A549, activando la muerte celular a través de mecanismos de muerte celular apoptóticos y necroptóticos mediante la producción de EROs vía mitocondrial (Meng *et al.*, 2016).

Algunos agentes que se conocen bien como inductores de apoptosis también pueden inducir necroptosis bajo ciertas condiciones. Las células cancerígenas cambian de apoptosis a necrosis programada o necroptosis cuando los almacenamientos de energía están agotados, como ocurre durante la reparación del ADN por la activación de la polimerasa poli-ADP-ribosa (*PARP*), o por alteraciones del pH extracelular en células de cáncer humanas de colon HT29 y de hígado Hep-G2 (Jouan-Lanhouet *et al.*, 2012). Adicionalmente, moléculas inhibidoras pequeñas que antagonizan a los inhibidores de las proteínas apoptóticas, tales como imitadores del segundo activador mitocondrial de caspasas (*Smac*), tienen la capacidad de causar necroptosis en células de fibrosarcoma, células de cáncer de mama y leucemia linfoblástica, revelando su potencial

relevancia clínica en la estrategia terapéutica, la cual es regulada por EROs (Chen & Zhang, 2016; Meng *et al.*, 2016).

También se han encontrado que compuestos inductores de necroptosis pueden inducir apoptosis bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, la shikonina y sus análogos inducen necroptosis, pero en presencia de *Nec-1*, las células revierten a apoptosis. Al parecer, la shikonina en bajas dosis induce apoptosis dependiente de caspasas, pero en altas dosis ocasiona necroptosis. Estos reportes, soportan la idea de que la apoptosis y la necroptosis pueden funcionar como mecanismos de apoyo recíproco, aunque los mecanismos moleculares responsables de estas respuestas aún no estén elucidados, indican que existen múltiples vías para el tratamiento del cáncer (Meng *et al.*, 2016).

La evidencia recolectada sugiere que la autofagia podría promover la muerte celular por necroptosis modulando la degradación selectiva de la catalasa, enzima encargada de eliminar EROs. Se ha encontrado que la concurrente inhibición de *TOR* y la inhibición de la maduración del autofagosoma causan la acumulación de autofagosomas que inducen la necroptosis dependiente de *RIP3* y de EROs en células de carcinoma renal (Chaabane *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2016).

Para concluir, es importante resaltar que los agentes quimioterapéuticos tradicionales no son eficientes inductores de necroptosis, y se requieren más drogas potentes y específicas a la vía necroptótica para aprovechar al máximo el poder de la necroptosis en la terapia anticancerígena. Además, la mayoría de estudios sobre cáncer y necroptosis están basados en experimentos *in vitro*, por lo cual se necesita de la investigación *in vivo* para comprobar la eficacia y la seguridad de los compuestos y drogas anticancerígenas evaluados (Meng *et al.*, 2016).

1.5.6 ¿Cómo diferenciar apoptosis de necroptosis?

La necroptosis tiene varias características distintivas comparada con la apoptosis. En la tabla 1 se describen los marcadores que ayudan a diferenciar estas dos formas de muerte celular.

Tabla 1. Comparación de marcadores de necroptosis y apoptosis.
Tomada de Chen & Zhang, 2016.

Necroptosis	Apoptosis
<i>Marcadores morfológicos</i>	
Hinchamiento y ruptura de la membrana plasmática	Formación de ampollas en la membrana plasmática
Hinchamiento y vacuolización del citoplasma	Fragmentación del citoplasma y formación de cuerpos apoptóticos
No hay fragmentación nuclear	Condensación y fragmentación del núcleo
Hinchamiento de la mitocondria y los organelos	Fragmentación de los organelos
<i>Marcadores bioquímicos</i>	
Agotamiento del ATP	Aumento del ATP
Producción de especies reactivas de oxígeno	Producción de especies reactivas de oxígeno
Entrada de calcio y sodio al citosol	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
<i>Marcadores moleculares</i>	
Señalización mediada por <i>RIP1</i> , <i>RIP3</i> y <i>MLKL</i>	Señalización por la familia de proteínas <i>Bcl-2</i>
Regulación de los receptores de muerte	Regulación de los receptores de muerte
Inhibición de las caspasas	Activación de las caspasas
Degradación aleatoria del ADN	Digestión del ADN por endonucleasas
Liberación extracelular de patrones moleculares asociados al daño (<i>DAMPs</i>), tales como <i>HMGB1</i> y ADN mitocondrial	Liberación desde la mitocondria al citosol de citocromo <i>c</i> , <i>Smac</i> y <i>AIF</i>

No obstante, debido a la ausencia de marcadores moleculares específicos de la necroptosis, a menudo se requiere de una combinación de enfoques para distinguir la necroptosis de otros tipos de muerte celular. Para los cultivos celulares, la microscopía de transmisión electrónica (*TEM*) es usada comúnmente para proveer evidencia morfológica de necrosis. La liberación extracelular de *HMGB1*, la pérdida de viabilidad celular, y el agotamiento de ATP pueden usarse como marcadores de necroptosis, pero no se puede distinguir necroptosis de otros tipos de muerte celular necrótica (D. Chen & Zhang, 2016; Hanson, 2016).

En definitiva, la evidencia para confirmar necroptosis es el requerimiento de *RIP1*, *RIP3* y/o *MLKL*, lo cual puede establecerse usando direccionamiento genético, técnicas de silenciamiento como *siRNA/shRNA knockdown*, mutantes deficientes de dominios de interacción o quinasas de muerte, o pequeñas moléculas inhibitoras (McQuade, Cho & Chan, 2013). También se pueden usar marcadores bioquímicos para estudiar la necroptosis. Por ejemplo, la activación de *RIP1*, *RIP3* y/o *MLKL* en la necroptosis se puede detectar por cambios en sus estados fosforilados o por su acumulación en la membrana usando técnicas de inmunotransferencia e inmunotinción (Wang *et al.*, 2014).

1.6 Bioenergética mitocondrial

La mitocondria cumple un papel fundamental en el metabolismo celular al mantener los niveles de ATP requeridos para el funcionamiento de la célula. A su vez participa en la biosíntesis de centros hemo y centros de hierro-azufre, en la regulación de las concentraciones iónicas de calcio en el citosol, en la regulación del estado redox y la generación de sustratos para la biosíntesis de proteínas y lípidos. Bajo condiciones normales, la mitocondria orienta la señalización redox a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno (EROs) desde la cadena transportadora de

electrones. La mitocondria también facilita las respuestas al estrés celular, incluyendo la respuesta a hipoxia y la activación de muerte celular mediante la liberación de moléculas proapoptóticas desde el espacio intermembrana hacia el citosol (Sabharwal & Schumacker, 2014; Zong, Rabinowitz, & White, 2016). Por esta razón, ciertas mutaciones genéticas en la mitocondria pueden conducir a la disfunción mitocondrial, la cual está asociada con la resistencia a apoptosis y el metabolismo de células tumorales, como es el caso del hepatocarcinoma celular (HCC) (Wang *et al.*, 2013).

La arquitectura general de la mitocondria representada en la figura 28, permite identificar una membrana externa que posee proteínas, denominadas porinas, las cuales actúan como poros no específicos para solutos de peso molecular menor a 10 kDa, haciendo que la membrana externa sea permeable a iones y muchos metabolitos, sin que juegue un rol en la generación del potencial de membrana (Nicholls & Ferguson, 2013). Por otra parte, la membrana interna, traductora de energía, tiene una composición de fosfolípidos distinta a la membrana externa y es impermeable a muchas moléculas pequeñas e iones, incluyendo los protones (H^+); en ella residen los complejos enzimáticos transportadores de electrones, la translocasa ADP-ATP, la ATP sintasa entre otros transportadores de membrana. Adicionalmente, en la matriz mitocondrial (fase N), encerrada por la membrana interna, se encuentran las enzimas para la β -oxidación de ácidos grasos y las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (*TCA*), a excepción de la succinato deshidrogenasa la cual está unida a la fase N de la membrana interna (Hassinen, 2014; Sabharwal & Schumacker, 2014; Zong *et al.*, 2016). En la mitocondria también se pueden identificar cristas o crestas que son pliegues de la membrana interna, que le dan su forma arrugada característica proporcionando una gran cantidad de área superficial para las reacciones químicas que allí se producen (Nicholls & Ferguson, 2013).

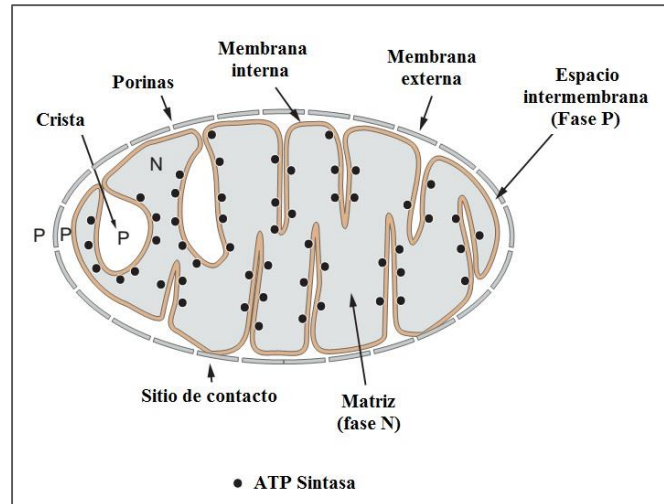


Figura 28. Estructura general de la mitocondria.
Adaptada de Nicholls & Ferguson, 2013.

1.6.1 Fosforilación oxidativa y cadena respiratoria mitocondrial

La fosforilación oxidativa es la culminación del metabolismo productor de energía en los organismos aeróbicos. Todos los pasos oxidativos en la degradación de carbohidratos, grasas y amino ácidos convergen en esta etapa final de la respiración celular, en la cual la energía de oxidación conduce a la síntesis de ATP en la mitocondria (Nelson & Cox, 2013).

La fosforilación oxidativa comienza con la entrada de electrones a la cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria (figura 29). Muchos de estos electrones surgen de la acción de deshidrogenasas que recogen electrones de las vías catabólicas y los canalizan en aceptores de electrones nucleótido nicotinamidas (NAD^+ o NADP^+) o flavin nucleótidos (FMN o FAD). Para conservar la energía, el transporte de electrones ocurre simultáneamente con el bombeo de protones de las enzimas redox de la cadena, lo que genera un gradiente de protones (ΔpH) y un potencial de membrana ($\Delta\psi$) a través de la membrana interna. Juntos, ΔpH y $\Delta\psi$, representan una diferencia de potencial electroquímico ($\Delta\mu$) que impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i por parte de la enzima ATP sintasa (Hassinen, 2014).

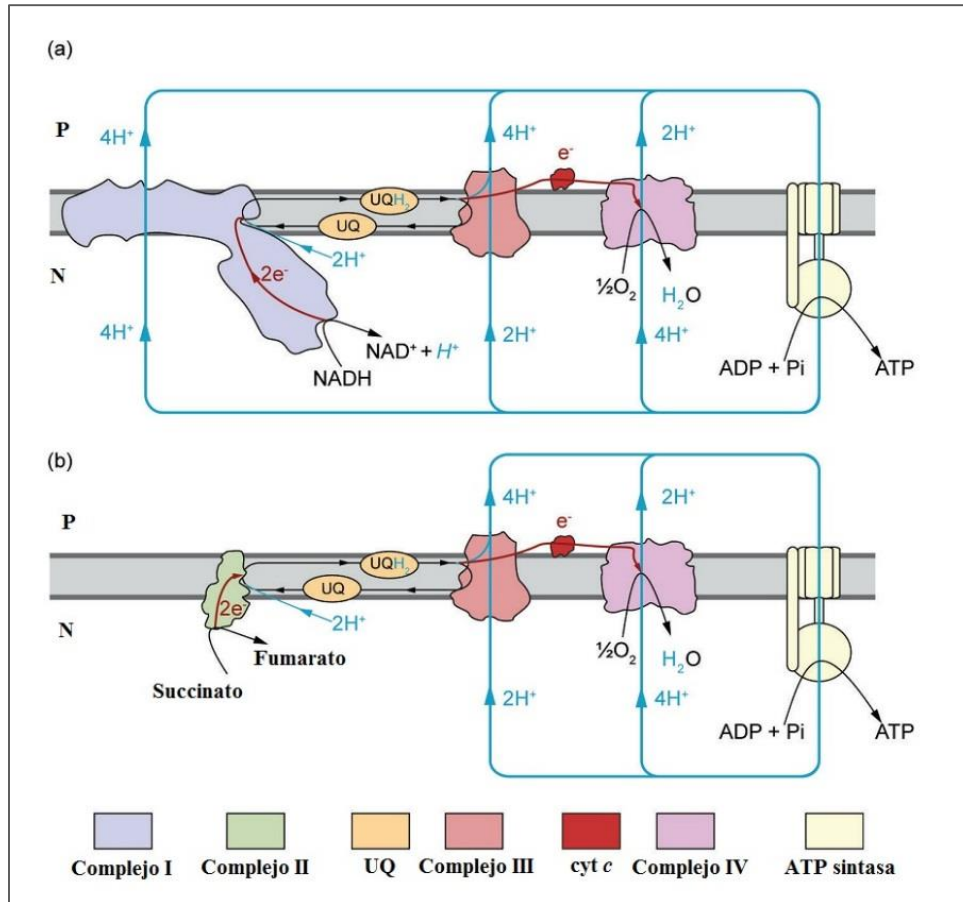


Figura 29. Cadena respiratoria mitocondrial. (a) Vía de transferencia electrónica desde el complejo I por sustratos asociados al NADH. (b) Transferencia de electrones liberados en el complejo II tras la oxidación del succinato; reacción incapaz termodinámicamente de reducir el NAD⁺, por lo cual no se involucra al complejo I. Adaptada de Nicholls & Ferguson, 2013.

Tradicionalmente, la cadena respiratoria está definida por el conjunto de complejos enzimáticos involucrados en la transferencia de electrones al oxígeno para generar el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP. Esto comprende al complejo I, complejo II, complejo III, complejo IV y complejo V los cuales se detallan a continuación.

Es importante destacar que el ADN mitocondrial (*mtDNA*) codifica trece subunidades específicas de los complejos I, III, IV y V, mientras que la mayoría de subunidades de estos complejos y todas las subunidades del complejo II son codificadas por el ADN nuclear. Por lo tanto, la codificación de las proteínas de la cadena respiratoria depende de dos organelos, pero si

la maquinaria mitocondrial falla estos complejos son deteriorados funcionalmente, resultando en la inhibición del transporte de electrones y, por ende, un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Boelsterli & Lim, 2007; Gao *et al.*, 2011).

1.6.1.1 Complejo I

El complejo I mitocondrial (figura 30), también conocido como NADH-ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa, tiene un papel clave en la cadena respiratoria mitocondrial ya que cataliza la transferencia de dos electrones del NADH a la ubiquinona (UQ o Q) con la translocación simultánea de cuatro protones. El complejo I es una maquinaria reversible que es capaz de usar la fuerza motriz de protones y el producto reducido de la ubiquinona, el ubiquinol (UQH₂ o QH₂) para reducir el NAD⁺. En los mamíferos, este complejo consiste de una proteína grande y compleja con un peso molecular del orden de 980 kDa con al menos 44 subunidades, que posee un dominio hidrofílico orientado hacia la matriz mitocondrial (fase N) y un dominio hidrofóbico embebido en la membrana interna mitocondrial (Alam *et al.*, 2016; Hassinen, 2014; Nicholls & Ferguson, 2013).

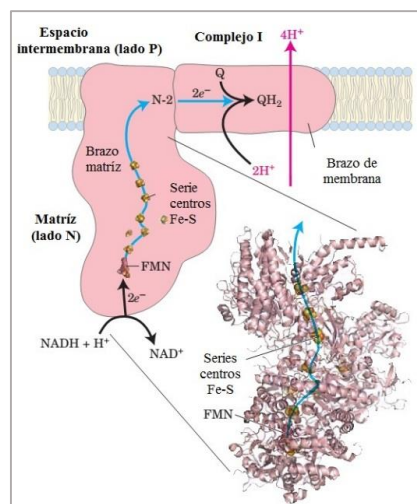


Figura 30. Descripción de la estructura molecular del complejo I. Q: ubiquinona; QH₂: ubiquinol. Adaptada de Nelson & Cox, 2008.

Moléculas tales como el amital (una droga barbitúrica), la rotenona (un producto natural usado comúnmente como herbicida) y la piericidina A (un antibiótico) actúan como inhibidores del flujo de electrones del complejo I a la UQ, lo cual conlleva al bloqueo del proceso de fosforilación oxidativa a través de este complejo mitocondrial (Nelson & Cox, 2013; Nicholls & Ferguson, 2013).

Por otra parte, es importante mencionar que uno de los cambios más frecuentes asociados con anomalías mitocondriales son las alteraciones en el complejo I. Una de las razones por la que esto ocurre, es que el 56% de la codificación del *mtDNA* corresponde a subunidades de este complejo, lo cual aumenta la probabilidad de que las mutaciones al azar en el *mtDNA* incidan sobre el complejo I de la cadena respiratoria. Adicionalmente, estas alteraciones conllevan a un aumento del superóxido mitocondrial generando estrés oxidativo (Boelsterli & Lim, 2007; Gao *et al.*, 2011).

1.6.1.2 Complejo II

Además del complejo I, existen al menos otras cuatro enzimas en las mitocondrias de mamíferos que se comportan como alimentadoras de electrones para la UQ, este es el caso de la succinato deshidrogenasa (complejo II o succinato-ubiquinona oxidorreductasa), que transfiere electrones del succinato como parte del ciclo *TCA*. A pesar de no tener la capacidad de conservar la energía redox como un potencial electroquímico (porque no bombea protones), la succinato deshidrogenasa se ha considerado como un miembro de la cadena respiratoria debido a que es una enzima de membrana intrínseca localizada en la membrana interna mitocondrial. (Alam *et al.*, 2016; Hassinen, 2014; Nicholls & Ferguson, 2013).

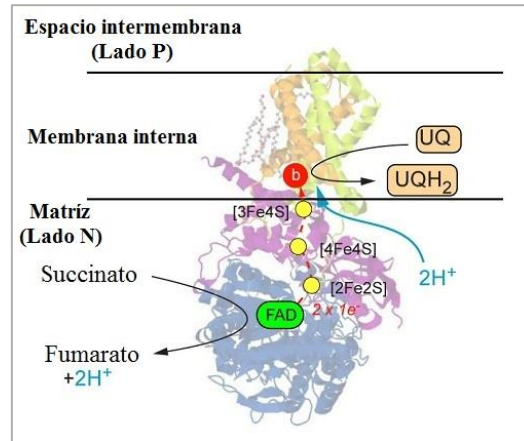


Figura 31. Estructura cristalina de la succinato deshidrogenasa mitocondrial. Adaptada de Nicholls & Ferguson, 2013.

La succinato deshidrogenasa en mamíferos, constituye un heterómero de cuatro proteínas: una proteína de unión de flavin adenin dinucleótido (FAD), una proteína hierro-azufre, y dos proteínas de anclaje a membrana que contienen un grupo hemo *b* intercalado entre sus hélices transmembrana (figura 31). El complejo tiene un dominio hidrofílico globular y un dominio de membrana (Hassinen, 2014). En el dominio globular se encuentra el sitio de unión covalente de una molécula de FAD y tres grupos hierro-azufre (2Fe-2S, 4Fe-4S y 3Fe-4S) que sirven de cadena transportadora de los electrones generados por la oxidación del succinato vía FAD hacia el dominio de membrana donde el hemo *b* conduce la reducción de la UQ a UQH₂ (figura 31) (Alam *et al.*, 2016; Nicholls & Ferguson, 2013).

1.6.1.3 Complejo III

El complejo III en los mamíferos, también conocido como ubiquinol-citocromo *c*-oxidoreductasa o complejo citocromo *bc*₁, constituye un complejo enzimático heteromérico de 11-12 subunidades que pasa los electrones del ubiquinol (UQH₂) al citocromo *c* (cyt *c*). Como se puede apreciar en la figura 32, el centro funcional del complejo III es el citocromo *b* (cyt *b*), una proteína de membrana con ocho hélices transmembrana, dos grupos hemo *b* (de bajo potencial *b*_L -30mV ubicado en el

espacio intermembrana o fase P, y de alto potencial $b_H +90\text{mV}$ cerca de la matriz mitocondrial o fase N), y dos sitios de unión a ubiquinona (uno oxidante cercano a la fase P, Q_P y uno reductor cercano a la fase N, Q_N) localizados en la vecindad de los hemos. Adicionalmente, el complejo contiene la proteína Rieske con un centro hierro-azufre (2Fe-2S) y el citocromo c_1 (cyt c_1) (Hassinen, 2014).

Adicionalmente, en la cara P del espacio intermembrana se encuentra el cyt c mitocondrial (figura 32), una proteína hidrosoluble de 12 kDa, que acepta un electrón del cyt c_1 y se disocia del complejo III difundiendo rápidamente hacia el complejo IV para donar el electrón a su centro de cobre a (Cu_A). Por lo tanto, el complejo III se comporta como una bomba redox translocadora de protones en una relación $4\text{H}^+/2\text{e}^-$, que promueve el ciclo Q para la oxidación del UQH_2 a ubiquinona (UQ) (Nicholls & Ferguson, 2013).

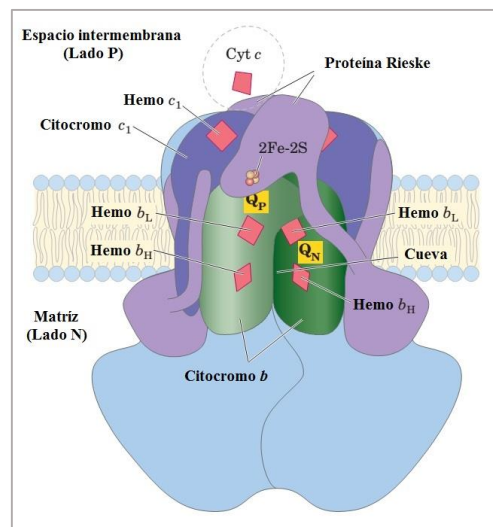


Figura 32. Representación esquemática del complejo III mitocondrial.
Adaptada de Nelson & Cox, 2008.

Es importante resaltar que existen compuestos capaces de inhibir el ciclo Q en el complejo III mitocondrial, como es el caso de la antimicina, el mixotiazol y la estigmatelina los cuales pueden conllevar al escape de los electrones para formar especies superóxido (Nicholls & Ferguson, 2013).

1.6.1.4 Complejo IV

El paso final en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, y ciertas especies de bacterias que operan bajo condiciones aeróbicas, es la transferencia secuencial de cuatro electrones *cyt c* reducido al O₂, formando dos moléculas de H₂O en una reacción catalizada por la citocromo *c* oxidasa o ferrocitocromo *c*: O₂ oxidorreductasa (complejo IV) (Hassinen, 2014).

El complejo IV es un heterómero de 220 kDa que posee 13 subunidades distintas, de las cuales las tres más hidrofóbicas (I, II y III) son codificadas por el ADN mitocondrial. Las subunidades I y II son las que retienen todos los centros redox activos de la enzima: la subunidad II contiene dos iones Cu acomplejados con los grupos -SH de dos residuos de cisteína (Cys) en un centro binuclear (Cu_A) que se asemeja a los centros 2Fe-2S de las proteínas hierro-azufre; mientras que la subunidad I alberga dos grupos hemo, designados como *a* y *a*₃, y otro ion cobre (Cu_B). El hemo *a*₃ y el Cu_B forman un segundo centro binuclear que acepta electrones del hemo *a* y los transfiere al O₂ unido al hemo *a*₃ (figura 33) (Hassinen, 2014; Nelson & Cox, 2013; Nicholls & Ferguson, 2013).

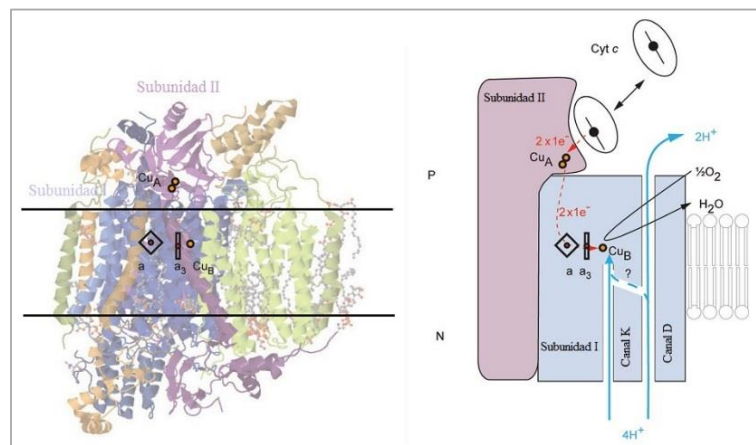


Figura 33. Representación esquemática del complejo IV mitocondrial. Adaptada de de Nicholls & Ferguson, 2013.

La transferencia electrónica a través del complejo IV se da desde el *cyt c* al centro Cu_A, al hemo *a*, al centro hemo *a*₃-Cu_B, y finalmente al O₂. Por cada cuatro electrones que pasan a través de este

complejo, la enzima consume cuatro protones de la matriz (fase N) para convertir O_2 a H_2O . Éste también usa la energía de la reacción redox para bombear un H^+ hacia el exterior en el espacio intermembrana (fase P) por cada electrón que pasa. Se ha documentado que el bombeo de estos protones al complejo IV se da a través de dos canales: el canal D que contiene un aspartato conservado, y el canal K con una lisina conservada (figura 33) (Hassinen, 2014; Nelson & Cox, 2013; Nicholls & Ferguson, 2013).

La posición del hemo a_3 donde el oxígeno se une para ser reducido a agua, también es el sitio de unión para varios inhibidores del complejo IV que incluyen el cianuro, la azida, el óxido nítrico y el monóxido de carbono (Nicholls & Ferguson, 2013).

1.6.1.5 Complejo V: ATP sintasa

La fuerza protón-motriz asociada a la energía electroquímica que se genera por la diferencia en la concentración de protones y la separación de carga a través de la membrana interna mitocondrial, impulsa la síntesis de ATP a medida que protones van fluyendo pasivamente hacia la matriz mitocondrial a través de un poro de protones de la ATP sintasa o complejo V (Hassinen, 2014).

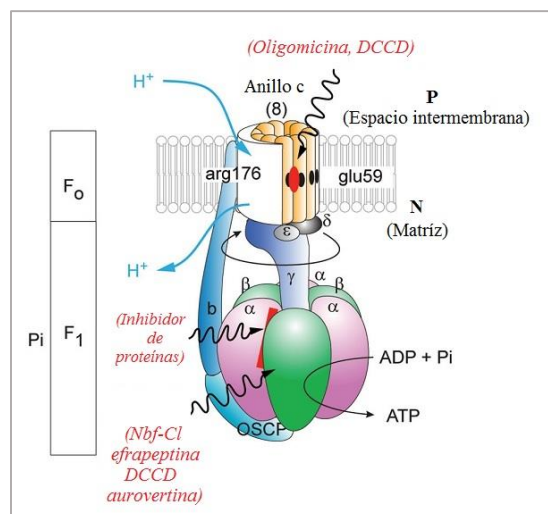


Figura 34. Esquema de la estructura del complejo V mitocondrial. Adaptada de Nicholls & Ferguson, 2013.

La ATP sintasa o F_1F_0 -ATPasa (figura 34) es un complejo enzimático que consiste de tres dominios: un rotor F_0 incrustado en la membrana, un dominio catalítico hidrofílico F_1 en la matriz, y un tallo de unión. F_1 está compuesto por tres subunidades α , tres subunidades β y una subunidad γ , δ y ϵ . Pares de subunidades α - β forman tres sitios catalíticos capaces de hidrolizar o sintetizar ATP. Las subunidades γ , δ y ϵ están fijadas al dominio F_0 y por lo tanto giran con éste y forman un eje extendido al centro de F_1 (Hassinen, 2014; Nicholls & Ferguson, 2013). Por su parte, las subunidades de proteína que confieren sensibilidad a la oligomicina (OSCP), F_6 , b y d constituyen un tallo lateral, el cual inmoviliza el dominio F_1 y evita que éste siga la rotación del tallo central (Hassinen, 2014).

En el dominio F_0 se halla un rotor conformado por ocho a quince subunidades c dependiendo de la especie. La rotación de éste se encuentra acoplada mecánicamente al flujo de protones que está canalizado al oligomero de subunidades c por la subunidad a. El rotor impulsa la rotación de la subunidad γ , lo cual conlleva a cambios conformacionales en los tres sitios activos del dominio F_1 . Estos proporcionan la energía para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato (P_i), de manera que un giro del rotor F_0 resulta en la síntesis de tres moléculas de ATP. En células mamíferas el rotor F_0 cuenta con ocho subunidades c lo cual da una relación H^+/ATP de $8/3= 2,7$ (Hassinen, 2014).

Algunas sustancias como la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD), el 4-cloro-7-nitrobenzofurano (Nbf-Cl), la aurovertina, la efrapeptina y la oligomicina pueden actuar como inhibidores de la actividad ATP sintasa. Nbf-Cl y DCCD (que también puede reaccionar con F_0) se unen a una de las tres subunidades β inhibiendo F_1 ; mientras que la aurovertina se une a dos de las tres cadenas β y la efrapeptina se une a la cavidad central entre las tres subunidades α y β donde penetra la subunidad γ . Por su parte, la oligomicina se une a la superficie del anillo c y los enlaces

de hidrógeno de la cadena lateral del glutamato esencial para la traslocación de protones (Nicholls & Ferguson, 2013).

1.6.2 Mitocondrias aisladas: modelos para el estudio de mecanismos de acción

Debido a que las mitocondrias son organelos claves para el desarrollo de funciones celulares esenciales y juegan un papel fundamental en la señalización para la supervivencia y la muerte celular, se han convertido en una atractiva diana farmacológica para tratar enfermedades metabólicas, degenerativas y proliferativas, haciendo especial énfasis en el cáncer (Frantz & Wipf, 2010). Esto ha conllevado al desarrollo de diferentes técnicas que permitan estudiar la bioenergética mitocondrial, siendo las mitocondrias aisladas el modelo preferido por los investigadores debido a que son relativamente fáciles de obtener y pueden ser preparadas de un amplio rango de tejidos animales de diferentes edades. Además, se pueden adicionar directamente un gran número de sustratos y reactivos, teniendo completo control sobre el ambiente del experimento (Frezza, Cipolat, & Scorrano, 2007; Graham, 1999). Por esta razón, las mitocondrias aisladas generalmente son apropiadas para estudios de mecanismos de transporte de electrones, vías metabólicas mitocondriales, transporte iónico entre otros (Nicholls & Ferguson, 2013).

Actualmente es posible cuantificar de forma indirecta la corriente total de protones en las mitocondrias, midiendo la tasa de consumo de oxígeno con un electrodo sensible a éste. El electrodo de oxígeno de Clark constituye una de las herramientas más versátiles para investigar el circuito de protones mitocondrial. A pesar que el electrodo sólo determina directamente la tasa de una sola reacción, la transferencia final de electrones al O_2 para su reducción a H_2O , se puede obtener información sobre muchos otros procesos mitocondriales simplemente disponiendo las condiciones de incubación para que los procesos deseados se conviertan en pasos importantes para

la determinación de la relación global. Varios de estos pasos pueden ser investigados, incluyendo el transporte de sustratos a través de la membrana, la actividad sustrato deshidrogenasa, la actividad de la cadena respiratoria, el transporte adenina nucleótido a través de la membrana, la actividad de la ATP sintasa y la permeabilidad de protones de la membrana (Frezza *et al.*, 2007; Nicholls & Ferguson, 2013).

Cuando el electrodo de oxígeno es aplicado a estudios mitocondriales, se propone una convención siguiendo el orden típico de adición de los agentes durante el experimento:

Estado 1: respiración de la mitocondria sola (en presencia de fosfato).

Estado 2: respiración lenta en presencia de sustrato y en ausencia de ADP.

Estado 3: respiración rápida en presencia de ADP y sustrato.

Estado 4: respiración lenta cuando todo el ADP se ha consumido.

Estado 5: anoxia.

No obstante, solamente los estados tres y cuatro son de uso general, y estos pueden subdividirse en estado 3_{ADP} (sustrato más ADP), estado 3_u (sustrato más un protonóforo que conduce a una respiración no controlada), estado 4 (descrito previamente) y estado 4_{oligo} (sustrato más ADP más oligomicina para inhibir la ATP sintasa) (Nicholls & Ferguson, 2013).

Con este tipo de experimentos, se puede determinar el coeficiente de control respiratorio (CCR), un parámetro empírico usado frecuentemente para evaluar la integridad de las mitocondrias aisladas. Éste se basa en que las mitocondrias dañadas tienden a mostrar un incremento en el escape de protones mucho más allá de lo que se conoce como una propiedad fisiológica inherente a las

mitocondrias. El CCR (definido como la relación estado 3_{ADP}/estado 4) debe ser examinado para el sustrato usado. Dependiendo del tejido (a partir del cual se aislaron las mitocondrias) y del sustrato, los valores de CCR pueden variar de tres a quince, o más, para mitocondrias bien preparadas, aunque un valor inesperadamente bajo de CCR (usualmente menor a tres) es un indicativo de que la preparación mitocondrial está dañada (Nicholls & Ferguson, 2013).

Adicionalmente, si la cantidad de ADP es conocida y el consumo de oxígeno durante el estado tres (respiración acelerada) puede ser cuantificado, es posible calcular la relación ADP/O que nos indica las moles de ATP sintetizado por mol de oxígeno atómico. Ya que el escape de protones es extremadamente reducido en el estado tres, casi todo el oxígeno consumido durante este estado es usado efectivamente para la síntesis de ATP (Hinkle, 2005; Nicholls & Ferguson, 2013).

1.7 Especies reactivas de oxígeno y sus dos caras en la terapia del cáncer

Las especies reactivas de oxígeno (EROs o ROS por su sigla en inglés) corresponden a subproductos del metabolismo celular normal y han sido ampliamente asociadas con el cáncer (Alam *et al.*, 2016; Reczek & Chandel, 2017). Análisis iniciales de las células cancerígenas revelaron elevados niveles de EROs en comparación con las células normales no transformadas. Este aumento en la tasa de producción de EROs en las células cancerígenas se debe a la adquisición de mutaciones oncogénicas, pérdida de supresores de tumores, aumento de su metabolismo y adaptación a hipoxia (p. ej. bajos niveles de oxígeno) (Reczek & Chandel, 2017). Debido a que niveles altos de EROs pueden ocasionar daños a lípidos, proteínas y ADN se pensaba que las EROs eran oncogénicas, promoviendo la inestabilidad genómica y la tumorigénesis al participar como moléculas de señalización para impulsar la proliferación celular, la supervivencia, la angiogénesis y la metástasis (Sabharwal & Schumacker, 2014). Sin embargo, las EROs también pueden jugar

un rol antitumorogénico, pues se ha demostrado que niveles excesivos de éstas pueden incrementar el estrés oxidativo e inducir muerte celular (Reczek & Chandel, 2017; Zong *et al.*, 2016). Por lo tanto, para prevenir la acumulación de EROs y mantener el equilibrio redox, las células cancerígenas deben aumentar su capacidad antioxidante para regular la concentración de EROs y permitir la activación de vías de señalización protumorogénicas sin inducir muerte celular (Gorrini *et al.*, 2013; Reczek & Chandel, 2017).

En consecuencia, comparado con las células normales, las células cancerígenas tienen un ambiente redox alterado, con un alto nivel de producción de EROs contrabalanceado por una alta tasa de antioxidantes. Esta característica única de las células cancerígenas puede hacerlas más sensibles que las células normales a alteraciones en los niveles de EROs o manipulaciones redox. Por lo tanto, las estrategias para eliminar o producir EROs pueden ser potencialmente efectivas para la terapia del cáncer (Gorrini *et al.*, 2013; Reczek & Chandel, 2017).

1.7.1 Generación y regulación de las especies reactivas de oxígeno

Las EROs son moléculas que contienen oxígeno que incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Durante mucho tiempo estas especies se consideraron moléculas exclusivamente tóxicas, induciendo patologías tales como el cáncer. Sin embargo, ahora se conoce que las EROs pueden servir como moléculas de señalización para regular numerosas respuestas fisiológicas y biológicas, incluyendo la señalización de factores de crecimiento y proliferación (Reczek & Chandel, 2017; Schieber & Chandel, 2014).

El H_2O_2 es la molécula de señalización mejor descrita. Un mecanismo entendido por el cual el H_2O_2 regula la traducción de señales es a través de la oxidación de residuos de cisteína de las proteínas para modificar su función. El H_2O_2 es desarrollado de una rápida dismutación de $O_2^{\cdot-}$

por la actividad enzimática de las superóxido dismutasas 1, 2 y 3 (*SOD1*, 2 y 3), localizadas en el citosol, la matriz mitocondrial y el espacio extracelular, respectivamente. También se ha demostrado la función de $O_2^{\cdot-}$ en la señalización redox, activando vías para la adaptación o para la muerte celular. Mientras que el OH^{\cdot} , que se forma cuando el H_2O_2 se somete a la reacción de Fenton con iones ferrosos o cuprosos, daña indiscriminadamente lípidos, proteínas y ADN (Reczek & Chandel, 2017; Sabharwal & Schumacker, 2014).

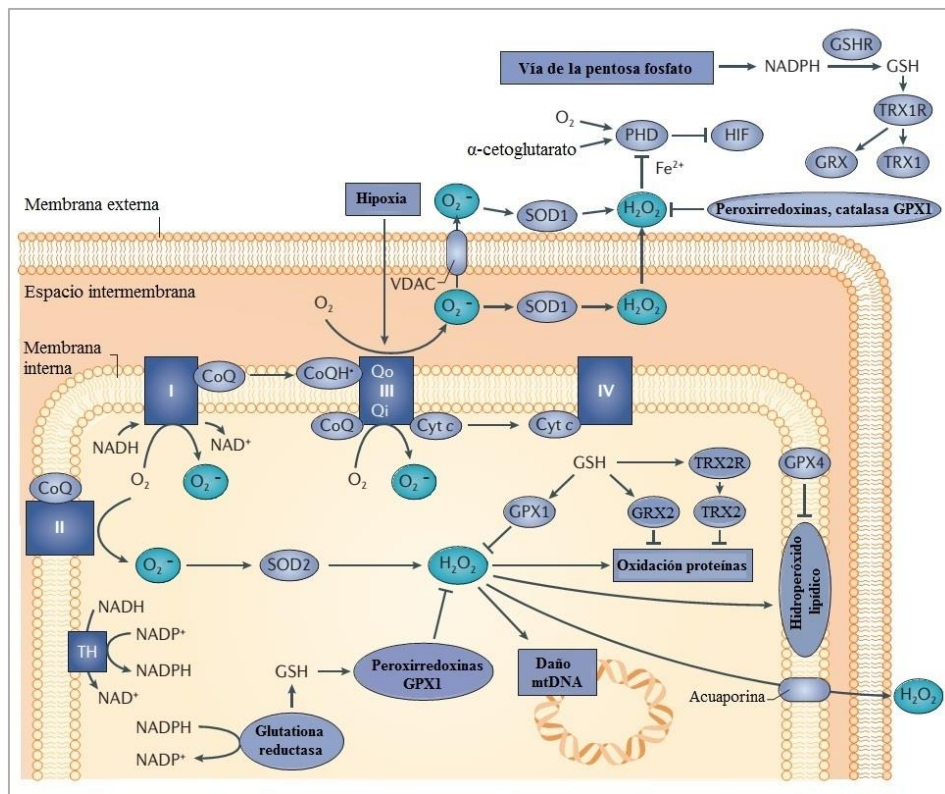


Figura 35. Generación y regulación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria. CoQ: ubiquinona; Qi: sitio de unión interno de CoQ en el complejo III; Qo: sitio de unión externo de CoQ en el complejo III; TH: *trans*-hidrogenasa mitocondrial. Adaptada de Sabharwal & Schumacker, 2014.

Las mitocondrias y las NADPH oxidasas unidas a la membrana celular (*NOXs*) son las principales fuentes de producción de EROs, siendo las *NOXs* quienes catalizan la generación intracelular y extracelular de $O_2^{\cdot-}$ a partir de O_2 y NADPH (Holmström & Finkel, 2014). Durante la respiración celular normal, los electrones pasan a través de una serie de complejos

mitocondriales al aceptor terminal de electrones: el oxígeno molecular (O_2). Este proceso puede causar que los electrones se escapen de la cadena transportadora de electrones y reaccionen con el O_2 para producir $O_2^{\cdot-}$. El $O_2^{\cdot-}$ es liberado en la matriz mitocondrial por los complejos I, II y III donde la *SOD2* lo convierte rápidamente en H_2O_2 que puede difundir libremente a través de la membrana mitocondrial o ser convertido en H_2O por las peroxirredoxinas (*PRX1* y *PRX3*) y la glutatión peroxidasa 1 (*GPX1*) usando los equivalentes reductores obtenidos de la oxidación del glutatión (*GSH*) (figura 35) (Gonçalves *et al.*, 2015). El glutatión oxidado (*GSSG*) es reducido por la glutatión reductasa (*GSHR*), la cual obtiene sus equivalentes de la oxidación del NADPH. El H_2O_2 generado en la matriz puede oxidar proteínas, lípidos o ADN mitocondrial (mtDNA). Las proteínas oxidadas son reparadas por la tiorredoxina 2 (*TRX2*) o la glutarredoxina 2 (*GRX2*), las cuales son subsecuentemente reducidas por la tiorredoxina reductasa 2 (*TRX2R*) o por el glutatión (figura 35). Adicionalmente, el complejo III puede liberar $O_2^{\cdot-}$ en el espacio intermembrana, donde el $O_2^{\cdot-}$ puede atravesar los canales aniónicos dependientes de voltaje (*VDAC*) y ser convertido en H_2O_2 por la *SOD1*. Ya en el citosol, el H_2O_2 puede reaccionar con cationes metálicos (Fe^{2+} o Cu^+) para generar el radical OH^{\cdot} , el cual daña indiscriminadamente el ADN, lípidos y proteínas. Para reducir su toxicidad, el H_2O_2 puede convertirse a H_2O por las *PRXs*, *GPXs* y la catalasa (*CAT*); o actuar como control de señalización celular a través de la oxidación tiol de las proteínas (figura 35) (Holmström & Finkel, 2014; Reczek & Chandel, 2017; Sabharwal & Schumacker, 2014; Schieber & Chandel, 2014).

También se ha evidenciado que bajo condiciones de hipoxia la generación no específica de EROs en la matriz mitocondrial disminuye, pero se incrementa la liberación de EROs desde el complejo III hacia el espacio intermembrana, posiblemente porque bajas concentraciones de oxígeno pueden prolongar el tiempo de vida del radical semiquinona ($UQ^{\cdot-}$ o $CoQ^{\cdot-}$) lo cual podría

aumentar la generación de $O_2^{\cdot -}$ y por ende la producción de H_2O_2 . De esta forma, el H_2O_2 que difunde al citosol puede inhibir las prolihidroxilasas (*PHDs*), aboliendo la estabilización del factor inductor de hipoxia α (*HIF α*) corriente abajo (figura 35) (Sabharwal & Schumacker, 2014).

Finalmente, a partir de los mecanismos de generación y regulación de EROs descritos, se puede deducir que si los niveles de H_2O_2 son bastante bajos, la señalización celular puede ser interrumpida, resultando en la homeostasis; cuando los niveles de H_2O_2 son bastante altos, puede ocurrir una señalización celular aberrante induciendo patologías tales como el cáncer; mientras que niveles descontrolados de H_2O_2 pueden inducir estrés oxidativo y muerte celular, debido a su capacidad de difundir a partes distantes de la célula, lejos del sitio de producción. Por lo tanto, el destino de las EROs como moléculas de señalización o agentes tóxicos depende del tipo de EROs, su concentración local y la abundancia de antioxidantes (Reczek & Chandel, 2017; Sabharwal & Schumacker, 2014; Schieber & Chandel, 2014).

1.7.2 Señalización protumorigénica promovida por las especies reactivas de oxígeno

Las células cancerígenas aumentan la tasa de producción de EROs localizada espacialmente para hiperactivar las vías de señalización necesarias para la tumorigénesis. La acumulación de EROs puede ocurrir como resultado de la activación de oncogenes, la pérdida de supresores de tumores, el aumento de la actividad metabólica, la privación de nutrientes (p. ej. poca glucosa) u oxígeno limitado (p. ej. hipoxia). Debido a que niveles excesivos de EROs pueden inducir daño oxidativo y muerte celular, las células cancerígenas regulan la acumulación de EROs mediante el aumento de su capacidad antioxidante. Para ello, activan el factor de transcripción nuclear eritroide 2 (*NRF2*) que aumenta la expresión de antioxidantes tales como las superóxido dismutasas (*SODs*), las peroxirredoxinas (*PRXs*), las glutatión peroxidasas (*GPXs*) y la catalasa (*CAT*); y la expresión

de genes involucrados con la producción de NADPH (para regular enzimas de la vía de las fosfato pentosas y la biosíntesis de serina), síntesis de glutatión (*GSH*) y enzimas de desintoxicación, entre otros. Este delicado equilibrio entre la producción y eliminación de EROs es el que mantiene un nivel óptimo de EROs para la señalización protumorigénica (Holmström & Finkel, 2014; Reczek & Chandel, 2017; Sabharwal & Schumacker, 2014).

A mediados de los noventa se demostró que EROs promueve la tumorigénesis, ya que mutaciones oncogénicas de *Ras* pueden conducir a un incremento en la producción de EROs mediada por *NOX4* para aumentar la proliferación y la supervivencia de las células cancerígenas. EROs puede hiperactivar la vía de supervivencia *PI3K/Akt/Mtor* por la oxidación e inactivación de las fosfatasas *PTEN* y *PTPIB* (reguladores negativos de la señalización *PI3K/Akt*). EROs también oxidan e inactivan las fosfatasas *MAPK*, induciendo la activación de receptores de factores de crecimiento y la señalización pro-proliferativa *MAPK/ERK*. Además promueve la supervivencia de las células tumorales a través de la activación de *NK-Kb* y *NRF2*, factores de crecimiento que regulan la expresión de antioxidantes para evadir la muerte celular mediada por EROs (Reczek & Chandel, 2017).

Por otra parte, las EROs promueven la angiogénesis y la metástasis, procesos interrelacionados asociados a menudo con un mal pronóstico. Las regiones dentro de tumores sólidos altamente proliferativos sufren de hipoxia y privación de glucosa, lo cual promueve la producción de EROs. Para sobrevivir y proliferar en este microambiente tumoral, las células cancerígenas se someten a cambios metabólicos que incluyen la estabilización del factor de crecimiento inductor de hipoxia *HIF* y la activación de las vías *AMPK* y metabolismo de carbono para aumentar la producción de NADPH y mantener el balance redox (Fan *et al.*, 2014). En contraste, la metástasis requiere la pérdida de la adhesión celular, resultando en la disociación celular del tumor primario y la

penetración de la membrana basal. Las EROs han mostrado regular numerosas vías de señalización (p.ej. *MAPK* y *PI3K/Akt*) y actividad transcripcional (p.ej. *HIF* y *Snail*) para aumentar la migración y la invasión de las células cancerosas. Adicionalmente, las EROs derivadas de *NOX* promueven la formación de invadopodia, protuberancias en la membrana plasmática que las células tumorales usan para invadir (Reczek & Chandel, 2017).

1.7.3 Señalización antitumorogénica promovida por las especies reactivas de oxígeno

Por otra parte, cuando los niveles de EROs son bastante altos, puede ocurrir la detención del ciclo celular, la senescencia y la muerte de las células cancerígenas. Las EROs promueven la muerte celular a través de la activación de las vías de señales *ASK1/JNK* y *ASK1/p38*. En su estado inactivo, *ASK1* interacciona con la *TRX* reducida (encargada de reducir las *PRXs* oxidadas), pero la oxidación de *TRX* mediada por H_2O_2 causa la disociación de *ASK1*, iniciando así la supresión de factores antiapoptóticos a través de la activación sostenida corriente abajo de las vías de señalización quinasas *MAP* quinasas: (*MKK4/MKK7/JNK* y *MKK3/MKK6/p38*) (Gorrini *et al.*, 2013; Reczek & Chandel, 2017). De esta forma, la activación de las vías de señales de *JNK* y *p38* mediada por EROs también pueden inducir la detención del ciclo celular, previniendo el crecimiento y la división de las células cancerosas (Reczek & Chandel, 2017). Como las células tumorales se desprenden de la matriz extracelular e invaden la membrana basal, aumentan los niveles de EROs y disminuye el conjunto de *GSH* reducido. El ambiente oxidante de la sangre previene la supervivencia y proliferación de muchas células cancerígenas circulantes. Por lo tanto, los niveles excesivos de EROs inhiben la metástasis distante (Piskounova *et al.*, 2015).

También se ha demostrado que cuando las EROs llegan al núcleo causan daños en el ADN, conduciendo a la activación de la polimerasa poli(ADP-ribosa) (*PARP*) y la reparación del ADN.

Sin embargo, si esto no se controla, la actividad *PARP* consume el NAD^+ citosólico y/o mitocondrial lo que detiene la glucólisis y ocasiona una crisis bioenergética letal (Gorrini *et al.*, 2013). De esta forma, el estrés oxidativo excesivo en la mitocondria conduce a una vía de muerte que involucra la activación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (*PTPm*), seguido por la liberación de factores proapoptóticos de la mitocondria, como el citocromo *c* (Sabharwal & Schumacker, 2014).

Finalmente, un nivel elevado de EROs con respecto a las células normales hace que las células cancerígenas sean potencialmente más vulnerables a la muerte celular inducida por estrés oxidativo. Esto implica que a través de estrategias que aumenten los niveles de EROs, ya sea por un incremento en su producción o por la disminución de los antioxidantes, se pueden eliminar las células cancerígenas sin dañar las células normales (Gorrini *et al.*, 2013; Reczek & Chandel, 2017).

Teniendo en cuenta la información expuesta en el marco de referencia, el cual revela la realidad del cáncer del hígado, las limitaciones de la quimioterapia disponible y las expectativas sobre el desarrollo de nuevos compuestos con actividad anticancerígena; este trabajo de investigación tuvo como motivación principal responder a los objetivos que se presentan a continuación.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar 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 Hep-G2 mediante el análisis de sus efectos citotóxicos, sus efectos sobre la función bioenergética mitocondrial y el mecanismo de muerte celular inducido.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de nuevos derivados polifuncionalizados de las 3-aril-tiazolo [3,4-*a*]pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre la viabilidad de células Hep-G2 y hepatocitos de rata Wistar *in vitro*.

- Describir el mecanismo de muerte celular inducido por los derivados 3-aril-tiazolo [3,4-*a*]pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre Hep-G2, mediante la identificación de cambios en la morfología celular y en la fragmentación del ADN.

- Analizar el efecto de los derivados 3-aril-tiazolo [3,4-*a*]pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre la función bioenergética mitocondrial, evaluando el consumo de oxígeno y la actividad enzimática en mitocondrias aisladas del hígado de rata Wistar.

En la siguiente sección se describen las estrategias metodológicas que se abordaron para cumplir con los objetivos propuestos.

3. Materiales y métodos

3.1 Compuestos

Los derivados polifuncionalizados de las 3-aryl-tiazolo [3,4-*a*]pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol (FM48, FM49 y FM52) fueron sintetizados y caracterizados por el Grupo de Investigación de Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) de la Universidad Industrial de Santander. Las estructuras químicas de estas moléculas se presentan en el anexo 1.

3.2 Evaluación de la actividad anticancerígena de las moléculas 3-aryl-tiazolo [3,4-*a*] pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol

3.2.1 Cultivo celular

La actividad citotóxica *in vitro* de las moléculas 3-aryl-tiazolo [3,4-*a*] pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol fue evaluada sobre células de hepatocarcinoma celular Hep-G2, células de adenocarcinoma pulmonar A549, células de adenocarcinoma cervical HeLa, células de melanoma B16F10 y células normales de riñón Vero.

Estas líneas celulares se cultivaron en botellas de plástico con medio EMEM (pH 7,3) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado y estreptomycin 100 µg/mL.

Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂ para su adhesión, crecimiento y replicación hasta obtener la cantidad de células necesarias para el desarrollo de los experimentos. Los repiques se realizaron usando una solución de tripsina-EDTA (pH 7,3).

3.2.2 Determinación de la viabilidad celular

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

Las células Hep-G2, A549, B16F10, HeLa y Vero se cultivaron en placas de 96 pozos (1×10^4 células/pozo) y se incubaron a 37°C con atmósfera de CO_2 (5%) durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente las células se trataron con diferentes concentraciones (5, 25, 50 y 100 μM) de las moléculas 3-aril-tiazolo [3,4-a] pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol preparados en medio de cultivo y 0,1% de DMSO. Como control positivo se realizó tratamiento con la droga oxaliplatino (1, 5, 25, 50 y 100 μM) y como control negativo las células sin tratamiento alguno. Pasado el tiempo del tratamiento (12, 24 o 48 horas) se descartó el sobrenadante de los pozos, se adicionaron 200 μL de MTT (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución salina de Hanks, HBSS) y se incubaron las células durante 3 horas. A continuación, se retiró la solución de MTT y se agregaron 200 μL de DMSO a cada pozo para solubilizar los cristales formados. La absorbancia del formazan se midió a 570 nm en un lector de microplacas *MultiSkan Go-Thermo*.

3.2.3 Evaluación de la morfología celular

Las células Hep-G2 fueron cultivadas en placas de 12 pozos (2×10^5 células/pozo) e incubadas a 37°C con atmósfera de CO_2 (5%) durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente, las

células fueron tratadas con los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol FM48, FM49 y FM52 (25 μM) disueltos en medio de cultivo y DMSO 0,1%.

Tras cumplir 24 horas de tratamiento, las células se lavaron dos veces con solución tampón de fosfato (PBS) y se fijaron con etanol al 70% (30 μL /pozo). A continuación, se retiró el etanol y las células fueron teñidas con GIEMSA (solución de hematoxilina y eosina). La morfología celular se observó a través de un microscopio óptico de luz invertida y las imágenes respectivas se adquirieron con una cámara monocromática *Nikon digital Sight DS-U2*.

3.2.4 Electroforesis de ADN para evaluar proceso de muerte celular

Las células Hep-G2 se cultivaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro (5×10^5 células/caja) y se incubaron a 37°C con atmósfera de CO_2 (5%) durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente, las células se trataron con los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol FM48, FM49 y FM52 (25 y 50 μM) disueltos en medio de cultivo y DMSO 0,1%. Como control positivo se realizó tratamiento con la droga doxorubicina en concentración 2 μM y como control negativo se emplearon células sin adición de droga o compuesto alguno.

Tras cumplir 48 horas de tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS y luego se soltaron en 1 mL de esta solución con ayuda de un raspador. La suspensión obtenida se centrifugó a 500xg por cinco minutos y las células sedimentadas se lisaron para extraer el ADN usando el kit *Quick Apoptotic DNA* Ref. KH01021 de *Life Technologies*.

A continuación, los extractos de ADN se separaron por electroforesis (90 V). Para esto se cargaron 2 μL de cada muestra en un gel de agarosa al 1% teñido con SyBr Green, y se usó el marcador *Quantity Marker 1kb* de *Gene Mate*. La imagen del gel se adquirió mediante el fotodocumentador *Chemidoc* de *Bio-Rad* empleando el software *Image-Lab*.

3.2.5 Determinación de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se determinaron de acuerdo con el protocolo de Wan y colaboradores (Wan *et al.*, 2003). Para esto, las células Hep-G2 se cultivaron en placa de fluorescencia de 96 pozos (2×10^4 células/pozo) y se incubaron a 37°C con atmósfera de CO₂ (5%) durante 24 horas para total adherencia. Luego se lavaron dos veces con solución PBS y se incubaron por 30 minutos con el compuesto diclorofluorescina (DFCH) 50 µM disuelto en PBS. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con solución PBS para realizar los tratamientos respectivos disueltos en la misma solución salina: control (solución PBS), DMSO 0,1%, H₂O₂ 400 µM, FM48 25 µM, FM49 25 µM y FM52 25 µM. Inmediatamente después, se inició la cinética de oxidación de DFCH al compuesto fluorescente diclorofluorosceína (DCF) (Gomes, Fernandes, & Lima, 2005) usando el equipo *Fluoroskan* de *Thermo*. Las medidas se realizaron con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm, en tiempos de: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180 y 240 minutos.

3.2.6 Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos de rata

El aislamiento y el cultivo primario de hepatocitos de rata adulta se realizaron de acuerdo con el protocolo de Shen y colaboradores (Shen *et al.*, 2012). El aislamiento de hepatocitos se realizó mediante la perfusión del hígado de rata Wistar macho (aproximadamente 200 g de peso), luego que éste fuese anestesiado con ketamina (50 mg/kg) y xilacina (7,5 mg/kg) vía intraperitoneal para realizar el procedimiento quirúrgico. La perfusión se realizó cuidadosamente por la infusión *in situ* de solución tampón I estéril (solución salina HBBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, suplementada con MgCl₂ 0.9 mM, EDTA 0.5 mM y HEPES 25 mM a 37°C) a 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

quedara con 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 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 mezclados con 10 μL de azul de tripán 0,4% (p/v)).

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.

3.2.7 Determinación de la viabilidad de los hepatocitos

Los hepatocitos aislados (con viabilidad > 60%) se cultivaron en placas de 96 pozos (5×10^5 células/pozo) en medio de cultivo M199 y se incubaron a 37°C con atmósfera de CO₂ (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 µM) disueltos en medio de cultivo *Hepatozyme-SFM* (suplementado con estreptomicina 100 µg/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, se descartó el sobrenadante de los pozos, se adicionaron 200 µL de MTT (500 µg/mL en solución salina de Hanks, HBSS) y se incubaron los hepatocitos durante 3 horas. A continuación, se retiró la solución de MTT y se agregaron 200 µL de DMSO a cada pozo para solubilizar los cristales de formazan. Su absorbancia fue medida 570 nm en un lector de microplacas *MultiSkan Go-Thermo*.

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.

3.3 Evaluación de la actividad de los compuestos híbridos de tretrahidroquinolina-isoxazol sobre la función bioenergética mitocondrial

3.3.1 Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata

Las mitocondrias fueron aisladas del hígado de rata Wistar macho (aproximadamente 160 g de peso, en ayuno por doce horas) de acuerdo con el protocolo descrito por Voss y colaboradores (Voss, Campello & Bacila, 1961). Para esto, la rata se sacrificó por decapitación y se retiró inmediatamente el hígado que fue inmerso en medio de aislamiento (D-Manitol 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y BSA 0,1% p/v, pH 7,4) a 4°C. El tejido se lavó con medio de aislamiento frío (para eliminar el exceso de sangre), se cortó y homogenizó en un homogeneizador *van Potter Elvehjem*. La suspensión obtenida se centrifugó a 600xg y 4°C durante cinco minutos con el fin de separar células intactas, membranas y núcleos. El sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 7000xg y 4°C por diez minutos. El nuevo *pellet* correspondiente a las mitocondrias intactas se resuspendió en medio de aislamiento frío y fue centrifugado a 6000xg y 4°C durante diez minutos. A continuación, las mitocondrias se resuspendieron en medio de aislamiento sin BSA y se lavaron por centrifugación a 7000xg y 4°C durante diez minutos. Finalmente, las mitocondrias aisladas se conservaron a 4°C en medio de aislamiento sin BSA y su concentración proteica se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) para realizar los ensayos de consumo de oxígeno posteriores.

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.

3.3.2 Determinación del consumo de oxígeno

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

Las mitocondrias íntegras aisladas de hígado de rata (1 mg/mL) se dispusieron en el oxígrafo en un medio de incubación compuesto por: manitol 125 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES 10 mM y KCl 65 mM, pH 7,4, a 28°C con agitación constante. Este sistema fue suplementado con glutamato de sodio 5 mM, KH₂PO₄ (Pi) 1,6 mM y ADP 0,6 mM para medir el consumo de oxígeno vía complejo I de la cadena respiratoria. Por otra parte, las mitocondrias (1 mg/mL) se suplementaron con rotenona 1 μM (inhibidor del complejo I), succinato de sodio 3 mM, KH₂PO₄ (Pi) 1,6 mM y ADP 0,6 mM para medir la respiración vía complejo II (Voss, Campello, & Bacila, 1961; Voss, Cowles, & Bacila, 1963).

Por su parte, los compuestos de tetrahydroquinolina-isoxazol (en concentraciones de 5 y 25 μM) se incubaron con las mitocondrias durante dos minutos, antes de inducir la respiración mitocondrial por adición de los sustratos del complejo I o el complejo II.

Las mitocondrias aisladas que no se utilizaron para determinar el consumo de oxígeno fueron criopreservadas para los ensayos de actividad enzimática que se desarrollaron posteriormente.

3.3.3 Actividad enzimática mitocondrial

Las mitocondrias aisladas se utilizaron como fuente de enzimas tras ser lisadas por ciclos de congelamiento y descongelamiento a -190°C. Las proteínas extraídas se cuantificaron por el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

La actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria se determinó por métodos espectrofotométricos usando el equipo *Multiskan Go-Thermo* y el software *Skant RE 4.1*, y por métodos polarográficos empleando el oxígrafo *Hansatech* y el software *Oxygraph plus* según correspondiera con la enzima estudiada. Los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol a la concentración de 25 μM fueron incubados con la proteína mitocondrial durante dos minutos antes de inducir la reacción para cada una de las enzimas evaluadas.

3.3.3.1 NADH oxidasa

La actividad de la enzima NADH oxidasa se evaluó de acuerdo con el método de Singer (Singer, 1974), en un sistema de reacción compuesto por solución tampón fosfato (PBS) 80 mM pH 7,4, EDTA 50 μM , 1 mg de proteína mitocondrial y NADH 0.17 mM con agitación constante a 28°C.

La reacción fue iniciada por la adición de NADH, cuya velocidad de oxidación se tradujo en la velocidad de consumo de oxígeno medido polarográficamente.

3.3.3.2 NADH deshidrogenasa

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

La oxidación de NADH por la NADH deshidrogenasa se monitoreó a 420 nm por la reducción del ferricianuro de potasio que actuó como receptor artificial de electrones en presencia de rotenona. La concentración del ferricianuro de potasio reducido se determinó mediante su

coeficiente de extinción molar $1,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 420 nm (Arif *et al.*, 2012) aplicando la Ley de Beer.

3.3.3.3 NADH citocromo *c* reductasa

La actividad de la enzima NADH citocromo *c* reductasa se evaluó mediante el protocolo descrito por Somlo, registrando la velocidad de reducción del citocromo *c* a 550 nm (Somlo, 1965). Para ello se utilizó un sistema de reacción compuesto por: PBS 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, KCN 1 mM y NADH 50 μM incubado a 28°C durante diez minutos. La reacción fue iniciada por la adición de citocromo *c* (oxidado) 40 μM . La concentración del citocromo *c* reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar redox (ϵ_{redox}) 19,8 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm (Appleby & Morton, 1959) aplicando la Ley de Beer.

3.3.3.4 Succinato oxidasa

La actividad de la enzima succinato oxidasa se evaluó de acuerdo con el método de Singer (Singer, 1974), en un sistema de reacción compuesto por PBS 80 mM pH 7,4, EDTA 50 μM , 0,5 mg de proteína mitocondrial y succinato de sodio 10 mM con agitación constante a 28°C. La reacción fue iniciada por la adición del succinato de sodio cuya velocidad de oxidación se tradujo en la velocidad de consumo de oxígeno medido polarográficamente.

3.3.3.5 Succinato deshidrogenasa

La enzima succinato deshidrogenasa se estudió de acuerdo con el método espectrofotométrico descrito por Singer (Singer, 1974), usando un sistema de reacción compuesto por PBS 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, rotenona 1 μM , KCN 1 mM y succinato de sodio 20 mM que se incubó por diez minutos a 28°C. A continuación, se agregaron los receptores artificiales de electrones fenazina metosulfato (PMS) 1 mM y 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP)

60 μM para dar inicio a la reacción. La velocidad de reducción del DCPIP fue monitoreada a 600 nm como evidencia de la actividad de la succinato deshidrogenasa. La concentración del DCPIP reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar $21,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 600 nm (Arif *et al.*, 2012) aplicando la Ley de Beer.

3.3.3.6 Succinato citocromo *c* reductasa

La actividad de la enzima succinato citocromo *c* reductasa se evaluó mediante el protocolo descrito por Somlo, registrando la velocidad de reducción del citocromo *c* a 550 nm tras bloquear la cadena respiratoria con KCN y rotenona (Somlo, 1965). Para ello se utilizó un sistema de reacción compuesto por: PBS 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, rotenona 1 μM , KCN 1 mM y succinato de sodio 5 mM incubado a 28°C durante diez minutos. La reacción fue iniciada por la adición de citocromo *c* 40 μM . La concentración del citocromo *c* reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar (ϵ_{redox}) $19,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm (Appleby & Morton, 1959) aplicando la Ley de Beer.

3.3.3.7 Citocromo *c* oxidasa

La actividad de la enzima citocromo *c* oxidasa se determinó según el método propuesto por Mason y colaboradores, acompañando la velocidad de oxidación del citocromo *c* a 550 nm en un sistema de reacción compuesto por: PBS 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM y 0,1 mg de proteína mitocondrial incubado a 28°C durante diez minutos. La reacción se inició al agregar citocromo *c* reducido 30 μM (Mason, Poyton, & Wharton, 1973). La concentración del citocromo *c* oxidado se determinó mediante su coeficiente de extinción molar (ϵ_{redox}) $19,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Appleby & Morton, 1959) aplicando la Ley de Beer.

3.3.3.8 ATPasa en mitocondrias fragmentadas

La actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas se determinó mediante la cuantificación del fosfato resultante de la hidrólisis del ATP de acuerdo con el método de Pullman y colaboradores (Pullman *et al.*, 1960). El sistema de reacción compuesto por: solución tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgSO₄ 3 mM, 1 mg de proteína mitocondrial, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 mM y 10 unidades (U) de piruvato quinasa (1 U de piruvato quinasa convierte 1 μ mol de PEP a piruvato por minuto), se incubó a 28°C durante diez minutos. La reacción inició por la adición de ATP 4 mM y se interrumpió diez minutos después al agregar ácido tricloroacético (TCA) al 5% (v/v). A continuación, el sistema de reacción se centrifugó a 10000xg por un minuto y se tomó el sobrenadante para cuantificar el fosfato liberado en el medio. La concentración de fosfato en las muestras, se determinó colorimétricamente por la formación de un complejo de fosfomolibdato reducido con ácido ascórbico, que produjo una coloración azul cuya absorbancia se midió a 820 nm (Chen *et al.*, 1956; Dunham & Christianson, 2005). Para esto, se realizó previamente una curva de calibración con patrones conocidos de KH₂PO₄ en un rango de concentraciones de 1,0-300 μ M.

3.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos están representados por la media \pm desviación estándar (DE). Los datos fueron analizados estadísticamente usando el software *GraphPad Prism 5* mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey para la comparación de los promedios. Los resultados con un valor $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos respecto al control.

3.5 Disposición de los residuos biológicos y químicos

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

Las moléculas de tiazolidina, los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol, los solventes y los colorantes usados en esta investigación se clasificaron como residuos químicos peligrosos debido a que pueden ser citotóxicos y causar daño a la salud humana y/o el medio ambiente. Así mismo se consideraron peligrosos los envases, empaques o embalajes que hayan estado en contacto con ellos. Por tal razón, teniendo en cuenta el código de colores para el almacenamiento de estas sustancias, los residuos se dispusieron en bolsa de color rojo etiquetada con el rótulo “Riesgo Químico” y se entregaron en la ruta de recolección y almacenamiento de residuos peligrosos organizada por el PGIR en el Parque Tecnológico Guatiguará, diligenciando el formato FGA.06 para su disposición final a la empresa contratada para su neutralización e incineración.

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

bolsa roja anudada y se congelaron a -20°C para evitar derramamiento de líquidos. Estos desechos fueron entregados en la ruta de recolección y almacenamiento de residuos biológicos organizada por el PGIR en la Facultad de Salud, para su posterior entrega a la empresa encargada del transporte y tratamiento final (incineración).

4. Resultados y discusión

A continuación, se exponen los resultados obtenidos de actividad anticancerígena de nuevos derivados polifuncionalizados de las 3-aryl-tiazolo [3,4-*a*]pirazin-5,8-dionas y compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre células de hepatocarcinoma humano Hep-G2, en función de sus efectos citotóxicos y su acción sobre la bioenergética mitocondrial.

4.1 Evaluación de la actividad anticancerígena de las moléculas 3-aryl-tiazolo [3,4-*a*] pirazin-5,8-dionas y los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol

4.1.1 Viabilidad celular

Inicialmente se evaluó una serie de moléculas híbridas de tiazolidina-dicetopiperazina (Anexo 1, tabla A) sobre un panel de líneas celulares de cáncer (A549, B16F10, HeLa y Hep-G2) y un control de células normales (Vero), para determinar su potencial citotóxico y escoger aquellos compuestos con mejor actividad sobre las células de hepatocarcinoma Hep-G2 (línea celular seleccionada como objeto de estudio para el presente trabajo).

En la tabla 2 se presentan los valores de concentración citotóxica CC_{50} y los índices de selectividad de los derivados de tiazolidina-dicetopiperazina. De los doce compuestos evaluados, sólo dos presentaron toxicidad significativa sobre células de melanoma B16F10: (3RS,8aR)-7-(4-clorobencil)-3-(4-nitrofenil)tetrahidrotiazol[3,4-*a*]pirazin-5,8-diona (**JK112**) y (3RS,8aR)-7-(4-metilbencil)-3-(4-nitrofenil)tetrahidrotiazol[3,4-*a*]pirazin-5,8-diona (**JK113**), con CC_{50} de 20,9 y 30,0 μ M, respectivamente. Mientras que, sólo la molécula (3RS,8aR)-7-(4-clorobencil)-3-(4-metilfenil) tetrahidrotiazol[3,4-*a*]pirazin-5,8-diona (**JK102**) tuvo toxicidad significativa sobre células de hepatocarcinoma humano Hep-G2 con una CC_{50} de 28,6 μ M.

Tabla 2. Actividad citotóxica de los compuestos derivados de tiazolidina-dicetopiperazina sobre diferentes líneas celulares de cáncer tras 48 horas de tratamiento.

Actividad citotóxica CC ₅₀ (µM)									
Compuesto	A549		B16F10		HeLa		Hep-G2		Vero
	CC ₅₀ ^a	IS ^b	CC ₅₀	IS	CC ₅₀	IS	CC ₅₀	IS	CC ₅₀
JK64	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100
JK69	>100	>1,0	44,9±6,8	>2,2	>100	>1,0	>100	>1,0	>100
JK81	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100
JK82	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100
JK99	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100
JK102	>100	>1,0	62,5±15,0	0,8	>100	<1,0	28,6±4,9	1,7	47,5±7,2
JK103	>100	>1,0	>100	<0,8	>100	<1,0	54,2±15,4	1,4	77,3±6,7
JK101	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	95,2±1,9	>1,1	>100
JK109	>100	>1,0	47,2±14,1	>2,1	>100	>1,0	>100	>1,0	>100
JK112	88,7±0,9	0,5	20,9±5,3	2,0	57,5±6,6	0,7	66,1±5,1	0,6	42,2±7,4
JK113	85,7±4,7	>1,2	30,0±6,4	>3,3	>100	>1,0	>100	>1,0	>100
JK114	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100	>1,0	>100
Oxaliplatino ^c	31,2±1,7	1,7	4,9±1,2	10,5	14,3±2,8	3,6	22,4±1,1	2,3	51,5±2,2

^a La concentración citotóxica CC₅₀ fue determinada *in vitro* por el ensayo colorimétrico MTT. El valor de CC₅₀ representa la concentración que reduce en un 50% la viabilidad de una determinada población de células cancerígenas después de cultivarse por 48h con el compuesto de interés, en contraste con las células control no tratadas. Los datos están representados por la media ± desviación estándar de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

^b El índice de selectividad (IS) se determinó considerando como control de células no cancerígenas la línea celular Vero (IS= CC₅₀ Vero/ CC₅₀ línea celular).

^c Droga usada como control positivo en concentraciones de 1, 5, 25, 50 y 100 µM.

Estos resultados sugieren que el sustituyente nitrofenil (Anexo 1, tabla A) incrementa la actividad citotóxica de los compuestos híbridos de tiazolidina-dicetopiperazina, **JK109**, **JK112** y **JK113**, sobre las células de melanoma B16F10 en comparación con las otras líneas celulares testeadas. Lo que sería un indicio de que la propiedad electroattractora del grupo *p*-nitro en el sustituyente fenil de la estructura tiazol, puede ejercer un papel crítico en el efecto citotóxico de estos derivados (Mohammadi-Farani *et al.*, 2014). Destacando que la presencia del sustituyente clorobencil en la estructura dicetopierazina del compuesto **JK112**, resulta en un efecto citotóxico sobre todas las líneas celulares evaluadas a diferentes concentraciones CC₅₀ (tabla 2). Por lo que es posible que el efecto electroatrayente y la lipofilicidad del átomo de cloro esté ampliando el espectro de actividad citotóxica del derivado **JK112** (Mohammadi-Farani *et al.*, 2014).

No obstante, los derivados de tiazolidina-dicetopiperazina que son citotóxicos, poseen un bajo índice de selectividad respecto a las células normales Vero y presentan baja solubilidad, ya que bajo las condiciones de tratamiento *in vitro* se evidenciaba la precipitación de cristales de los compuestos en la superficie del cultivo celular, como ocurrió con el compuesto **JK102** desde la concentración de 25 μ M (figura 36), **JK103** y **JK112** (desde 50 μ M), y **JK101** (100 μ M).



Figura 36. Formación de cristales del compuesto JK102-25 μ M en cultivo de células Hep-G2.

A pesar de esto, es importante resaltar que su actividad citotóxica no estuvo relacionada directamente con la formación de los cristales, debido a que compuestos como **JK113** (100 μ M) y **JK114** (desde 50 μ M) que no presentaron actividad citotóxica a las concentraciones evaluadas, también cristalizaban durante el tratamiento de las células.

Tomando en consideración los problemas de solubilidad (a las concentraciones CC_{50}) y el bajo índice de selectividad respecto a Vero (tabla 2) de los compuestos que mostraron actividad citotóxica sobre Hep-G2, se decidió no continuar con la evaluación de la actividad anticancerígena de estos derivados de tiazolidina-dicetopiperazina. A cambio de esto, se seleccionaron los compuestos: 3-(4-metoxifenil)-5-((6'-cloro-4'-(2'-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2'H)-il) metil) isoxazol (**FM48**), 3-(4-metoxifenil)-5-((6'-metil-4'-(2'-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2'H)-il) metil) isoxazol (**FM49**) y 3-(4-metoxifenil)-5-((4'-(2'-

oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2'H)-il) metil) isoxazol (**FM52**) de una serie de nuevos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol, cuya actividad citotóxica se estaba evaluando simultáneamente en el grupo de investigación (Anexo 1, tabla B) (Bueno Duarte, 2016).

Tabla 3. Actividad citotóxica de los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol **FM48**, **FM49** y **FM52** sobre diferentes líneas celulares de cáncer tras 48 horas de tratamiento.

Actividad citotóxica CC ₅₀ (μM)									
Compuesto	A549		B16F10		HeLa		Hep-G2		Vero
	CC ₅₀ ^a	IS ^b	CC ₅₀	IS	CC ₅₀	IS	CC ₅₀	IS	CC ₅₀
FM48	>100	>1,0	>100	>1.0	NA	NA	27,6±1,6	>3,6	>100
FM49	NA ^d	NA	>100	>1.0	>100	>1,0	15,6±0,9	>6,4	>100
FM52	52,0±17,8	>1,9	>100	>1,0	>100	>1,0	41,3±6,9	>2,4	>100
Oxaliplatino ^c	31,2±1,7	1,7	4,9±1,2	10,5	14,3±2,8	3,6	22,4±1,1	2,3	51,5±2,2

^a La concentración citotóxica CC₅₀ fue determinada *in vitro* por el ensayo colorimétrico MTT. El valor de CC₅₀ representa la concentración que reduce en un 50% la viabilidad de una determinada población de células cancerígenas después de cultivarse por 48h con el compuesto de interés, en contraste con las células control no tratadas. Los datos están representados por la media ± desviación estándar de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

^b El índice de selectividad (IS) se determinó considerando como control de células no cancerígenas la línea celular Vero (IS= CC₅₀ Vero/ CC₅₀ línea celular).

^c Droga usada como control positivo en concentraciones de 1, 5, 25, 50 y 100 μM.

^d Valor no determinado debido al comportamiento de los datos.

Las moléculas **FM48**, **FM49** y **FM52** mostraron una toxicidad significativa sobre células Hep-G2 con respecto a otras líneas celulares de cáncer evaluadas (tabla 3), sin que se evidenciaran problemas de solubilidad a las concentraciones testeadas. Además, su selectividad para disminuir la viabilidad de Hep-G2, considerando Vero como control de células normales, es mayor en comparación con la droga oxaliplatino usada como control positivo, siendo el compuesto **FM49** el que posee un mejor perfil citotóxico sobre Hep-G2 al presentar el menor valor de CC₅₀ y el mayor índice de selectividad (tabla 3).

Estos resultados sugieren que el sustituyente -CH₃ en **FM49** (anexo 1, tabla B) conlleva al aumento de la selectividad y la citotoxicidad del andamio tetrahydroquinolina-isoxazol sobre las células Hep-G2; mientras que, la sustitución por -Cl en **FM48** y por -H en **FM52** (anexo 1, tabla

B) disminuyen la selectividad y conducen a un incremento de la concentración CC_{50} para inducir el mismo efecto citotóxico obtenido con **FM49** sobre Hep-G2.

A continuación, se procedió a evaluar la acción de estos compuestos a las concentraciones de 5, 25, 50 y 100 μM sobre la viabilidad de células Hep-G2 a diferentes tiempos de tratamiento: 12, 24 y 48 horas (figura 37).

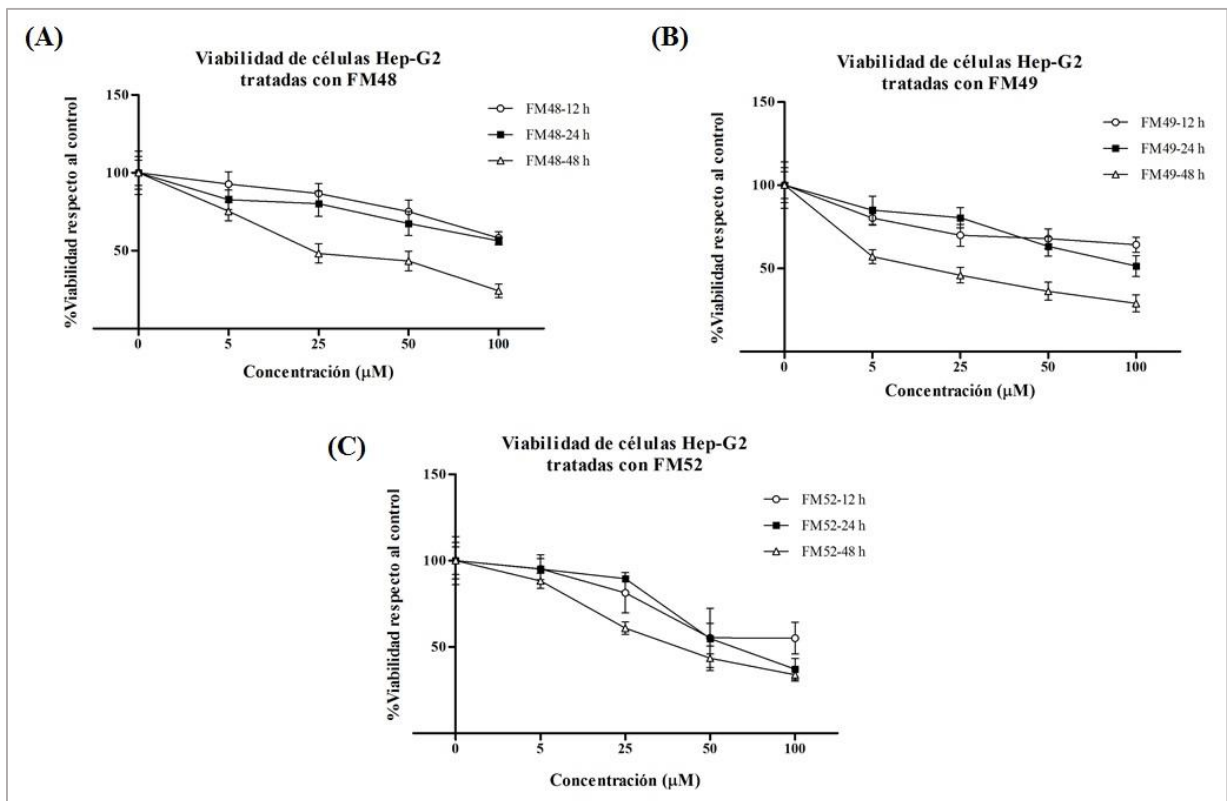


Figura 37. Comparación de la viabilidad de células Hep-G2 tratadas a diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas) con el compuesto (A) FM48, (B) FM49 y (C) FM52. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de viabilidad respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

En general, se aprecia una tendencia a disminuir el porcentaje de viabilidad de las células Hep-G2 a medida que aumenta la concentración de los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol **FM48**, **FM49** y **FM52** (figura 37). No obstante, se observa que la citotoxicidad de los compuestos **FM48** y **FM49** sobre las células Hep-G2 es dependiente del tiempo de tratamiento, debido a que se presenta una disminución significativa ($p < 0,001$) de la viabilidad celular después de 48 horas,

con respecto a la viabilidad a las 12 y 24 horas pos-tratamiento, a partir de la concentración de 25 μM en **FM48** (figura 37-A) y de 5 μM en **FM49** (figura 37-B). Este comportamiento podría deberse a que, durante las primeras horas del tratamiento las células intentan sobrevivir a través de mecanismos como la autofagia, que les permiten sobreponerse a la escasez de nutrientes y/o energía, pero a medida que este recurso se va agotando, la función metabólica y por ende la viabilidad celular van disminuyendo, conllevando irremediablemente a la muerte (Su *et al.*, 2015). Mientras que, a diferencia de **FM48** y **FM49**, las gráficas de viabilidad obtenidas para **FM52** indican que su actividad citotóxica sobre células Hep-G2 no es dependiente del tiempo de tratamiento (figura 37-C).

Posteriormente, se evaluó la selectividad de los híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol **FM48**, **FM49** y **FM52** de acuerdo con sus efectos sobre la viabilidad de las células Hep-G2 con respecto a hepatocitos normales aislados del hígado de rata adulta (figura 38).

Es importante destacar que los hepatocitos, a diferencia de las células Hep-G2, se caracterizan por la regulación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y la maquinaria antioxidante (Kung *et al.*, 2014; Reczek & Chandel, 2017), además son susceptibles a la apoptosis mediada por receptores de muerte, expresando mínimamente la proteína *RIP3* requerida para la necroptosis (Guicciardi *et al.*, 2013).

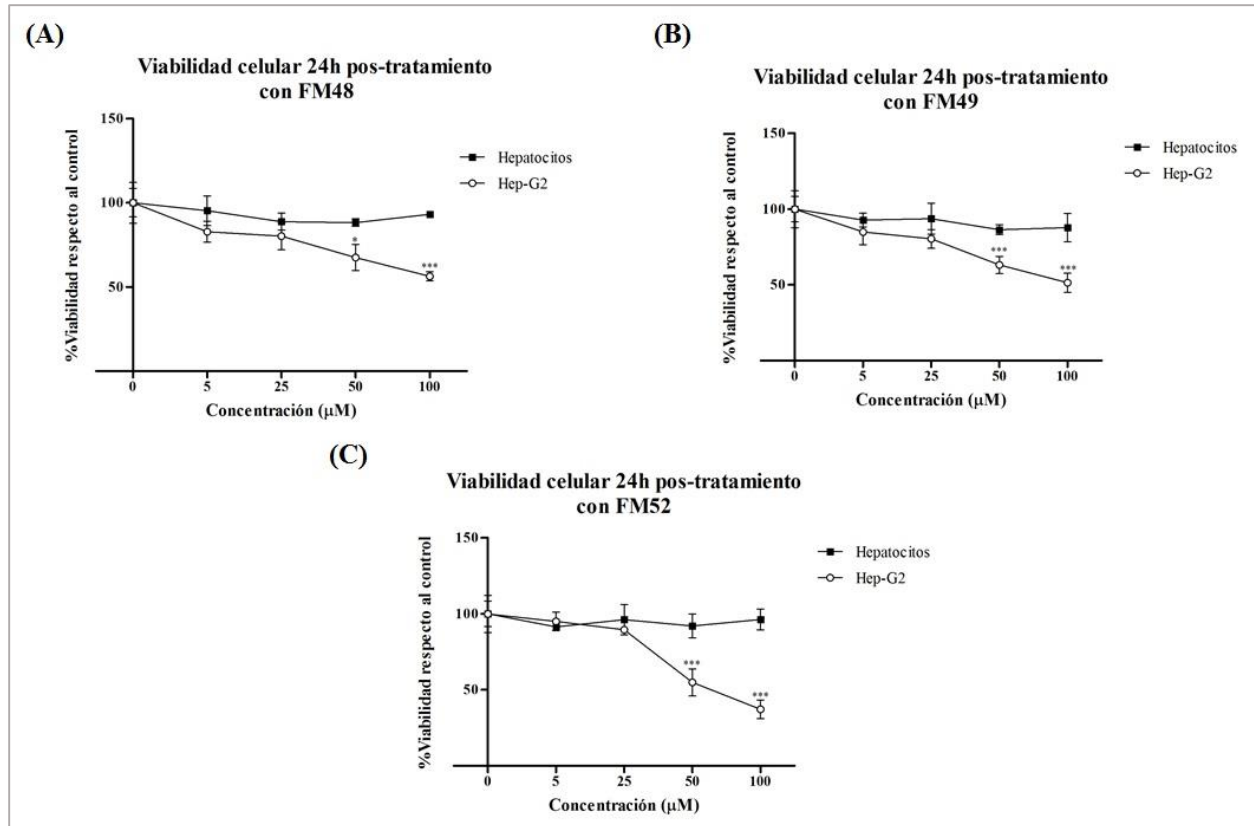


Figura 38. Comparación de la viabilidad de células Hep-G2 vs. hepatocitos después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de (A) FM48, (B) FM49 y (C) FM52. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de viabilidad respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos demuestran que estos compuestos no afectan la viabilidad de los hepatocitos a las 24 horas pos-tratamiento, dado que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas y el control. En contraste, los tratamientos con **FM48**, **FM49** y **FM52** sobre las células Hep-G2 conducen a una disminución significativa de la viabilidad respecto a los hepatocitos a las concentraciones de 50 y 100 μM (figura 38), sugiriendo una actividad citotóxica diferencial de estas moléculas entre los dos tipos de células testeadas, Hep-G2 y hepatocitos.

4.1.2 Morfología celular

Con el fin de identificar los posibles mecanismos celulares que podrían estar relacionados con la disminución en la viabilidad de las células Hep-G2 expuestas a **FM48**, **FM49** y **FM52**, se comenzó evaluando sus efectos sobre la morfología celular.

En la figura 39 se puede observar que las células Hep-G2 tratadas con **FM48** presentan un hinchamiento de la membrana (oncosis) acompañado por la formación de vacuolas y la pérdida de la estructura del citoesqueleto. También es posible evidenciar que en la mayoría de las células se ha disuelto la cromatina por degradación del ADN ya que no es posible diferenciar los núcleos del citoplasma, y en algunas regiones se observa la formación de ampollas (*blebbing*) hacia afuera de la membrana. Para el caso del tratamiento con **FM52**, las células Hep-G2 evidencian las mismas alteraciones morfológicas observadas con **FM48** en un estado menos avanzado, debido a que aún pueden diferenciarse los núcleos en algunas de las células, a pesar de la pérdida de la estructura del citoesqueleto y la formación de vacuolas en diferentes regiones (figura 39).

Es importante destacar que la vacuolización citoplasmática y el hinchamiento de la membrana presentes en las células Hep-G2 tratadas con **FM48** y **FM52**, se han asociado con diferentes mecanismos de muerte celular, entre ellos la necroptosis, (Aki *et al.*, 2012; Chen & Zhang, 2016; Essmann *et al.*, 2003), otras formas de necrosis regulada y la metuosis (Aki *et al.*, 2012; Maltese & Overmeyer, 2014).

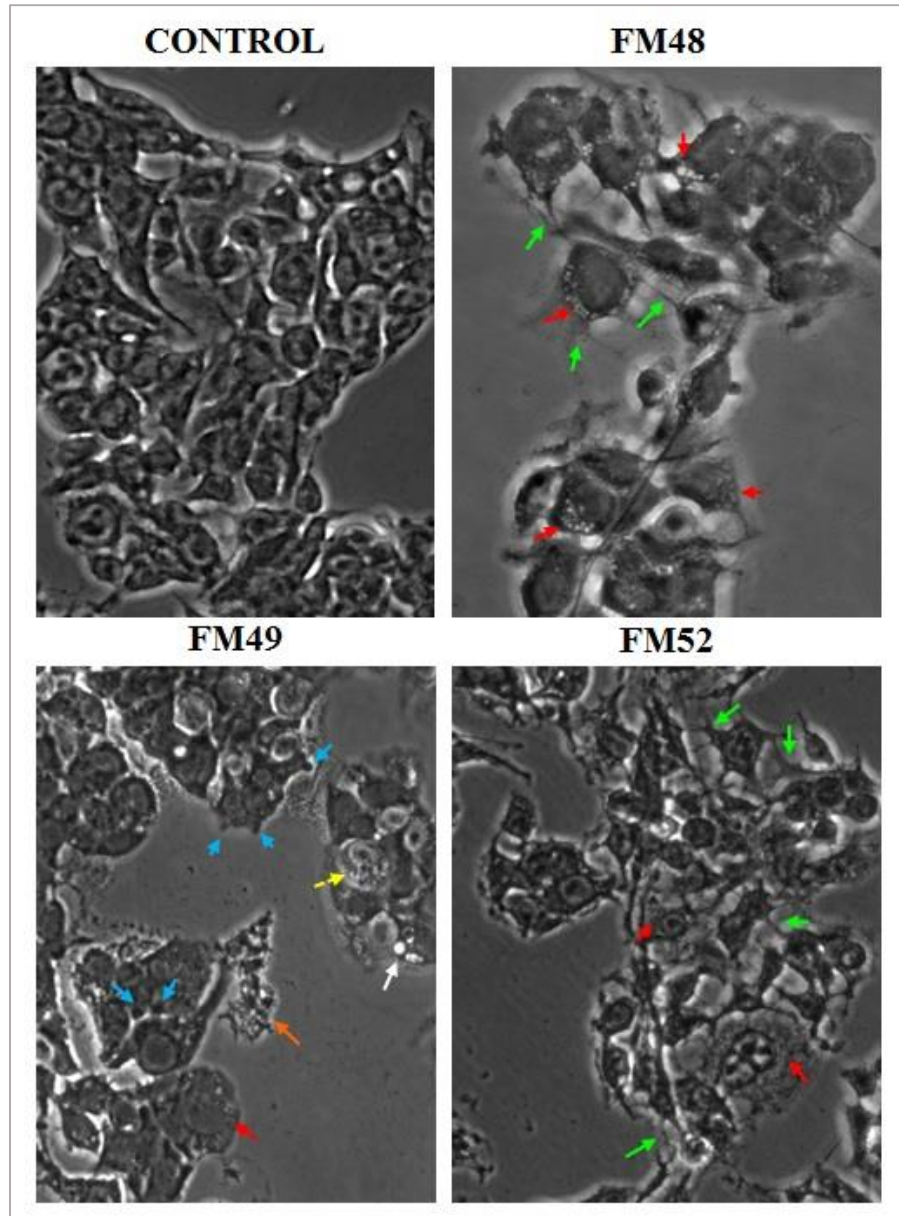


Figura 39. Cambios morfológicos observados en células Hep-G2 después de 24 horas de tratamiento con los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52** a la concentración de 25 μM . Las imágenes fueron capturadas por microscopía óptica (40X) con un sistema *Nikon digital Sight DS-U2*. Los colores de las flechas indican: vacuolización de la membrana celular (rojo); pérdida del citoesqueleto (verde); ampollas o *blebbing* (azul); célula apoptótica característica (amarillo); proceso avanzado de muerte celular (naranja); y vacuola de reciclaje (blanco).

Teniendo en cuenta que la endocitosis se considera una de las rutas principales por las que aminoras o bases débiles lipofílicas entran a las células durante la vacuolización citoplasmática (Aki

et al., 2012), este proceso podría explicar las vacuolas generadas en las células Hep-G2 tratadas con **FM48** y **FM52**, asociado posiblemente a la macropinocitosis donde la formación de las vacuolas implica el reordenamiento del citoesqueleto de actina en la membrana plasmática (Bloomfield & Kay, 2016; Lim & Gleeson, 2011). Esto estaría relacionado con el aumento de volumen de la membrana y la degradación del citoesqueleto, sugiriendo un agotamiento del ATP necesario para la formación de actina (Maltese & Overmeyer, 2014; Rudolf & Červinka, 2006). No obstante, las vacuolas pueden generarse mediante distintas fuentes de la membrana, como procesos de endocitosis y/o autofagia (autofagosomas, autolisosomas), que no pueden diferenciarse mediante microscopía óptica (Aki *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010).

En contraste con **FM48** y **FM52**, las células Hep-G2 tratadas con **FM49** presentan una formación predominante de ampollas (*blebbing*) desprendiéndose de la membrana celular, acompañada en algunas regiones por la fragmentación del citoplasma en etapas temprana y avanzada, con diferenciación de la cromatina (figura 39). En conjunto, estos cambios morfológicos son un indicio de que las células están sufriendo un proceso de apoptosis, teniendo en cuenta que las ampollas o *blebbing* se consideran una alteración morfológica característica de muerte celular apoptótica (Chen & Zhang, 2016; Rudolf & Červinka, 2006). Sin embargo, también se evidencian alteraciones asociadas con muerte celular no apoptótica, como la presencia de células hinchadas con vacuolización citoplasmática en las que no se diferencian los núcleos (figura 39) (Chen & Zhang, 2016; Rudolf & Červinka, 2006), sugiriendo que el tratamiento con **FM49** estaría induciendo, de manera simultánea, diferentes mecanismos de muerte celular en las células Hep-G2.

Finalmente, los cambios morfológicos observados en las células Hep-G2 tratadas con **FM48**, **FM49** y **FM52** se pueden relacionar con la disminución de la capacidad de estas células para

reducir el MTT a formazán (figuras 37 y 38), siendo esto un reflejo de la pérdida de actividad metabólica de las deshidrogenasas en la mitocondria y en otros compartimentos subcelulares (Maltese & Overmeyer, 2014).

4.1.3 Electroforesis de ADN

Considerando que el patrón de fragmentación del ADN podría dar un indicio respecto al mecanismo de muerte celular inducido por los híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol, se realizó la separación electroforética del ADN extraído de células Hep-G2 tratadas durante 24 horas con **FM48**, **FM49** y **FM52** (25 y 50 μM) (figura 40). La doxorubicina (2 μM) se usó como control positivo de apoptosis.

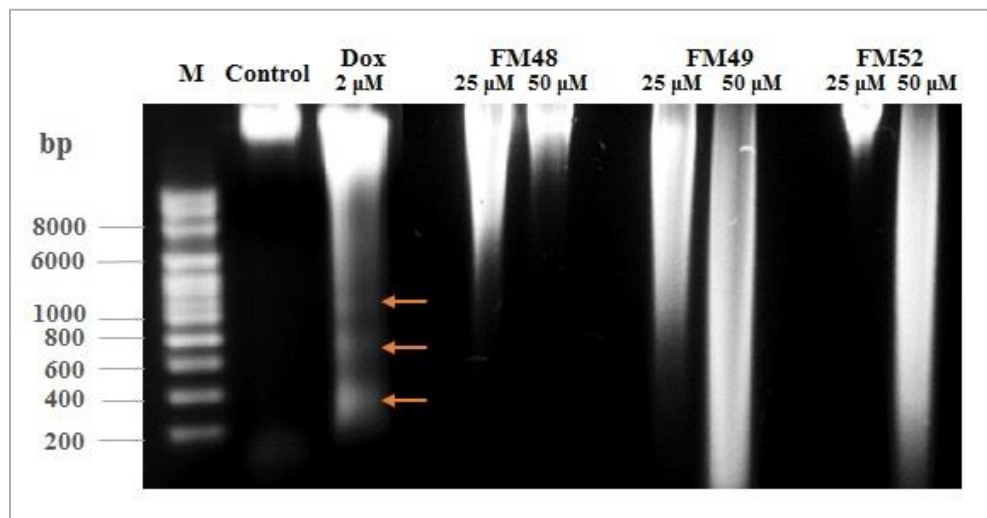


Figura 40. Análisis de fragmentación de ADN separado por electroforesis en gel de agarosa al 1% de células Hep-G2 tratadas por 24 horas con los derivados **FM48**, **FM49** y **FM52** en concentraciones de 25 y 50 μM . M: marcador de pares de bases (bp); Dox 2 μM : doxorubicina, control positivo; y Control: células Hep-G2 sin tratamiento. Las flechas indican las bandas de fragmentación.

Los resultados obtenidos indican que, bajo el efecto de los tres derivados, no ocurre fragmentación específica del ADN (figura 40), lo cual es coherente con las observaciones hechas en morfología celular donde no fue posible diferenciar la cromatina de algunas células, probablemente debido a su degradación y difusión en el contenido citoplasmático (figura 39). Sin

embargo, el hecho de que no se evidencie fragmentación específica del ADN en respuesta a los tratamientos con los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52**, no descarta la posibilidad que esté ocurriendo apoptosis de manera simultánea con otros tipos de muerte celular no apoptóticos (no dependientes de caspasas), de acuerdo con los cambios morfológicos evidenciados cuando las células Hep-G2 son tratadas con **FM49** (figura 39). Además, de comprobarse que estos mecanismos de muerte son regulados, esto podría representar una ventaja para el tratamiento del hepatocarcinoma, teniendo en cuenta que uno de los principales problemas de esta enfermedad es su resistencia a la inducción de apoptosis (Guicciardi *et al.*, 2013).

4.1.4 Especies reactivas de oxígeno

Debido a que las alteraciones en el equilibrio redox están relacionadas con los procesos de inducción de muerte celular, se midió la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células Hep-G2 tratadas con los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52** en la concentración de 25 μM , usando análisis fluorométrico con DCFH. Para esto, se empleó como control positivo el tratamiento con H_2O_2 400 μM .

De los resultados presentados en la figura 41, el aumento significativo en los niveles de EROs (H_2O_2 , OH^\bullet) de las células Hep-G2 tratadas con **FM49** y **FM52** respecto al control ($p < 0,001$), puede deberse a una sobreproducción de EROs y/o a una disminución de la actividad antioxidante de estas células cancerígenas (Reczek & Chandel, 2017). Lo cual sugiere que el efecto citotóxico de estos híbridos de tetrahidroquinolina-isoxazol estaría relacionado con estrés oxidativo excesivo (Kung *et al.*, 2014), que sería el responsable de la inducción de muerte en células Hep-G2, tal como lo indican los resultados de viabilidad y morfología celular obtenidos.

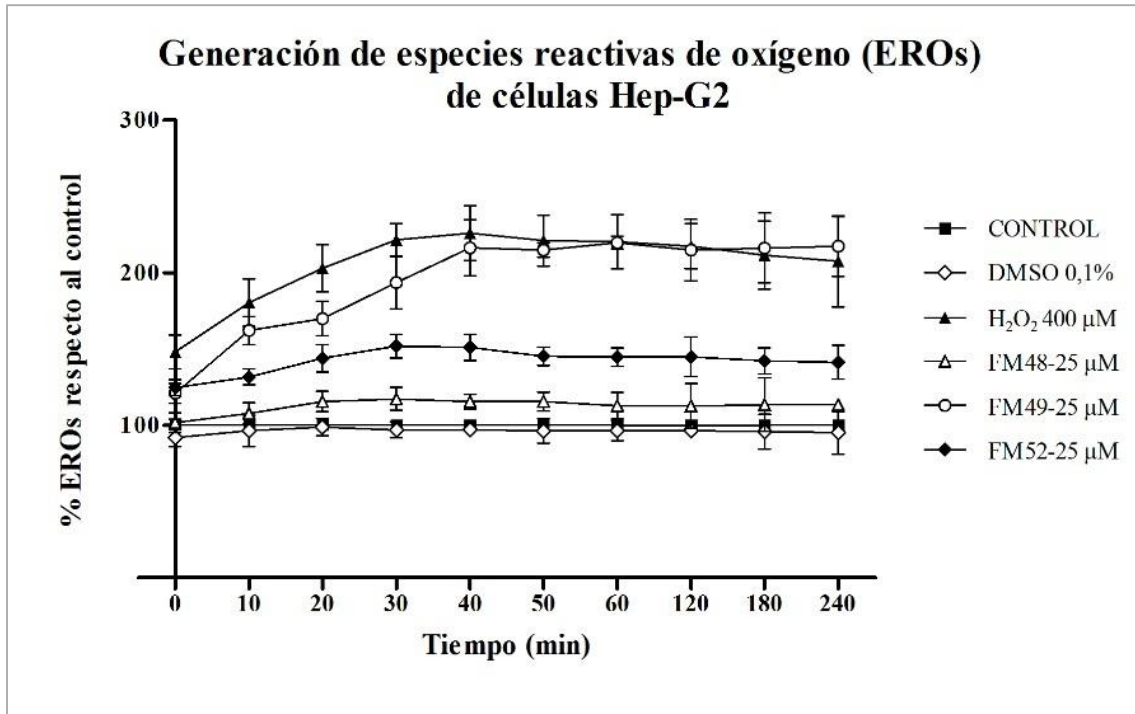


Figura 41. Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) de células Hep-G2 tratadas con los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52** a la concentración de 25 μM , usando H_2O_2 (400 μM) como control positivo. Las lecturas de fluorescencia se hicieron en los periodos de tiempo indicados. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de fluorescencia respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Por otra parte, teniendo en cuenta que las células cancerígenas como Hep-G2 son potencialmente más vulnerables a la muerte celular inducida por estrés oxidativo respecto a las células normales, debido a sus altos niveles de EROs (Anderson *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2011; Gorrini *et al.*, 2013; Reczek & Chandel, 2017), estos resultados explicarían por qué las células Hep-G2 presentaron una disminución significativa de su viabilidad, respecto a los hepatocitos, cuando fueron tratadas con los compuestos **FM49** y **FM52** (figura 38). No obstante, la disminución en la viabilidad de células Hep-G2 en presencia de **FM48** (figura 38) no podría sustentarse por un incremento en la tasa de producción de EROs, ya que no se encontraron diferencias significativas respecto al control como consecuencia de este tratamiento (figura 41).

Finalmente, es importante resaltar el papel que juegan los sustituyentes sobre el efecto de los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol, ya que al sustituir el grupo $-CH_3$ en **FM49** y $-H$ en **FM52**, por un grupo electroatrayente como el $-Cl$ en la estructura de la tetrahydroquinolina (**FM48**) la generación de EROs en células Hep-G2 se comporta igual que el control.

4.2 Evaluación de la actividad de los compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre la función bioenergética mitocondrial

Considerando que las mitocondrias cumplen un papel fundamental en el metabolismo celular al mantener el equilibrio energético necesario para el funcionamiento de la célula, orientando la señalización *redox* desde la cadena respiratoria y facilitando las respuestas al estrés celular, incluyendo la activación de muerte celular (Zong *et al.*, 2016); se procedió a estudiar si la actividad citotóxica de los híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol podría estar asociada con alteraciones en la bioenergética mitocondrial. Para esto, se evaluó la acción de los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52** sobre la velocidad de consumo de oxígeno y la actividad enzimática en la cadena respiratoria de mitocondrias aisladas de hígado de rata Wistar macho, obteniendo los resultados que se presentan a continuación.

4.2.1 Consumo de oxígeno

De acuerdo con los datos que se presentan en las figuras 42-A y 42-B, los compuestos **FM49** y **FM52** provocaron un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno a través del complejo I, tanto en el estado 3 (~15%) (figura 42-A), como en el estado 4 (~40%) (figura 42-B). Mientras que el compuesto **FM48** (25 μ M) inhibió la respiración en el estado 3 del complejo I (~20%) (figura 43-A) sin afectar el estado 4 (figura 42-B). Estos resultados indican que **FM49** y **FM52** inducen un aumento de la respiración vía complejo I en presencia y ausencia de ADP.

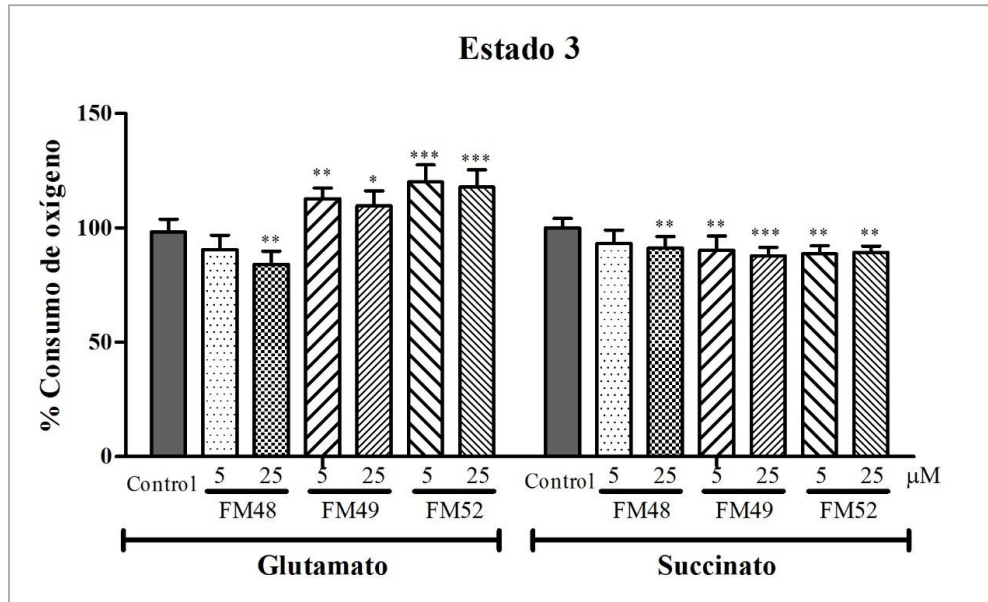


Figura 42-A. Consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3) vía complejo I (sustrato glutamato) y vía complejo II (sustrato succinato) bajo la acción de **FM48**, **FM49** y **FM52**. El valor del 100% corresponde a: $61,9 \pm 5,7$ nmoles O/min•mg proteína con glutamato y $76,9 \pm 6,5$ nmoles O/min•mg proteína con succinato. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

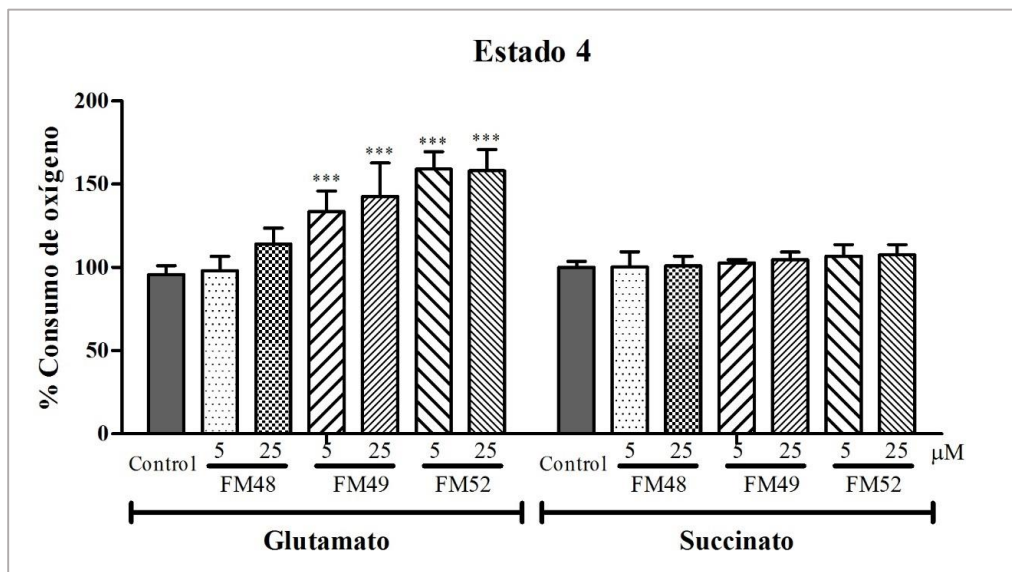


Figura 42-B. Consumo de oxígeno en ausencia de ADP (estado 4), vía complejo I (sustrato glutamato) y vía complejo II (sustrato succinato) bajo la acción de **FM48**, **FM49** y **FM52**. El valor del 100% corresponde a: $11,7 \pm 2,4$ nmoles O/min•mg proteína con glutamato y $20,8 \pm 3,4$ nmoles O/min•mg proteína con succinato. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de consumo de oxígeno respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. *** $p < 0,001$.

Por otra parte, los tres compuestos causaron una disminución en la velocidad del consumo de oxígeno (~10%) en el estado 3 vía complejo II (figura 42-A); que en el caso de **FM49** y **FM52**, podría ser una respuesta de la mitocondria para equilibrar el aumento de consumo de oxígeno vía complejo I en presencia de ADP.

Adicionalmente, se evaluó la integridad de las mitocondrias mediante el coeficiente de control respiratorio (CCR) (razón estado 3/estado 4), donde el comportamiento del consumo de oxígeno vía complejo I y complejo II se reflejó en una disminución (~20%) en los porcentajes de CCR (figura 43) como consecuencia del tratamiento con **FM48**, **FM49** y **FM52**.

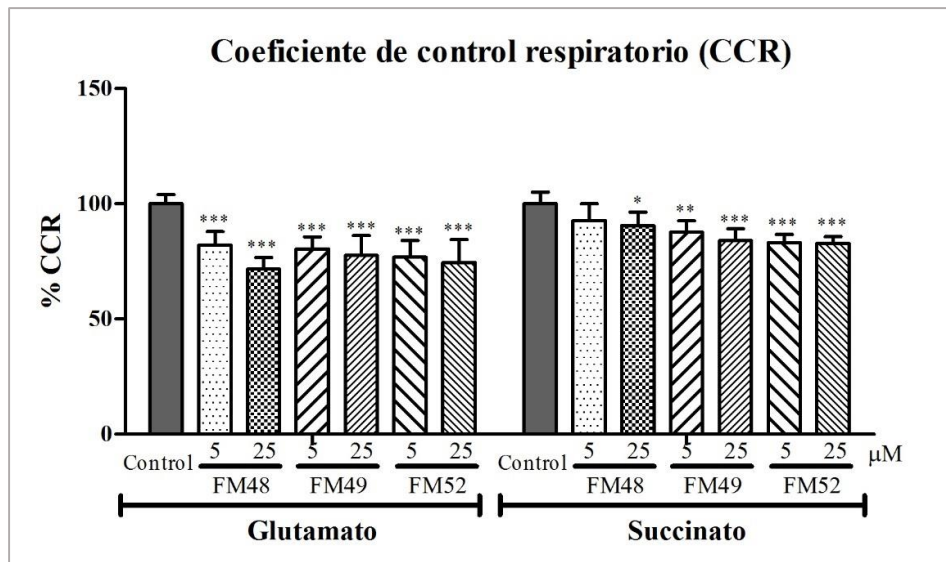


Figura 43. Coeficiente de control respiratorio vía complejo I (sustrato glutamato) y vía complejo II (sustrato succinato) bajo la acción de FM48, FM49 y FM52. El 100% corresponde a un valor de CCR igual a $5,5 \pm 1,4$ con glutamato y $4,0 \pm 0,6$ con succinato. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de CCR respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Teniendo en cuenta que se conocen la cantidad de ADP adicionada en los ensayos de respiración y la concentración de oxígeno consumida en el estado 3, se determinó la relación ADP/O de las mitocondrias tratadas con **FM48**, **FM49** y **FM52** (tabla 4).

Ya que el escape de protones es extremadamente reducido en el estado 3, casi todo el oxígeno que se consume durante este proceso es usado efectivamente para la síntesis de ATP, por lo que la tasa ADP/O puede usarse como un indicio de las moles de ATP sintetizado por mol de oxígeno atómico (Hinkle, 2005; Nicholls & Ferguson, 2013).

Por lo tanto, los resultados obtenidos a cerca de la relación ADP/O, sugieren que no hubo alteraciones en la tasa de producción de ATP a través del complejo II; mientras que, vía complejo I se evidenció una leve disminución en la síntesis de ATP cuando se realizó tratamiento con el compuesto **FM52** (tabla 4).

Tabla 4. Relación ADP/O vía complejo I y complejo II bajo la acción de **FM48**, **FM49** y **FM52**.
*p<0,05; **p<0,01.

Tratamiento	Complejo I Sustrato glutamato	Complejo II Sustrato succinato
CONTROL	3,7±0,3	2,3±0,2
FM48 5 µM	3,3±0,4	2,1±0,2
FM48 25 µM	3,3±0,3	2,1±0,2
FM49 5 µM	3,4±0,2	2,2±0,2
FM49 25 µM	3,4±0,2	2,2±0,2
FM52 5 µM	3,2±0,1*	2,2±0,2
FM52 25 µM	3,1±0,3**	2,1±0,2

Finalmente, estos resultados proponen que los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52** alteran el consumo de oxígeno y ocasionan pérdida de la integridad de mitocondrias aisladas. Los híbridos

FM49 y **FM52** obligan a las mitocondrias a incrementar su respiración vía complejo I, y ejercen un efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial a través del complejo II. Por su parte, el compuesto **FM48** inhibe la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3) vía complejo I y complejo II.

4.2.2 Actividad enzimática mitocondrial

Para determinar si las alteraciones sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias tratadas con los derivados de tetrahydroquinalina-isoxazol podrían darse como consecuencia de cambios en la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria, se evaluó la acción de **FM48**, **FM49** y **FM52** (25 μ M) sobre estas enzimas en mitocondrias fragmentadas.

Usando NADH como sustrato para estudiar la actividad del complejo I, en presencia de **FM49** y **FM52**, se observó una disminución en la actividad NADH oxidasa (~20%) y NADH citocromo *c* reductasa (~40%), en contraste con un incremento de ~25% en la función NADH deshidrogenasa (figura 44).

Estos resultados sugieren que los compuestos **FM49** y **FM52** inhiben la transferencia de electrones desde el complejo I hacia el complejo III, y la mitocondria intenta compensar este efecto aumentando la actividad del complejo I; lo cual promueve una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), tal como se observó en la figura 41. Por lo tanto, se podría proponer que la disminución de la actividad del complejo IV (NADH oxidasa), es un reflejo de las alteraciones que están ocurriendo entre los complejos I y III.

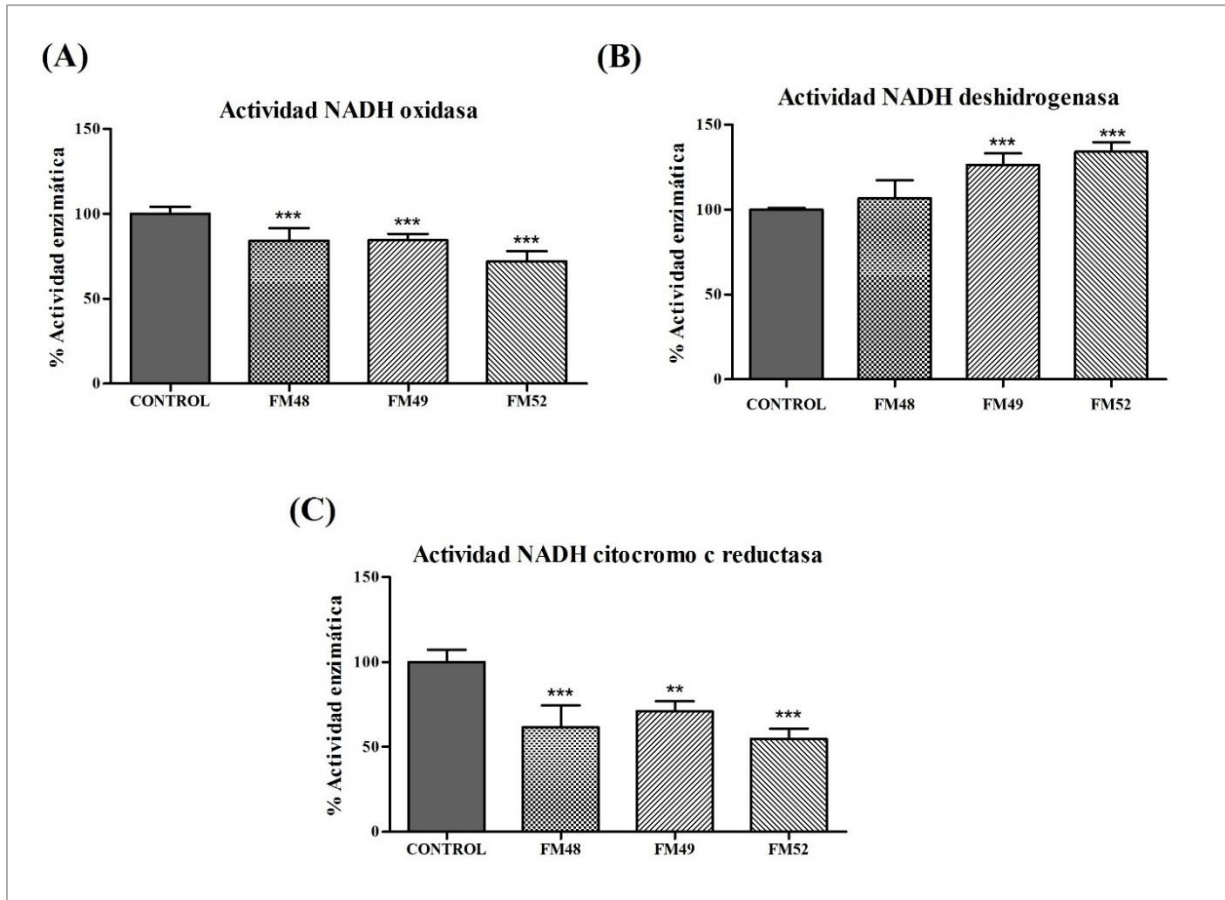


Figura 44. Determinación de la actividad enzimática de (A) NADH oxidasa, (B) NADH deshidrogenasa y (C) NADH citocromo *c* reductasa en presencia de **FM48**, **FM49** y **FM52** (25 μ M). El valor del 100% corresponde a (A) $21,5 \pm 7,6$ nmoles O/min \cdot mg proteína, (B) $0,309 \pm 0,004$ μ moles/min \cdot mg proteína de ferricianuro de potasio reducido y (C) $0,16 \pm 0,01$ μ moles/min \cdot mg proteína de citocromo *c* reducido. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de actividad respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Adicionalmente, la figura 44 revela que el compuesto **FM48** causa una disminución de la actividad NADH oxidasa (~20%) y NADH citocromo *c* reductasa (~40%), indicando su efecto inhibitorio sobre el complejo III.

Ahora, bloqueando el complejo I y adicionando succinato como sustrato para el complejo II, se encontró que la actividad de las enzimas succinato oxidasa y succinato citocromo *c* reductasa no se vio afectada por la presencia de los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol (figura 45).

En presencia de **FM49** y **FM52** hubo una disminución de ~20% en la actividad succinato deshidrogenasa (figura 45). Lo que permite plantear que estos tratamientos provocan una inhibición en la función del complejo II, pero no afectan la actividad del complejo III ni el transporte de electrones desde el complejo II al complejo IV. Lo cual es un comportamiento contrario al que se obtiene usando NADH como sustrato.

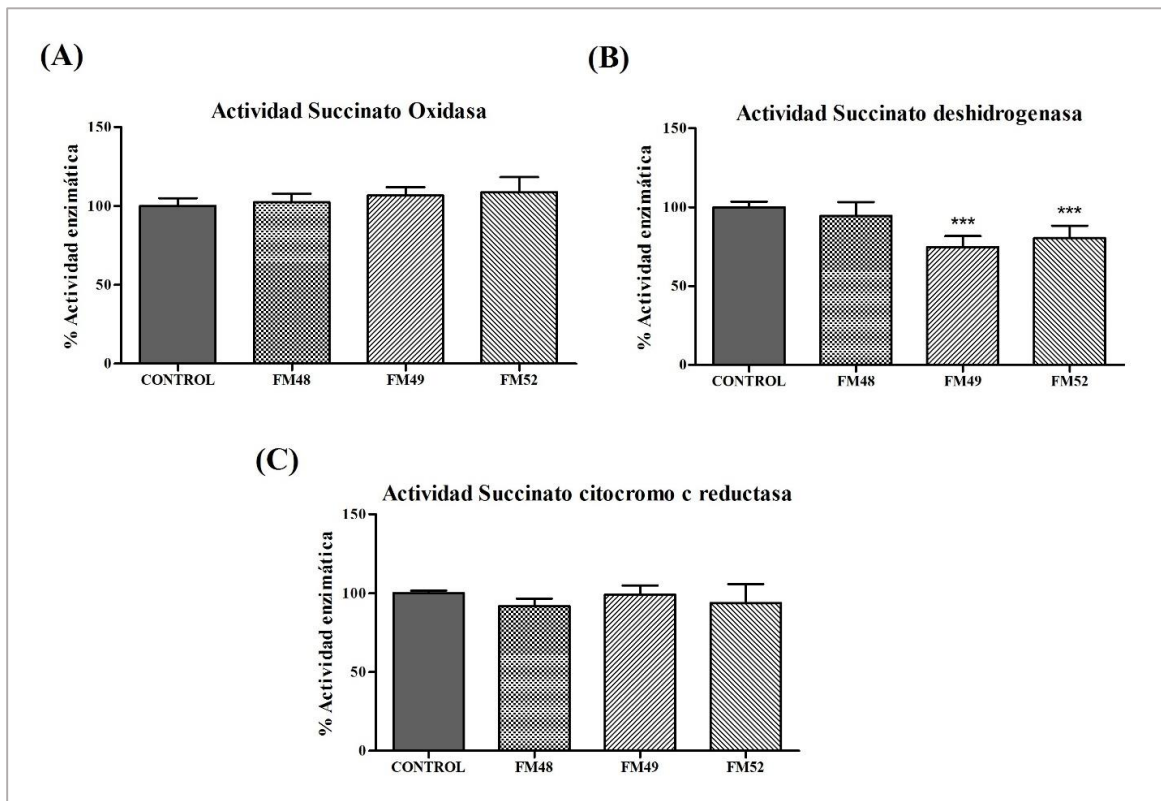


Figura 45. Determinación de la actividad enzimática de (A) succinato oxidasa, (B) succinato deshidrogenasa y (C) succinato citocromo *c* reductasa en presencia de **FM48**, **FM49** y **FM52** (25 μ M). El valor del 100% corresponde a (A) $7,6 \pm 0,8$ nmoles O/min•mg proteína, (B) $0,028 \pm 0,006$ pmoles/min•mg proteína de DCPIP reducido y (C) $19,9 \pm 0,74$ nmoles/min•mg proteína de citocromo *c* reducido. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de actividad respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado. *** $p < 0,001$.

Continuando con el estudio de las enzimas de la cadena respiratoria, no se encontraron diferencias significativas en la actividad citocromo *c* oxidasa, en función de su capacidad para oxidar el citocromo *c* al adicionar **FM48**, **FM49** y **FM52** (figura 46). Lo cual plantea que estos derivados no están interrumpiendo la transferencia de electrones del citocromo *c* al complejo IV.

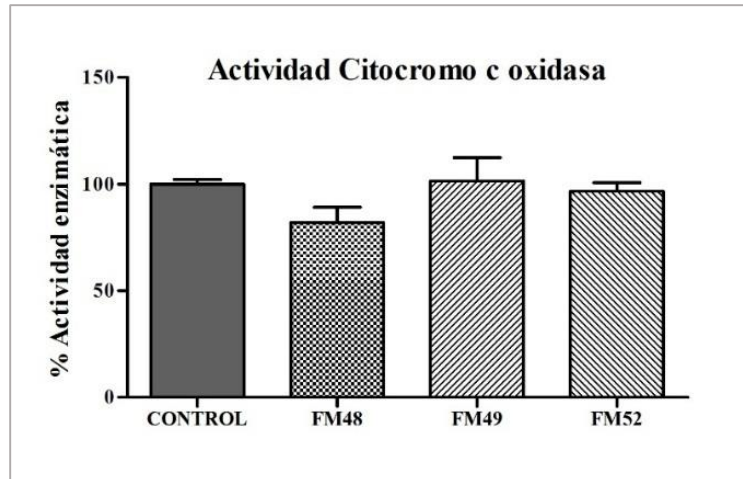


Figura 46. Determinación de la actividad enzimática de la citocromo *c* oxidasa en presencia de **FM48**, **FM49** y **FM52** (25 μ M). El valor del 100% corresponde a $8,7 \pm 1,7$ nmoles/min•mg proteína de citocromo *c* oxidado. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de actividad respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Tampoco se evidenciaron cambios en la actividad ATPasa de mitocondrias fragmentadas con los tratamientos **FM48**, **FM49** y **FM52**, al evaluar su capacidad para hidrolizar el ATP (figura 47). Lo cual sugiere que estos compuestos no afectan el flujo normal de protones a través del complejo V, conservando la actividad ATPasa.

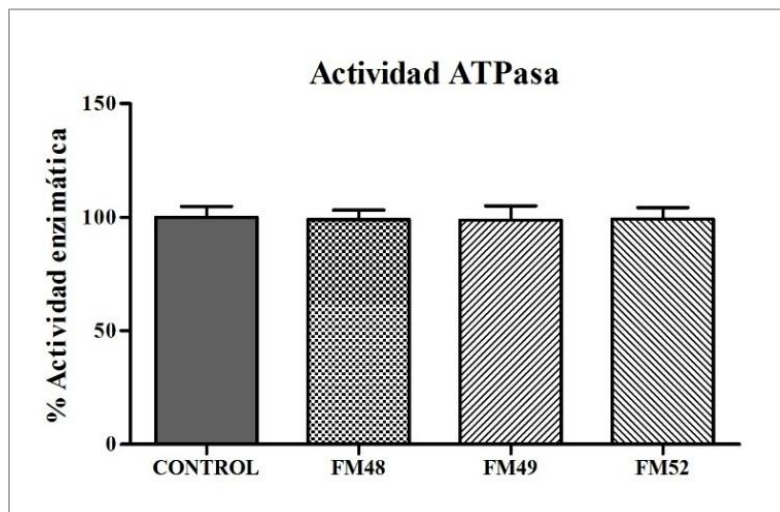


Figura 47. Determinación de la actividad ATPasa de mitocondrias fragmentadas en presencia de **FM48**, **FM49** y **FM52** (25 μ M). El valor del 100% corresponde a $0,030 \pm 0,001$ μ moles/min•mg de proteína de fosfato hidrolizado. Los resultados están representados por la media \pm DE del porcentaje de actividad respecto al control de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

En conjunto, los resultados de bioenergética mitocondrial indican que los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol, **FM48**, **FM49** y **FM52** alteran el consumo de oxígeno en respuesta a cambios en su actividad enzimática.

Para el caso de **FM49** y **FM52**, la pérdida de la función NADH oxidasa, por la cual se transfieren los electrones desde el complejo I hasta el complejo IV para la reducción del O₂, está asociada a la disminución de la actividad NADH citocromo *c* reductasa que evidencia un menor transporte de electrones desde el complejo I hacia el complejo III. Sin embargo, en ausencia de un efecto inhibitorio sobre la succinato citocromo *c* reductasa, se consideraría que los compuestos **FM49** y **FM52** no actúan inhibiendo directamente el complejo III, sino que alteran el proceso de transferencia electrónica en un punto desconocido entre los complejos I y III de la cadena respiratoria.

Los compuestos **FM49** y **FM52**, también están relacionados con un descenso de la actividad succinato deshidrogenasa y un aumento de la actividad NADH deshidrogenasa que refleja un incremento en la oxidación del NADH y, por ende, en la disponibilidad de electrones para el complejo I. Teniendo en cuenta que este complejo enzimático es una de las principales fuentes de superóxido y peróxido de hidrógeno en la mitocondria por fuga de electrones o *electron leak* (Bleier & Dröse, 2013; Holmström & Finkel, 2014; Quinlan *et al.*, 2013); podría plantearse que el incremento en la actividad del complejo I está vinculado a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs). De esta forma, se podría sustentar la generación excesiva de EROs (H₂O₂, OH•) en células Hep-G2 tratadas con **FM49** y **FM52** (figura 41), lo cual coincidiría con lo reportado en la literatura donde se manifiesta que la oxidación de los sustratos del complejo I, cuando hay inhibición del complejo III, aumenta la generación de EROs (Chen *et al.*, 2003).

Adicionalmente, se han publicado resultados similares con drogas anticancerígenas, como es el caso de Bezielle (BZL101, FDA IND #59.521), candidato a droga oral que se encuentra en pruebas de fase clínica para el cáncer de mama avanzado, y que presenta actividad antitumoral en modelos de hepatocarcinoma, entre otros (Chen *et al.*, 2012). Bezielle induce altos niveles de EROs mitocondrial en células tumorales, causando daño extensivo del ADN y ocasionando la hiperactivación de la proteína poli-ADP ribosa (*PARP-1*); mientras que en células normales se atenúa la generación de EROs y el daño sobre el ADN, sin involucrar hiperactivación de *PARP-1* (Chen *et al.*, 2012). En células tumorales, el agotamiento del NAD^+ y el ATP como consecuencia de la hiperactivación de *PARP-1* promueve la inhibición de la glucólisis y la fosforilación oxidativa conduciendo a un colapso energético que desencadena la muerte celular (Berghe *et al.*, 2014; Chen & Zhang, 2016; Chen *et al.*, 2012; Hanson, 2016). Por lo tanto, es posible que el mecanismo de acción por el cual los derivados **FM49** y **FM52** inducen muerte celular en células Hep-G2, esté relacionado con un aumento en los niveles de EROs y la hiperactivación de *PARP*.

Por su parte, aunque el compuesto **FM48** altera el paso de electrones desde el complejo I hacia el complejo III, no se presentó alteración significativa de la actividad del complejo I, lo cual podría explicar la baja producción de EROs (H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$) de las células Hep-G2 (sin diferencias respecto al control) (figura 41), en comparación con los otros tratamientos. Además, estos resultados sugieren que el efecto de los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre el complejo I es dependiente del sustituyente en la estructura de la tetrahydroquinolina, puesto que la sobreactivación de la NADH deshidrogenasa se pierde en presencia del compuesto **FM48** sustituido con un grupo electroatrayente, -Cl.

5. Conclusiones

- Los híbridos de tiazolidina-dicetopiperazina que contienen el grupo nitrofenil en la estructura del tiazol (**JK109**, **JK112** y **JK113**) presentaron mayor actividad citotóxica sobre células de melanoma B16F10. Sin embargo, al contar con el sustituyente clorobencil en la estructura de la dicetopiperazina (**JK112**), también disminuyó la viabilidad de las células A549, HeLa, Hep-G2 y Vero.

- Los híbridos de tiazolidina-dicetopiperazina que presentaron actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cáncer estudiadas, tuvieron bajo índice de selectividad, respecto a las células normales Vero, y baja solubilidad en el medio de cultivo celular.

- Las moléculas de tetrahydroquinolina-isoxazol **FM48**, **FM49** y **FM52** mostraron una toxicidad significativa sobre células Hep-G2 con respecto a otras líneas celulares de cáncer evaluadas, sin que se evidenciaran problemas de solubilidad a las concentraciones testeadas. También presentaron un mayor índice de selectividad para disminuir la viabilidad de Hep-G2 en comparación con la droga oxaliplatino, al considerar Vero como control de células normales.

- El sustituyente $-CH_3$ en **FM49** conllevó al aumento de la selectividad y la citotoxicidad del andamio tetrahydroquinolina-isoxazol sobre las células Hep-G2; mientras que, la sustitución por $-Cl$ en **FM48** y por $-H$ en **FM52** disminuyó la selectividad y condujo a un incremento de la concentración CC_{50} para inducir el mismo efecto citotóxico obtenido con **FM49** sobre Hep-G2.

- La viabilidad de las células Hep-G2 tratadas con los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol fue dependiente de la concentración. Siendo el tiempo del tratamiento un factor adicional que influyó en la citotoxicidad de **FM49** y **FM52**.

- Los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52** demostraron tener una actividad citotóxica diferencial entre las células Hep-G2 y los hepatocitos, ya que no afectaron la viabilidad de estos últimos luego de 24 horas de tratamiento.

- Los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol indujeron cambios morfológicos relacionados con apoptosis y mecanismos de muerte celular no apoptóticos, que podrían representar una alternativa para el tratamiento del hepatocarcinoma celular, considerando que uno de los principales problemas para el tratamiento de esta enfermedad es su resistencia a la apoptosis.

- Los híbridos **FM49** y **FM52** incentivaron un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células Hep-G2, que sería responsable de la disminución de la viabilidad y la inducción de muerte celular. No obstante, la sustitución con un grupo electroatrayente como el -Cl en la estructura de la tetrahydroquinolina (**FM48**), no provocó diferencias significativas en la generación de EROs respecto al control.

- El compuesto **FM48** ocasiona una disminución de la actividad de la NADH oxidasa y la NADH citocromo *c* reductasa, lo que podría sugerir una inhibición del complejo III. Sin embargo, al no evidenciarse este mismo efecto sobre la succinato citocromo *c* reductasa, se concluye que la inhibición no se está dando directamente en el complejo III, sino que constituye una respuesta a una alteración que está ocurriendo en algún punto entre el paso de electrones desde el complejo I hacia el complejo III. También es posible que este comportamiento esté relacionado con la presencia del grupo electroatrayente -Cl en la estructura de la tetrahydroquinolina.

- Los compuestos **FM49** y **FM52** provocan la disminución de la actividad NADH oxidasa y la NADH citocromo *c* reductasa, inhibiendo la transferencia electrónica desde el complejo I hacia el complejo III; lo cual va acompañado por una sobreactivación de la actividad NADH

deshidrogenasa. Este comportamiento conduce al aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs), que la mitocondria intenta contrarrestar inhibiendo el complejo II a través de la succinato deshidrogenasa, para así disminuir la generación de radicales libres.

6. Recomendaciones

- Implementar biomarcadores específicos de apoptosis (p. ej. caspasas 3, 8 y 9, proteínas Bcl-2) y necroptosis (p. ej. RIP1, RIP3, MLKL) que permitan determinar el mecanismo de muerte celular inducido por los derivados de tetrahydroquinolina-isoxazol **FM48**, **FM49** y **FM52**.

- Evaluar la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células hepáticas normales tratadas con los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52**, de manera que se pueda comparar con los resultados obtenidos sobre células de hepatocarcinoma Hep-G2 y poder determinar si la sobreproducción de EROs está relacionada con la citotoxicidad selectiva.

- Estudiar la acción de los compuestos **FM48**, **FM49** y **FM52** sobre el consumo de oxígeno y la actividad enzimática de la cadena respiratoria en células Hep-G2, para contrastar con el comportamiento observado en mitocondrias aisladas de células hepáticas normales.

- Realizar estudios de acoplamiento molecular que permitan predecir las posibles interacciones de las moléculas **FM49** y **FM52** con los complejos enzimáticos I y III, teniendo en cuenta que la acción de estos compuestos podría estar relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno en dichos puntos de la cadena respiratoria.

7. Divulgación de resultados

- Trabajo “*Toxic Effects of New Thiazolidine-Diketopiperazine Hybrid Molecules on Cancer Cells*” presentado en la *45th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology-SBBq* que se realizó del 18 al 21 de junio de 2016 en Natal, Brasil.

- Trabajo “*Acción de compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol sobre la bioenergética de mitocondrias aisladas de hígado de rata*” presentado en el *Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular-C2B2* realizado del 3 al 5 de noviembre de 2016 en Medellín, Colombia.

Referencias

- Abou-Alfa, G. K. (2006). Hepatocellular Carcinoma: Molecular Biology and Therapy. *Seminars in Oncology*, 33(SUPPL. 11), 79–83. <http://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2006.10.015>
- Afzal, O., Kumar, S., Haider, R., Ali, R., Kumar, R., Jaggi, M., & Bawa, S. (2014). A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.044>
- Ahmed, N. S., Alfooty, K. O., & Khalifah, S. S. (2014). An Efficient Sonochemical Synthesis of Novel Schiff ' s Bases, Thiazolidine, and Pyrazolidine Incorporating 1, 8-Naphthyridine Moiety and Their Cytotoxic Activity against Hep-G2 Cell Lines, 2014.
- Aki, T., Nara, A., & Uemura, K. (2012). Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biology and Toxicology*, 28, 125–131. <http://doi.org/10.1007/s10565-012-9212-3>
- Alam, M., Lal, S., Fitzgerald, K. E., & Zhang, L. (2016). A holistic view of cancer bioenergetics: mitochondrial function and respiration play fundamental roles in the development and progression of diverse tumors. *Clinical and Translational Medicine*, 5(3), 2–14. <http://doi.org/10.1186/s40169-016-0082-9>
- Alegaon, S. G., & Alagawadi, K. R. (2012). New thiazolidinedione-5-acetic acid amide derivatives: synthesis, characterization and investigation of antimicrobial and cytotoxic properties. *Med Chem Res*, 21, 816–824. <http://doi.org/10.1007/s00044-011-9598-0>
- Alves, R., Teixeira Gomes, M., Sampaio Macedo, C., Miranda, H. P., & Nery, F. (2015). Hepatocellular carcinoma treatment strategies – a case-based review. *Journal of Solid Tumors*, 5(2), 120–136. <http://doi.org/10.5430/jst.v5n2p120>
- Anderson, A., Bowman, A., Boulton, S. J., Manning, P., & Birch-Machin, M. A. (2014). A role for human mitochondrial complex II in the production of reactive oxygen species in human skin. *Redox Biology*, 2, 1016–1022. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2014.08.005>
- Appleby, C. A., & Morton, R. K. (1959). Lactic dehydrogenase and cytochrome b2 of baker's

yeast. Purification and crystallization. *Biochemical Journal*, 71(3), 492–499.

Arif, M. I., Samin, G., van Leeuwen, J. G. E., Oppentocht, J., & Janssen, D. B. (2012). Novel dehalogenase mechanism for 2,3-Dichloro-1-propanol utilization in *Pseudomonas putida* strain MC4. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6128–6136. <http://doi.org/10.1128/AEM.00760-12>

Asati, V., Mahapatra, D. K., & Bharti, S. K. (2014). Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 814–833. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.025>

Ashkenazi, A. (2008). Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(12), 1001–1012. <http://doi.org/10.1038/nrd2637>

ATCC. (2016). Hep G2.

Atkinson, S. J., Soden, P. E., Angell, D. C., Chung, C., Giblin, K. A., Smithers, N., ... Prinjha, R. K. (2014). The structure based design of dual HDAC/BET inhibitors as novel epigenetic probes. *Med. Chem. Commun.*, 5, 342–351. <http://doi.org/10.1039/c3md00285c>

Avecilla, F., Bin, Z., Jahan, M., Khan, S., Rizvi, M. M. A., Shahid, M., ... Verma, S. (2017). Synthesis, stereochemistry determination, pharmacological studies and quantum chemical analyses of bisthiazolidinone derivative. *Journal of Molecular Structure*, 1127, 99–113. <http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.07.089>

Berghe, T. Vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(2), 135–47. <http://doi.org/10.1038/nrm3737>

Berridge, M. J. (2014). Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death. *Cell Signalling Biology*, 11.1-11.30. <http://doi.org/10.1042/csb0001011>

Bleier, L., & Dröse, S. (2013). Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1827, 1320–1331. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.002>

- Bloomfield, G., & Kay, R. R. (2016). Uses and abuses of macropinocytosis. *Journal of Cell Science*, 0, 1–9. <http://doi.org/10.1242/jcs.176149>
- Boelsterli, U. A., & Lim, P. L. K. (2007). Mitochondrial abnormalities-A link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220, 92–107. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.013>
- 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>
- Bueno Duarte, Y. (2016). *Evaluación de la actividad citotóxica de compuestos orgánicos híbridos de tetrahydroquinolinas e isoxazoles en líneas tumorales y su mecanismo de acción.*
- Cala Gómez, L. J. (2015). *Síntesis de nuevos derivados de las 3-aril-tiazolo[3,4-a]pirazin-5,8-dionas, compuestos con potencial actividad antibiótica.*
- Cao, H., Phan, H., & Yang, L. X. (2012). Improved chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, 32(4), 1379–1386.
- Cardoso, H., Margarida, A., Marques, M., Maria, A., Pereira, P., & Macedo, G. (2016). Hepatocellular Carcinoma Treatment With Sorafenib : Real-Life Evaluation of Prognostic Factors and a Practical Clue for Patient Management. *GE Jornal Português de Gastrenterologia*, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jpge.2016.04.006>
- Cariou, B., Charbonnel, B., & Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: Time for a reassessment. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(5), 205–215. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.001>
- Carr, B. I. (2014). *Understanding Liver Cancer : A Tale of Two Diseases.*
- Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Łos, 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>

- Chen, D., & Zhang, L. (2016). Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1865, 238–236. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003>
- Chen, P. S., Toribara, T. Y., & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus in proteins. *Analytical Chemistry*, 28(11), 288–291. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90371-X](http://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90371-X)
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027–36031. <http://doi.org/10.1074/jbc.M304854200>
- Chen, V., Staub, R. E., Fong, S., Tagliaferri, M., Cohen, I., & Shtivelman, E. (2012). Bezielle selectively targets mitochondria of cancer cells to inhibit glycolysis and OXPHOS. *PLoS ONE*, 7(2), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030300>
- Chouaïb, K., Romdhane, A., Delemasure, S., Dutartre, P., Elie, N., Touboul, D., ... Ali, M. (2016). Regiospecific synthesis , anti-inflammatory and anticancer evaluation of novel 3,5-disubstituted isoxazoles from the natural maslinic and oleanolic acids. *Industrial Crops & Products*, 85, 287–299. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.024>
- Costantini, S., Bernardo, G. Di, Cammarota, M., Castello, G., & Colonna, G. (2013). Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*, 518(2), 335–345. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.106>
- DeVorkin, L., Choutka, C., & Gorski, S. M. (2014). The Interplay between Autophagy and Apoptosis. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, 3, 369–383. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-405529-2.00024-X>
- Drug Bank. (2016). <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Dunham, M., & Christianson, C. Chen's Phosphate Assay Modified (2005).
- Edeline, J., Raoul, J. L., Vauleon, E., Guillygomac'h, A., Boudjema, K., & Boucher, E. (2009). Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A retrospective study. *World Journal of Gastroenterology*, 15(6), 713–716.

<http://doi.org/10.3748/wjg.15.713>

Essmann, F., Bantel, H., Totzke, G., Engels, I. H., Sinha, B., Schulze-Osthoff, K., & Jänicke, R. U. (2003). Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death and Differentiation*, *10*, 1260–1272. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401301>

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*, 133–143. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.006>

Fan, J., Ye, J., Kamphorst, J. J., Shlomi, T., Thompson, C. B., Rabinowitz, J. D., & Kettinger, S. (2014). Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature*, *510*(7504), 298–302. <http://doi.org/10.1038/nature13236>. Quantitative

Feinstein, D. L., Spagnolo, a., Akar, C., Weinberg, G., Murphy, P., Gavriilyuk, V., & Dello Russo, C. (2005). Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochemical Pharmacology*, *70*(2), 177–188. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.03.033>

Frantz, M.-C., & Wipf, P. (2010). Mitochondria as a target in treatment. *Environ Mol Mutagen*, *51*(5), 462–475. <http://doi.org/10.1002/em.20554>. Mitochondria

Frezza, C., Cipolat, S., & Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. In *Nature Protocols* (Vol. 2, pp. 287–295). <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.478>

Furuta, S., Miyazawa, S., & Hashimoto, T. (1981). Purification and Properties of Rat Liver Acyl-CoA Dehydrogenases and Electron Transfer Flavoprotein. *J. Biochem.*, *90*, 1739–1750. Retrieved from <http://www.jbc.org.myaccess.library.utoronto.ca/content/242/14/3360>

Gao, W., Xu, K., Li, P., & Tang, B. (2011). Functional roles of superoxide and hydrogen peroxide generated by mitochondrial DNA mutation in regulating tumorigenicity of HepG2 cells. *Cell Biochemistry and Function*, *29*, 400–407.

- 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*, 4211–4217. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.017>
- GLOBOCAN. (2012). *IARC, 2012*. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *65*, 45–80. <http://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
- Goncalves, R. L. S., Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V, Hey-mogensen, M., & Brand, M. D. (2015). Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Muscle Mitochondria Assessed ex Vivo under Conditions Mimicking Rest and Exercise. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(1), 209–227. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.619072>
- Goodman, S. R. (2008). *Medical Cell Biology*. (S. R. Goodman, Ed.) (Third Edit). Academic Press.
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*, 931–947. <http://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Graham, J. (1999). Isolation of Mitochondria from Tissues and Cells by Differential Centrifugation. In *Current Protocols in Cell Biology* (p. 3.3.1-3.3.15).
- Grandhi, M. S., Kim, A. K., Ronnekleiv-kelly, S. M., Kamel, I. R., Ghasebeh, M. A., & Pawlik, T. M. (2016). Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment United Network of Organ Sharing. *Surgical Oncology*, *25*, 74–85. <http://doi.org/10.1016/j.suronc.2016.03.002>
- Gududuru, V., Hurh, E., Sullivan, J., Dalton, J. T., & Miller, D. D. (2005). SAR studies of 2-arylthiazolidine-4-carboxylic acid amides: A novel class of cytotoxic agents for prostate cancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *15*(18), 4010–4013. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.06.032>
- Guicciardi, M. E., Malhi, H., Mott, J. L., & Gores, G. J. (2013). Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Compr Physiol.*, *3*(2), 3–61. <http://doi.org/10.1002/cphy.c120020>.Apoptosis

- Hanson, B. (2016). Necroptosis: A New Way of Dying? *Cancer Biology and Therapy*.
<http://doi.org/10.1080/15384047.2016.1210732>
- Hassinen, I. E. (2014). Mitochondria and Energy Metabolism: Networks, Mechanisms, and Control. In *Natural Biomarkers for Cellular metabolism* (pp. 1–40).
- Hinkle, P. C. (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta, 1706*, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.004>
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15*, 411–421.
<http://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Instituto Nacional de Cancerología, C. (2015). Cáncer en cifras.
<http://www.cancer.gov.co/content/estadisticas>.
- Jaramillo, M. L., & Tibiche, C. (1976). Cancer Genomics to Cancer Biology, (Nowell), 215–232.
- Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M. I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C. ., Moigne-Muller, G. Le, Van Herreweghe, F., ... Although. (2012). TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death and Differentiation, 19*, 2003–2014. <http://doi.org/10.1038/cdd.2012.90>
- Kamalian, L., Chadwick, A. E., Bayliss, M., French, N. S., Monshouwer, M., Snoeys, J., & Park, B. K. (2015). The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicology in Vitro, 29*, 732–740.
<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.011>
- Kumar, R., Patel, S. K., Reddy, B. V. R., Bhatt, M., & Karthik, K. (2015). Apoptosis and Other Alternate Mechanisms of Cell Death. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 10*(10), 646–668. <http://doi.org/10.3923/ajava.2015.646.668>
- Kung, M. L., Hsieh, S. L., Wu, C. C., Chu, T. H., Lin, Y. C., Yeh, B. W., & Hsieh, S. (2014). Enhanced Reactive Oxygen Species Overexpression by CuO Nanoparticles in Poorly Differentiated Hepatocellular Carcinoma Cells. *Nanoscale*.

<http://doi.org/10.1039/C4NR05843G>

- Lam, K., Lee, K. K., Gambari, R., Wong, R. S., Cheng, G. Y., Tong, S., ... Chui, C. (2013). Preparation of Galipea officinalis Hancock type tetrahydroquinoline alkaloid analogues as anti-tumour agents. *Phytomedicine*, 20, 166–171. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.026>
- Li, W., Lu, Y., Wang, Z., Dalton, J. T., & Miller, D. D. (2007). Synthesis and antiproliferative activity of thiazolidine analogs for melanoma. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4113–4117. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.059>
- Liao, S.-R., Qin, X., Wang, Z., Li, D., Xu, L., Li, J., ... Liu, Y. (2016). Design, synthesis and cytotoxic activities of novel 2,5-diketopiperazine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.002>
- Liao, S., Qin, X., Li, D., Tu, Z., Li, J., Zhou, X., ... Liu, Y. (2014). Design and synthesis of novel soluble 2,5-diketopiperazine derivatives as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 236–244. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.030>
- Lim, J. P., & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology*, 89(8), 836–843. <http://doi.org/10.1038/icb.2011.20>
- Liu, Y., Lee, H.-Y., Chen, C.-H., Lee, C.-H., Wang, L.-T., Pan, S.-L., ... Liou, J.-P. (2014). 1-Arylsulfonyl-5-(N-hydroxyacrylamide)tetrahydroquinolines as Potent Histone Deacetylase Inhibitors Suppressing the Growth of Prostate Cancer Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.052>
- Maltese, W. A., & Overmeyer, J. H. (2014). Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *American Journal of Pathology*, 184(6), 1630–1642. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.028>
- Marin, J. J. G., Castaño, B., Martínez-becerra, P., Rosales, R., & Monte, J. (2008). Chemotherapy in the treatment of primary liver tumours. *Cancer Therapy*, 6, 711–728.

- Marín Güiza, F. A. (2014). *Síntesis y caracterización estructural de nuevos híbridos tetrahidroquinolina/isoxazol polisustituídos vía reacción imino Diels-Alder catiónica y cicloadición 1,3-dipolar.*
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(2), 81–94. <http://doi.org/10.1038/nrm3735>
- Martins, M. B., & Carvalho, I. (2007). Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, *63*(40), 9923–9932. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.105>
- Mason, T. L., Poyton, R., & Wharton, D. C. (1973). Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, *248*(4), 1346–1354.
- McQuade, T., Cho, Y., & Chan, F. K.-M. (2013). Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis. *The Biochemical Journal*, *456*, 409–15. <http://doi.org/10.1042/BJ20130860>
- Meng, M.-B., Wang, H.-H., Cui, Y.-L., Wu, Z.-Q., Shi, Y.-Y., Zaorsky, N. G., ... Wang, P. (2016). Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget, Advance Publications*, 1–23. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.10548>
- Milne, P. J., & Kilian, G. (2010). The Properties, Formation, and Biological Activity of 2,5-Diketopiperazines. *Comprehensive Natural Products {II}*, 657–698. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00716-4>
- Mohammadi-Farani, A., Foroumadi, A., Resvani Kashani, M., & Aliabadi, A. (2014). N-Phenyl-2-p-tolylthiazole-4-carboxamide derivatives: Synthesis and cytotoxicity evaluation as anticancer agents. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *17*, 502–508.
- Mollica, A., Costante, R., Fiorito, S., Genovese, S., Stefanucci, A., Mathieu, V., ... Epifano, F. (2014). Synthesis and anti-cancer activity of naturally occurring 2,5-diketopiperazines. *Fitoterapia*, *98*, 91–97. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.07.010>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to

- proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
[http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Murillo M, R. F., Piñeros P, M., Wiesner C, C., Rivera R, D. E., Bernal M, L. J., Aguilera L, J., ... Ruiz, I. C. (2012). *Plan decenal para el control de cáncer en Colombia 2012-2021. Ministerio de Salud y Protección Social, República de Colombia*. Retrieved from http://www.cancer.gov.co/documentos/Plandecenalparacontroldelcancer/PlanDecenal_ControlCancer_2012-2021.pdf
- Nault, J. C., & Zucman-Rossi, J. (2014). Genetics of hepatocellular carcinoma: The next generation. *Journal of Hepatology*, 60(1), 224–226.
<http://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.08.019>
- Neelarapu, R., Holzle, D. L., Velaparthy, S., Bai, H., Brunsteiner, M., Blond, S. Y., & Petukhov, P. A. (2011). Design, Synthesis, Docking, and Biological Evaluation of Novel Diazide-Containing Isoxazole- and Pyrazole-Based Histone Deacetylase Probes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 4350–4364.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (Fifth). W. H. Freeman and Company.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry* (Sixth). W. H. Freeman and Company.
- Newton, K., & Manning, G. (2016). Necroptosis and Inflammation. *Annu. Rev. Biochem.*, (85), 4.1-4.21. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014830>
- Nicholls, D. G., & Ferguson, S. J. (2013). *Bioenergetics 4*. Academic Press.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 3448–3459.
- Parra, S., & Mejía, L. C. (2001). Implicaciones farmacológicas de los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR). *IATREIA*, 14(1), 35–46.

- Philipp, S., Sosna, J., & Adam, D. (2016). Cancer and necroptosis : friend or foe? *Cellular and Molecular Life Sciences*. <http://doi.org/10.1007/s00018-016-2193-2>
- Piskounova, E., Agathocleous, M., Murphy, M. M., Hu, Z., Sara, E., Zhao, Z., ... Morrison, S. J. (2015). Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, *527*(7577), 186–191.
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datt, A., & Racker, E. (1960). Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *235*(11), 3323–3329.
- Qiu, G.-H., Xie, X., Xu, F., Shi, X., Wang, Y., & Deng, L. (2015). Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*, *67*, 1–12. <http://doi.org/10.1007/s10616-014-9761-9>
- Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*, *1*, 304–312. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.005>
- Rang, H., Ritter, J., Flower, R., & Henderson, G. (2015). Cell proliferation, apoptosis, repair and regeneration. In Elsevier (Ed.), *Rang & Dale's Pharmacology* (Eighth Ed., pp. 67–77). <http://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5362-7.00005-7>
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2017). The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, *1*, 4.1-4.20. <http://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808>
- Rehman, S., Rahman, M., Tripathi, V. K., Singh, J., Ara, T., Koul, S., ... Kaul, A. (2014). Synthesis and biological evaluation of novel isoxazoles and triazoles linked 6-hydroxycoumarin as potent cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16–19. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.031>
- Rudolf, E., & Červinka, M. (2006). Cytoskeletal Changes in Non-Apoptotic Cell Death. *Acta Medica*, *49*(2), 123–128.

- Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Publishing Group*, *14*(11), 709–721. <http://doi.org/10.1038/nrc3803>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, *24*, R453–R462. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Shen, L., Hillebrand, A., Wang, D. Q., & Liu, M. (2012). Isolation and Primary Culture of Rat Hepatic Cells. *J. Vis. Exp.*, *64*(e3917), 1–4. <http://doi.org/10.3791/3917>
- Shi, Y.-H., Fan, J., Ding, Z.-B., & Yin, X.-M. (2010). Apoptosis in the Liver. In *Apoptosis* (pp. 199–214). <http://doi.org/10.1201/9781439845431-16>
- Shimoda, M., & Wands, J. R. (2012). *Molecular biology of liver carcinogenesis and hepatitis. Blumgart's Surgery of the Liver, Biliary Tract, and Pancreas* (Fifth Edit, Vol. 1). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1454-8.00109-0>
- Singer, T. P. (1974). Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and α -Glycerophosphate Dehydrogenases. In *Methods in Biochemical Analysis* (Vol. 22, pp. 123–173).
- Somlo, M. (1965). Induction of Lactate-Cytochrome C Reductases (D- and L-) of Aerobic Yeast By Lactates (D- and L-). *Biochimica et Biophysica Acta*, *97*, 183–201.
- Sridharan, V., Suryavanshi, P. A., & Men, J. C. (2011). Advances in the Chemistry of Tetrahydroquinolines. *Chemical Reviews*, *111*, 7157–7259.
- Su, Z., Yang, Z., Xie, L., Dewitt, J. P., & Chen, Y. (2016). Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death and Differentiation*, *23*, 748–756. <http://doi.org/10.1038/cdd.2016.8>
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, *14*(1), 1–14. <http://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>
- Tzanetou, E., Liekens, S., Kasiotis, K. M., Melagraki, G., Afantitis, A., Fokialakis, N., & Haroutounian, S. A. (2014). Antiproliferative Novel Isoxazoles: Modeling, Virtual

- Screening, Synthesis, and Bioactivity Evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
<http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.011>
- Uribe P., C. J., & Meza D., E. E. (2007). Incidencia de cáncer en el Área Metropolitana de Bucaramanga, 2000-2004. *Med UNAB*, (10), 147–172.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(10), 700–714. <http://doi.org/10.1038/nrm2970>
- Voss, D. O., Campello, A. P., & Bacila, M. (1961). The Respiratory Chain and the Oxidative Phosphorylation of Rat Brain Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4(1), 48–51.
- Voss, D. O., Campello, A. P., & Bacila, M. (1961). The Respiratory Chain and the Oxidative Phosphorylation of Rat Brain Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4(1), 48–51.
- Voss, D. O., Cowles, J. C., & Bacila, M. (1963). A New Oxygen Electrode Model for the Polarographic Assay of Cellular and Mitochondrial Respiration. *Analytical Biochemistry*, 6, 211–222.
- Wan, X. S., Zhou, Z., Kennedy, A. R., Wan, X. S., Zhou, Z., & Kennedy, A. R. (2003). Adaptation of the Dichlorofluorescein Assay for Detection of Radiation-Induced Oxidative Stress in Cultured Cells. *Radiation Research*, 160, 622–630.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L. F., ... Wang, X. (2014). Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell*, 54, 133–146.
<http://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.003>
- Wang, W., Sun, Q., Wu, Z., Zhou, D., Wei, J., Xie, H., ... Zheng, S. (2013). Mitochondrial dysfunction-related genes in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Bioscience*, 18, 1141–1149.

Wu, H. (2014). *Cell Death: Mechanism and Disease*. Springer.

Zaharia, V., Ignat, A., Palibroda, N., Ngameni, B., Kuete, V., Fokunang, C. N., ... Ngadjui, B. T. (2010). Synthesis of some p -toluenesulfonyl-hydrazinothiazoles and hydrazino-bis- thiazoles and their anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(11), 5080–5085. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.08.017>

Zhang, J. Q., Li, Y. M., Liu, T., He, W. T., Chen, Y. T., Chen, X. H., ... Ren, Z. J. (2010). Antitumor effect of matrine in human hepatoma G2 cells by inducing apoptosis and autophagy. *World J Gastroenterol*, 16(34), 4281–4290. <http://doi.org/10.3748/wjg.v16.i34.4281>

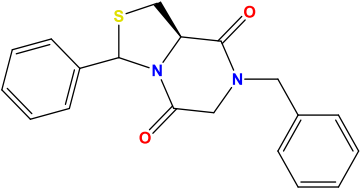
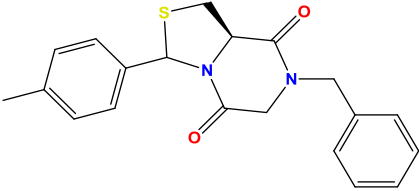
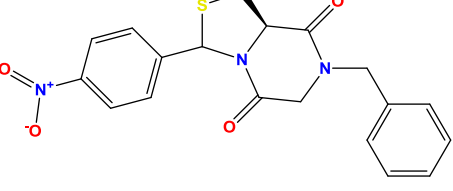
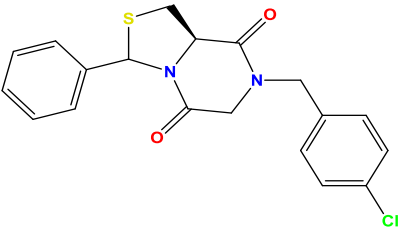
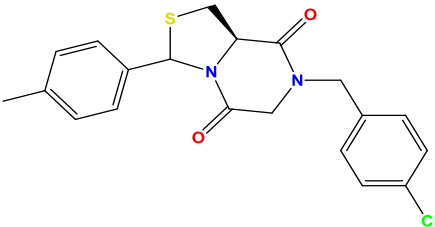
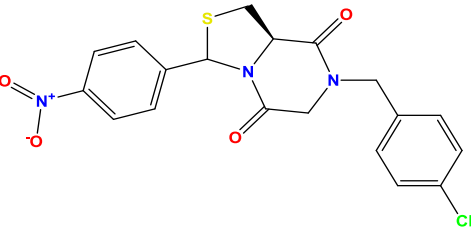
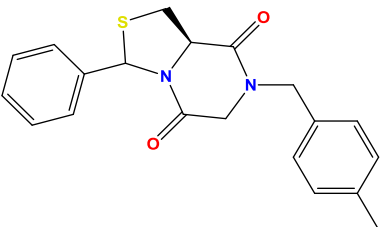
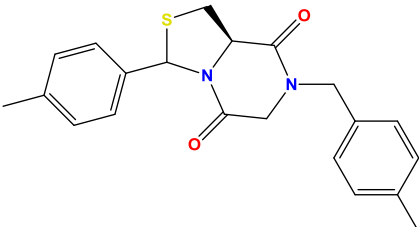
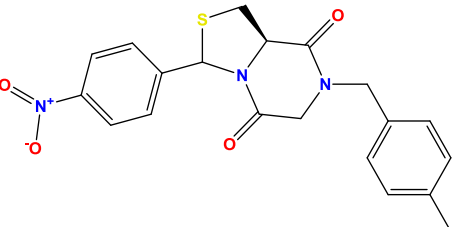
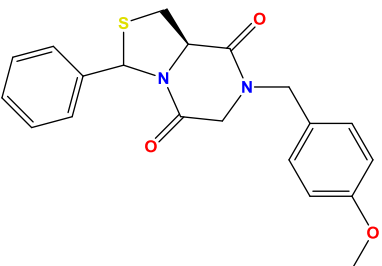
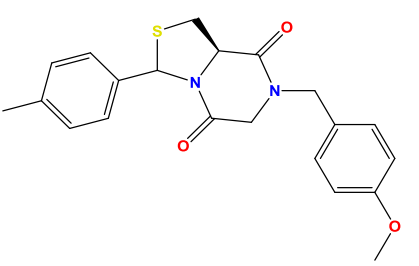
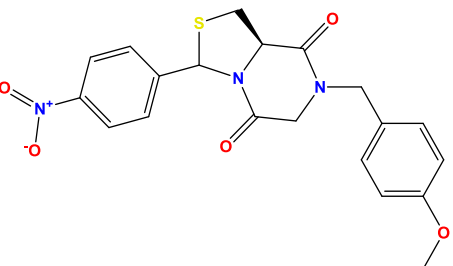
Zhang, Q., Zhou, H., Zhai, S., & Yan, B. (2010). Natural product-inspired synthesis of thiazolidine and thiazolidinone compounds and their anticancer activities. *Current Pharmaceutical Design*, 16(16), 1826–1842. <http://doi.org/10.2174/138161210791208983>

Zhang, Z., Hou, S., Chen, H., Ran, T., Jiang, F., Bian, Y., ... Chen, Y. (2016). Targeting epigenetic reader and eraser: Rational design , synthesis and in vitro evaluation of dimethylisoxazoles derivatives as BRD4 / HDAC dual inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.034>

Zong, W., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. *Molecular Cell*, 61, 667–676. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>

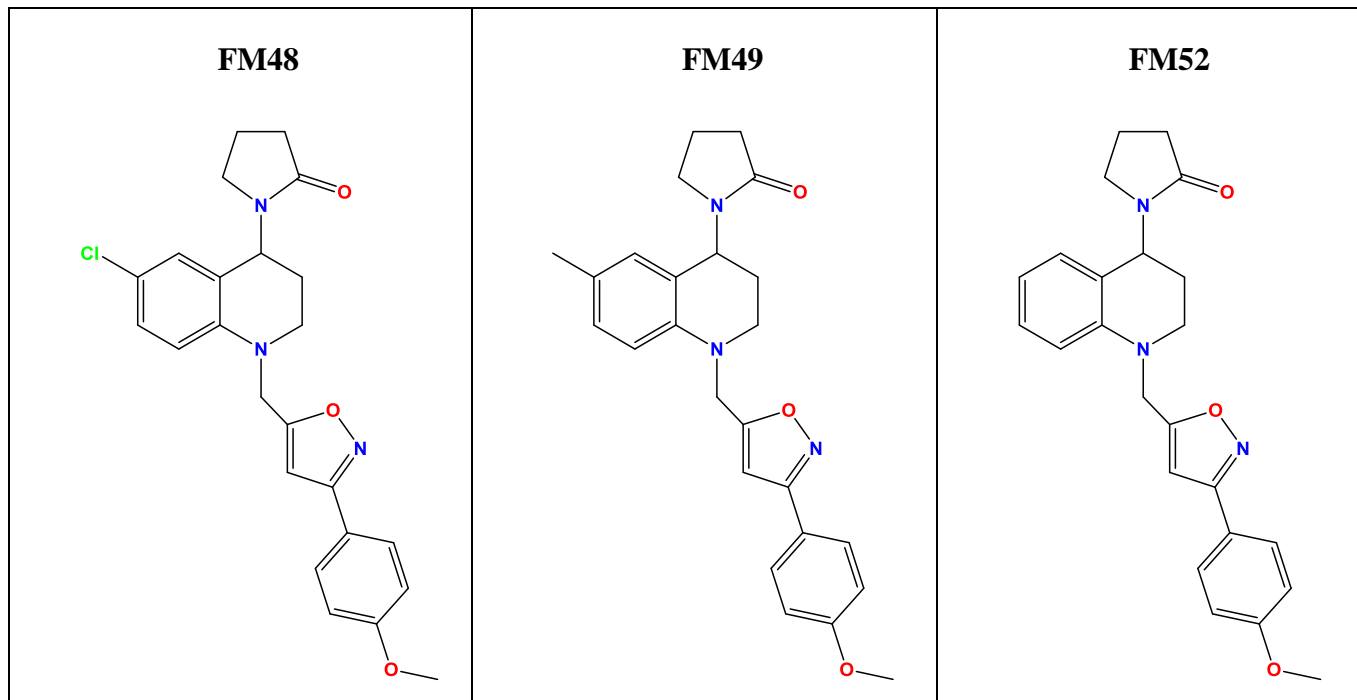
Apéndice A. Estructuras químicas de los compuestos evaluados en el proyecto

Tabla A. Nuevos derivados polifuncionalizados de las 3-aril-tiazolo [3,4-a] pirazin-5,8-dionas*.

<p style="text-align: center;">JK64</p> 	<p style="text-align: center;">JK99</p> 	<p style="text-align: center;">JK109</p> 
<p style="text-align: center;">JK69</p> 	<p style="text-align: center;">JK102</p> 	<p style="text-align: center;">JK112</p> 
<p style="text-align: center;">JK81</p> 	<p style="text-align: center;">JK103</p> 	<p style="text-align: center;">JK113</p> 
<p style="text-align: center;">JK82</p> 	<p style="text-align: center;">JK101</p> 	<p style="text-align: center;">JK114</p> 

*Compuestos sintetizados por Cala Gómez, Luis Javier (2015). Síntesis de nuevos derivados polifuncionalizados de las 3-aril-tiazolo [3,4-a] pirazin-5,8-dionas, compuestos con potencial actividad antibiótica. Trabajo de grado No. clasificación QP28904, Universidad Industrial de Santander.

Tabla B. Compuestos híbridos de tetrahydroquinolina-isoxazol**.



**Compuestos sintetizados por Marín Güiza, Fausto Alejandro (2014). Síntesis y caracterización estructural de nuevos híbridos tetrahydroquinolina/isoxazol polisustituídos vía reacción imino Diels-Alder catiónica y cicloadición 1,3-dipolar. Trabajo de grado No. clasificación QP27936, Universidad Industrial de Santander.