

Identificación de las alteraciones metabólicas en la línea celular A549 de cáncer de pulmón durante su interacción con el compuesto (*R/S*)-1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il)-metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il) pirrolidin-2-ona (THQ-IZ-J3)

Lizeth Dayana León Carreño

Trabajo de Grado para Optar el título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Químico, M.Sc. Phd

Codirector

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Doctora En Ciencias-Bioquímicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

.

A Dios, por ser luz en mi oscuridad. A mis padres María del Carmen y Raúl, a mis hermanos Jesús David, Juan Sebastián, Raúl Fernando y José Alberto, por ser el motor de mi existencia y el sentido más puro de mi vida. A mi padrino José por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

A Dios, por permitirme culminar este logro y ser el centro de mi vida. A mis padres, María del Carmen y Raúl, por su amor, esfuerzo y entrega incondicional, por creer en mí aun cuando ni yo misma lo hacía, por darme la fuerza para continuar día a día. A mis hermanos Jesús David, Juan Sebastián, Raúl Fernando y José Alberto por ser mi mayor motivación y por sacarme una sonrisa en mis peores momentos. A mi tío-padrino José Joaquín, por su apoyo, sus palabras de aliento y su enorme paciencia. Gracias, porque sin ustedes no estaría aquí.

A papá Joaquín y mamá Celia por su amor, por enseñarme que con esfuerzo todo es posible, por sus palabras, por su apoyo y su oración. A mi tío Jesús, por siempre sentirse orgulloso de mis logros. A mis nonos Guillermina y Ramiro, por su amor, su ejemplo de total entrega y lucha frente a las adversidades; espero desde el Cielo estén orgullosos de este paso.

A la profesora Stelia y al profesor William, quienes me han brindado todo su apoyo y comprensión en este proceso, gracias por su paciencia, compromiso y conocimiento transmitido. A la profesora Mónica Cala por abrirme las puertas de su laboratorio para el análisis de las muestras. A la Universidad Industrial de Santander por permitirme soñar y darme el cimiento de mis alas.

A la hermana que Dios, la vida y la ciencia me regalaron, Damaris Godoy, por abrirme las puertas de su casa, permitirme ser parte de su familia, por sus consejos, por ser incondicional y por enseñarme que siempre es bueno compartir las cargas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 402, Leonardo, Luis Carlos y Ana Milé por hacer de aquellos días los más gratos, por las historias compartidas, por su apoyo y por todo el conocimiento transmitido.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	14
1. Objetivos.....	17
1.1 Objetivo General.....	17
1.2 Objetivos Específicos	17
2. Cuerpo Del Trabajo	18
2.1 Marco Referencial	18
2.1.1 Epidemiología.....	18
2.1.2 Etiología Del Cáncer De Pulmón	19
2.1.2.1 Tabaquismo	19
2.1.2.2 Factores Genéticos.....	20
2.1.2.3 Factores Ocupacionales Y Ambientales.	20
2.1.3 Clasificación Del Cáncer De Pulmón.....	20
2.1.3.1 Carcinoma De Pulmón De Célula No Pequeña	21
2.1.3.2 Carcinoma De Pulmón De Célula Pequeña.	22
2.1.4 Biología Del Cáncer De Pulmón	22
2.1.4.1 Metabolismo Del Cáncer De Pulmón.....	25
2.1.4.2 Metabolismo De Aminoácidos En Células Cancerígenas.	25
2.1.5 Tratamientos	27
2.1.5.1 Cirugía	27

2.1.5.2 Quimioterapia	28
2.1.5.3 Radioterapia.....	33
2.1.6 Tetrahydroquinolinas.....	33
2.1.7. Isoxazoles	35
2.1.8 Metabolómica.	36
2.1.9 Identificación De Metabolitos Por Gc-Ms.....	40
2.2Metodología.....	41
2.2.1 Cultivo Celular	41
2.2.2 Preparación De La Muestra	41
2.2.3 Derivatización.....	43
2.2.4 Análisis Por Gc-Ms	43
2.2.5 Procesamiento De Datos.....	44
2.2.6 Identificación De Metabolitos	44
2.2.7 Estadística.....	44
2.3 Resultados Y Discusión.....	45
2.3.1 Análisis De Las Alteraciones Metabólicas En La Línea Celular A549 Durante 12 Horas De Interacción Con El Compuesto Thq-Iz-J3.....	46
2.3.1.1 Identificación Y Análisis Estadísticos De Los Metabolitos Obtenidos En El Tratamiento De 12 Horas.	46
2.3.2 Análisis De Las Rutas Metabólicas Alteradas En La Línea Celular A549 Durante 12 Horas De Interacción Con El Compuesto Thq-Iz-J3.	50
2.3.3 Análisis De Las Alteraciones Metabólicas En La Línea Celular A549 Durante 24 Horas De Interacción Con El Compuesto Thq-Iz-J3.	53

2.3.3.1 Identificación Y Análisis Estadístico De Los Datos Obtenidos Durante El Periodo De 24 Horas De Exposición Al Compuesto Thq-Iz-J3.	54
2.3.4 Análisis De Las Rutas Metabólicas Alteradas En La Línea Celular A549 Durante 24 Horas De Interacción Con El Compuesto Thq-Iz-J3.	57
4. Conclusiones.....	63
Referencias Bibliográficas.....	65
Apéndices	74

Lista de Tablas

Tabla 1. Datos estadísticos y porcentaje de probabilidad para cada uno de metabolitos con p-valor menor a 0,05	48
Tabla 2. Datos estadísticos y porcentaje de probabilidad para cada uno de los metabolitos significativos a 24h.	56

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura del Cisplatino.(Dasari & Tchounwou, 2014).....	28
Figura 2. (A) estructura del docetaxel. (B) estructura del paclitaxel.(Andersen et al., 2006)	29
Figura 3.(A) estructura de la vinblastina. (B) estructura de la vindesina. (C) estructura de la vinorelbina. (Dine et al., 1991).....	30
Figura 4. Estructura de la mitomicina C.(Kennedy, Rockwell, & Salterelli, 1980).....	31
Figura 5. <i>Estructura de etopósido</i> .(O'Dwyer, Jones, Leyland, Alonso, Marsoni, & Wittes, 1985)	32
Figura 6. (A) estructura del topotecán. (B) estructura del irinotecán.(Cragg & Newman, 2005)	33
Figura 7. <i>Tetrahydroquinolinas con actividad antitumoral</i> .(Babichev, Kovtunenکو, & Tytilin, 1981).....	34
Figura 8. <i>Compuestos anticancerígenos derivados de isoxazol</i> .(Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017)36	
Figura 9. Compuesto híbrido (R/S)-1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il)-metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il) pirrolidin-2-ona. (THQ-IZ-J3). Fuente: Autor	42
Figura 10. Efecto del compuesto THQ-IZ-J3 sobre la viabilidad de células A549 (Güiza et al., 2019).	45
Figura 11. Perfil químico de los extractos metanólicos de la línea celular A549. A) grupo control y B) grupo tratamiento expuesto durante 12 horas al compuesto THQ-IZ-J3.	47
Figura 12. Espectro de masas experimental del ácido cítrico derivatizado (rojo) vs espectro de masas teórico del ácido cítrico derivatizado (azul).....	48

Figura 13. Análisis de componentes principales PCA. Muestras control (rojo) vs tratamiento (verde).....	49
Figura 14. Posibles rutas metabólicas alteradas en la línea celular A549 durante 12 horas de interacción con el compuesto THQ-IZ-J3. Los metabolitos resaltados en rojo representan aquellos que se encontraron disminuidos con relación al grupo control.	51
Figura 15. Representación gráfica de la alteración de los metabolitos estadísticamente significativos con relación al grupo control.	53
Figura 16. Perfil químico del extracto metabólico en la línea celular A549. A) grupo control y B) grupo tratamiento, expuesto durante 24 horas al compuesto THQ-IZ-J3.	55
Figura 17. Espectro de masas experimental de la L-serina (rojo) vs espectro de masas teórico L-serina (azul).	55
Figura 18. Análisis de componentes principales (PCA) del perfil químico de los extractos metabólicos en muestras control 24h (rojo) vs tratamiento 24h (verde).	57
<i>Figura 19. Rutas metabólicas alteradas tentativamente en la línea celular A549 durante 24 horas de interacción con el compuesto THQ-IZ-J3. Los metabolitos resaltados en rojo representan aquellos que se encontraron disminuidos con relación al grupo control.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 20. Representación gráfica de la alteración de los metabolitos estadísticamente significativos con relación al grupo control.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 21. Posibles rutas metabólicas alteradas en la línea celular A549 durante 12 y 24 horas de su interacción con el compuesto THQ-IZ-J3. Los metabolitos en rojo significan inhibición respecto al control.</i>	<i>62</i>

Lista de Apéndices

Apéndice 1. Espectro de masas experimental de la adenina (rojo) vs espectro de masas teórico adenina (azul).	74
Apéndice 2. Espectro de masas experimental de la prolina (rojo) vs espectro de masas teórico prolina (azul).....	74
Apéndice 3. Espectro de masas experimental de la isoleucina (rojo) vs espectro de masas teórico isoleucina (azul).....	75
Apéndice 4. Espectro de masas experimental de la leucina (rojo) vs espectro de masas teórico leucina (azul).	75
Apéndice 5. Espectro de masas experimental de la serina (rojo) vs espectro de masas teórico serina (azul).....	75
Apéndice 6. Espectro de masas experimental de la valina (rojo) vs espectro de masas teórico valina (azul).	76
Apéndice 7. Espectro de masas experimental de la alanina (rojo) vs espectro de masas teórico alanina (azul).	76
Apéndice 8. Espectro de masas experimental del ácido fosfórico (rojo) vs espectro de masas teórico del ácido fosfórico (azul).....	76
Apéndice 9. Espectro de masas experimental de la cisteína (rojo) vs espectro de masas teórico de la cisteína (azul).....	77
Apéndice 10. Espectro de masas experimental de la metionina (rojo) vs espectro de masas teórico de la metionina (azul).	77

Apéndice 11. Espectro de masas experimental del ácido málico (rojo) vs espectro de masas teórico del ácido málico (azul).	77
Apéndice 12. Espectro de masas experimental de la treonina (rojo) vs espectro de masas teórico de la treonina (azul).	78

Resumen Español

Título: Identificación De Las Alteraciones Metabólicas En La Línea Celular A549 De Cáncer De Pulmón Durante Su Interacción Con El Compuesto (R/S)-1-(6-Cloro-1-((3-Fenilisoxazol-5-Il)-Metil)-1,2,3,4-Tetrahidroquinolin-4-Il) Pirrolidin-2-Ona (Thq-Iz-J3)

Autor: Lizeth Dayana León Carreño

Palabra Clave: Cáncer De Pulmón, Metabolómica, Gc-MS

Descripción:

El cáncer de pulmón es la principal causa por muerte de cáncer en el mundo, dado que tiene opciones limitadas de tratamiento y generalmente se detecta en un estado avanzado. Por tanto, el estudio y desarrollo de compuestos efectivos contra esta enfermedad se convierte en una ardua tarea para la comunidad científica. Estudios anteriores sobre el compuesto sintético tipo tetrahidroquinolina-isoxazol, THQ-IZ-J3, mostraron actividad citotóxica sobre las células tumorales de pulmón, sin afectar las células sanas. Por esta razón, con el fin de evaluar la interacción del compuesto THQ-IZ-J3 en la línea celular A549 de cáncer de pulmón y conocer las posibles alteraciones metabólicas generadas, se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y posterior análisis estadístico de los datos por métodos uni- y multivariados. Metabolitos involucrados en el ciclo de Krebs, glucólisis y ruta de las pentosas fosfato fueron tentativamente identificados y relacionados con cambios metabólicos ocurridos posterior al tratamiento. La alteración de las rutas metabólicas identificadas en el estudio, están estrechamente relacionadas con la producción de energía a nivel celular, por cuanto permite explicar la inhibición en la proliferación celular generado en la línea celular A549. A pesar de que estudios adicionales son necesarios para fundamentar y correlacionar los perfiles químicos de la línea celular de cáncer de pulmón aquí reportados, con su nivel de expresión de los genes y proteínas implicadas en las vías metabólicas identificadas como afectadas, es importante resaltar que el estudio abre un panorama interesante para proponer este tipo de compuestos químicos como moléculas promisorias en la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas para enfrentar el cáncer de pulmón.

Abstrat

Title: Identification Of Metabolic Alterations In The A5549 Lung Cancer Cell Line During The Interaction With The Compound (R/S)-1-(6-Chloro-1-((3-Phebylisoxazol-5-Il)-Methyl)-1,2,3,4-Tetrahydroquinolin-4-Il) Pirrolidin-2-One (Thq-Iz-J3)

Author: Lizeth Dayana León Carreño

Keywords: Lung Cancer, Metabolomic, Gc-Ms

Descripción:

Lung cancer is the world's leading cause of cancer death, as it has limited treatment options and is usually detected at an advanced stage. Therefore, the study and development of effective compounds against this disease becomes an arduous task for the scientific community. Previous studies on the synthetic tetrahydroquinoline-isoxazole compound, THQ-IZ-J3, showed cytotoxic activity on lung tumor cells, without affecting healthy cells. For this reason, to evaluate the interaction of the compound THQ-IZ-J3 in the A549 lung cancer cell line and to unravel the possible metabolic alterations generated, a metabolomic approach based on gas chromatography coupled to mass spectrometry analysis with subsequent statistical analysis of the data by univariate and multivariate methods was carried out. Metabolites involved in the Krebs cycle, glycolysis and the pentose phosphate pathway were tentatively identified and related to metabolic changes that occurred after treatment. The alteration of the metabolic pathways identified in the study are closely related to the production of energy at the cellular level, since it allows to explain the inhibition on cell proliferation generated in the A549 cell line. Although additional studies are necessary to substantiate and correlate the chemical profiles of the lung cancer cell line reported here, with their level of gene expression and proteins involved in the metabolic pathways identified as affected, it is important to highlight that this study opens up an interesting outlook to propose this type of chemical compounds as promising molecules in the search for new chemotherapeutic alternatives to face lung cancer.

Degree work

Faculty of Sciences, School of Chemistry, director William Fernando Hidalgo Bucheli
Chemist, M.Sc. Ph

Introducción

“Cáncer” es un término que causa pánico en el hombre, y no es para menos, éste se atribuye a un gran número de enfermedades que afectan cualquier parte del organismo; caracterizándose por la multiplicación veloz de células anormales más allá de los límites, invadiendo cualquier órgano en un proceso denominado metástasis (Risch & Plass, 2008). De esta manera, el cáncer se ha convertido en la segunda enfermedad que cobra más vidas en el mundo. En el 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró 18' 078 .957 de casos nuevos de personas con cáncer y 9'555.027 de defunciones a causa de esta enfermedad. Entre los tipos de cáncer de mayor incidencia a nivel mundial se encuentran el mamario (11.6%), colorrectal (10.2%), próstata (7.1%), estomacal (5.7%), hepático (4.7%) y pulmonar, siendo éste último, el de mayor incidencia en el mundo con 2'093.897 (11.6%), y 1'761.007 de defunciones para el año 2018 (Bray, Ferlay, & Soerjomataram, 2018). Además, en Colombia, según las cifras reportadas por la OMS para el mismo año, se registraron 5.856 casos nuevos de cáncer pulmonar y 5.236 muertes a causa de éste carcinoma (Risch & Plass, 2008; World Health Organization, 2019). Así mismo, en Colombia, en los años comprendidos entre 2007-2011, según el DANE hubo 19.413 muertes a causa de éste carcinoma, de las cuales 801 corresponden al departamento de Santander (Cancerología, 2017)

Ante la alta tasa de mortalidad, la ciencia ha desarrollado diferentes tratamientos contra ésta enfermedad entre los cuales se contemplan la cirugía, quimioterapia y radioterapia, métodos utilizados con base en la histología de tumor pulmonar que presenten los pacientes: adenocarcinoma, carcinoma, epidermoide, microcítico (CPM) o no microcítico (CPNM) (Castro

Carpeo, Belda-Iniesta, Feliu Batlle, & González Barn, 2006). Además, el procedimiento a seguir también depende del estadio, edad, función pulmonar y comorbilidad (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014). La cirugía siempre es la mejor opción cuando el tumor está limitado a un hemitórax (Mozo, Carro, Cirauqui, & Costa, 2001), se encuentra en la fase I y II y el paciente la tolere, aunque sólo es posible en el 21- 25% de los casos (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014). La quimioterapia es el tratamiento estándar cuando la enfermedad está localmente avanzada y diseminada (Mozo et al., 2001), la mediana de supervivencia es de 12 meses para la enfermedad diseminada y 18 meses para la local. No obstante, sólo un 14% de los enfermos logra sobrevivir después de tres años (Castro Carpeo et al., 2006); de igual forma, para éste tipo de cáncer la radioterapia convencional radical es una alternativa a la cirugía en pacientes no aptos para ella, se utiliza comúnmente combinada con la quimioterapia (Sánchez Hernández, Izquierdo Alonso, & Almonacid Sánchez, 2006); lamentablemente ésta presenta efectos secundarios como radiodermatitis, neumonitis, fibrosis pulmonar, entre otros, dependiendo de la dosis utilizada (Mozo et al., 2001).

A pesar de los innumerables esfuerzos por vencer esta enfermedad, pareciera que sale invicta sin importar con lo que se le ataca, pues ninguno de los fármacos utilizados actualmente expresa efectividad total. Y aunque existe una variedad de agentes activos como el cisplatino, carboplatino, doxorubicina, vinblastina, entre otros (González, Yustos, Martínez, & Soto, 2009; Mozo et al., 2001), éstos presentan efectos secundarios negativos a nivel hematológico y de nefrotoxicidad. Además, de que las células cancerígenas han expresado resistencia a la quimioterapia (González et al., 2009).

Por esta razón, y ante la ausencia de nuevas moléculas farmacológicas, el grupo de investigación “Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal –CODEIM” basándose en las propiedades anticancerígenas de las tetrahydroquinolinas e isoxazoles, sintetizó el nuevo compuesto híbrido (*R/S*)-1-(6-Cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il)-metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il) pirrolidin-2-ona (THQ-IZ-J3). Estos compuestos fueron evaluados por primera vez por el grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología –GIBIM - fueron prometedores; ya que presentaron citotoxicidad sobre las células tumorales de pulmón, sin afectar las células sanas (Güiza, Bueno, Mendez-sanchez, & Bohórquez, 2019). Con base en lo anterior, los grupos de investigación GIBIM y CODEIM plantearon la necesidad de evaluar la interacción del compuesto THQ-IZ-J3 en la línea celular A549 de cáncer de pulmón dando así vida al presente proyecto de grado. Por tanto, en el presente estudio, se aplicó un análisis metabólico basado en cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas el cual permitió explorar y analizar las rutas metabólicas afectadas por dicho compuesto, resultados que permiten posicionar al compuesto THQ-IZ-J3 como un posible candidato terapéutico para el tratamiento del cáncer de pulmón.

1. Objetivos

1.1 *Objetivo General*

Evaluar cambios metabólicos *in vitro* generados en la línea celular A549 (cáncer de pulmón) tratadas con el compuesto (R/S)-1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il)-metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.

1.2 *Objetivos Específicos*

- ✓ Analizar el perfil metabólico del cultivo celular A549 durante su interacción con (R/S)-1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il)-metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.
- ✓ Identificar y cuantificar los metabolitos diferencialmente expresados.
- ✓ Proponer las posibles rutas metabólicas afectadas por el tratamiento con el compuesto (R/S)-1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il)-metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.

2. Cuerpo del Trabajo

2.1 Marco Referencial

2.1.1 Epidemiología. Durante muchos años el cáncer de pulmón ha sido el más común, llegando a ser la causa más usual por muerte de cáncer en todo el mundo, tanto así que para el año 2018 según datos estadísticos reportados por la Organización Mundial de la Salud fue el responsable de la muerte de 1.79 millones de personas, el 18.4% del total de muertes a causa de cáncer (Bray et al., 2018). En Colombia, según el Instituto Nacional de Cancerología, en el periodo 2007-2011 se presentaron 19.413 muertes a causa de tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón; de las cuales 11.740 corresponden a hombres y 7.673 defunciones a mujeres (Cancerología, 2017).

Además, el hecho de que el cáncer de pulmón sea uno de los más letales a nivel mundial se debe a que su detección ocurre en los estadios más avanzados de la enfermedad (III o IV) (Moreno, Bruges, Arboleda, & Jaramillo, 2016). Se ha establecido que la relación global entre la incidencia y la mortalidad es de 0,87 (Cancer Today, 2017; Moreno et al., 2016); mientras que en Colombia, el impacto en mortalidad de la enfermedad presenta una tasa de letalidad muy cercana al 100% (Moreno et al., 2016).

2.1.2 Etiología del cáncer de pulmón. Existen diversos factores de riesgo que influyen en el desarrollo del cáncer de pulmón, como los ambientales, ocupacionales, carga genética, entre otros; pero el mayor culpable es el tabaquismo (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014).

2.1.2.1 Tabaquismo. Éste es el principal factor de riesgo, pues cerca del 90% de todos los cánceres de pulmón están directamente relacionados con el consumo de tabaco (Expósito, González, Castillo, Losada, & Soto, 2009). Para un fumador, el riesgo de padecer cáncer de pulmón está ligado al número de cigarrillos consumidos por día, el tiempo que lleva practicando éste hábito, la edad de inicio, la profundidad de inhalación del humo y la cantidad de nicotina y alquitrán presentes en los cigarrillos (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014). Además de éstas existen otras 3000 sustancias cancerígenas producto de la combustión, capaces de producir daños en el ADN nuclear (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014). El riesgo de padecer ésta enfermedad no sólo aumenta en los fumadores directos sino también los fumadores pasivos (Expósito et al., 2009).

Al igual que los otros tipos de cáncer, el cáncer de pulmón es el resultado de alteraciones genéticas, mutaciones en el ADN, con la diferencia que en éste existe un factor externo, el humo de tabaco, culpable de la inflamación en el tracto respiratorio que influye en el estrés oxidativo aumentando el riesgo y progresión del cáncer de pulmón (Tardon, 2014). Esto se ocasiona gracias al humo del tabaco, entre otros factores, el cual origina la expresión de citosinas, las interleucinas (IL) 4, 6, 8 y 10, que actúan inhibiendo la apoptosis, obstaculizando los mecanismos de reparación celular y favoreciendo la angiogénesis (Tardon, 2014).

2.1.2.2 Factores genéticos. Aunque el adenocarcinoma pulmonar está fuertemente ligado con el tabaquismo, también puede presentarse por predisposición hereditaria, pues se han encontrado casos de pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPNM) que nunca habían fumado, pero tenían antecedentes familiares (Kanwal, Ding, & Cao, 2016). Por lo tanto, existe un posible vínculo entre las mutaciones de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el desarrollo de dicha enfermedad (Kanwal et al., 2016)(Pass, Ball, & Scagliotti, 2017).

Así mismo, el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón familiar está relacionado con la región cromosómica 15q24-25.1, con aquellos que poseen dos copias de los alelos rs8034191, rs1051730 y con un miembro regulador de la familia de señalización de proteína G (RGS), RGS17, ya que se ha demostrado la expresión del RGS17 en tejidos tumorales y su sobreexpresión aumenta la tasa de proliferación de células malignas (Kanwal et al., 2016).

2.1.2.3 Factores ocupacionales y ambientales. En el ambiente laboral y ambiental existen sustancias que son eventualmente cancerígenas, como el arsénico, níquel, cromo, entre otras; de igual manera la exposición al asbesto contribuye con el desarrollo de la enfermedad, dependiendo de la dosis y tipo de amianto. Lo mismo sucede en personas expuestas al radón, humo de cocina, quemadas de biomasa y escapes de diésel (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014).

2.1.3 Clasificación del cáncer de pulmón. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de pulmón se presenta en dos subtipos principales tratados a continuación.

2.1.3.1 Carcinoma de pulmón de célula no pequeña. También denominado carcinoma no microcítico (CPNM), responsable del 80% de todos los casos de tumores pulmonares (Expósito et al., 2009) y se divide en tres grupos.

a) Adenocarcinoma.

En éste grupo se incluye el carcinoma bronquioloalveolar o adenocarcinoma de crecimiento lipídico (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014), el cual se puede presentar de tres diferentes formas: no mucinoso, mucinoso, e indeterminado (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014). Representa entre el 35-40% de los tumores pulmonares, no está relacionado con consumidores de tabaco y se presenta con mayor frecuencia en las mujeres (Criado Daza & Dáder, 2010). Está relacionado con cicatrices pulmonares previas (Mozo et al., 2001), suele ser periférico debido a que proviene de los epitelios distales y las glándulas mucinosas (Mozo et al., 2001).

b) Carcinoma de células escamosas, epidermioide o espinocelular.

Está relacionado con el tabaco, es responsable de aproximadamente el 35% de todos los cánceres de pulmón (Mozo et al., 2001). Se manifiesta mediante tumores de localización central y se caracteriza por producir queratina con desmosomas prominentes y puentes intracelulares (Expósito et al., 2009).

c) Carcinoma de células grandes.

La agresividad de éste es del 10%, se presenta en forma de masas grandes periféricas o centrales con constantes áreas de neumonitis (Expósito et al., 2009), histológicamente son células grandes con abundante citoplasma y gran nucléolo y núcleo (Mozo et al., 2001). Un ejemplo de ello es el carcinoma endocrino de célula grande (Aranda, Alenda, Peiró, & Peiró, 2003).

Además de esta clasificación existen otros tipos de carcinomas de células no pequeñas no clasificadas que hacen parte de un 18% de casos de cáncer de pulmón (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014).

2.1.3.2 Carcinoma de pulmón de célula pequeña. Conocido también como cáncer de pulmón microcítico (CPM), es un tipo de tumor originado por las células neuroendocrinas del epitelio respiratorio, el cual aparece habitualmente en fumadores, al cual se le atribuye el 15% de los casos de cáncer de pulmón. Se diferencia del CPNM ya que éste tiene una tasa de crecimiento celular elevada y la metástasis se produce en etapas tempranas, además se presentan mutaciones del gen *p53* en el 75-90% de los pacientes, pero son muy poco frecuentes las alteraciones en K-RAS (Aranda et al., 2003).

Cabe mencionar que existen otros tipos de tumores fuera de esta clasificación que se presentan en el 6% de las personas que padecen esta enfermedad.

2.1.4 Biología del cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón se desarrolla a través de un proceso que va desde el epitelio normal bronquial a la displasia, carcinoma *in situ* y finalmente cáncer invasivo (Boland et al., 2017), en donde se ven afectados los genes supresores y oncogenes, lo que conlleva a la pérdida de los mecanismos de control de crecimiento celular. (Mozo et al., 2001) Los cambios pueden ser genéticos (por delección o mutación) o epigenéticos (metilación) (González et al., 2009).

Dentro de las alteraciones genéticas más frecuentes se encuentran las mutaciones en el gen p53, encargado de codificar la proteína p53. La función del p53 cuando hay daño del ADN es generar un aumento de producción de la proteína p53, lo que induce la detención del ciclo celular en fase G1 para permitir la reparación del ADN. Así, si existe una mutación de p53, no es posible detener la fase G1 y la célula tumoral continúa dividiéndose y causando daño celular (González et al., 2009).

Las mutaciones en el gen P53 ocurren en el 50% de los casos de CPNM, siendo más dominantes en el carcinoma de células escamosas; también se encontró que las personas con exposición al humo de tabaco o un historial de tabaquismo, tienen un mayor riesgo de presentar dichas alteraciones (Kanwal et al., 2016).

También, es común la delección del gen de la retinoblastoma (RB) que codifica la proteína nuclear RB, encargado de bloquear el ciclo celular ante una lesión en el ADN. Por lo cual, si hay una mutación en el gen RB se favorecerá el crecimiento celular incontrolado impidiendo la detención del ciclo celular en casos de alteración del ADN (Cooper, Lam, O'Toole, & Minna, 2013).

A su vez, en éste tipo de cáncer se producen mutaciones en el gen KRAS (K-ras) el cual codifica la proteína KRAS, que actúa en las vías de señalización celular que controlan el crecimiento, la maduración y muerte de las células (Tolosa, Morse, & Lysterly, 2006). Las delecciones en éste gen consisten en sustituciones de un solo aminoácido en puntos de acceso localizados principalmente en el codón 12, pero también en los codones 13 y 61 (Cooper et al., 2013) y están presente con mayor frecuencia en los tumores de fumadores (Westcott & To, 2013).

Por otra parte, las alteraciones epigenéticas, están relacionadas con los cambios ocasionados en la expresión génica sin alteraciones en la secuencia de ADN, como la metilación del ADN en donde la adición de grupos metilo al carbono 5 de las citosinas presentes en secuencias CpG (metilación), silencia la expresión génica al interferir con la maquinaria de transcripción, lo que interviene en la progresión y diferenciación celular porque los reguladores del ciclo, como el p16, p21, p27, y p53, son silenciados por la metilación. Éste proceso es mediado por las enzimas ADN metiltransferasas (La Salle & Trasler, 2006)(Bujas et al., 2011).

De igual modo las histonas, proteínas que se asocian con el ADN en el núcleo y ayudan a condensarlo en la cromatina; están sujetas a modificaciones transduccionales, sus extremos N-terminal que forman el nucleosoma sobresalen de esta estructura y son blanco de acetilaciones, metilaciones o fosforilaciones, que pueden desfavorecer la compactación de la cromatina y así cambiar la accesibilidad de la maquinaria transcripcional (Waldmann & Schneider, 2013)(Renaud et al., 2007).

Por su parte, la hipermetilación inactiva los genes relacionados con el control de ciclo celular, apoptosis y reparación del ADN. Algunos de los genes más susceptibles a metilación son el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A), encargado de la inhibición de la ciclina involucrada en el punto de control G1/S del ciclo celular; el gen DAPK, que codifica la proteína quinasa asociada a apoptosis; el PTEN que codifica la proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), fosfatasa involucrada en la regulación del ciclo celular; el gen CDH1 que codifica la proteína cadherina 1 (CDH1), regula la adhesión celular, el crecimiento y

la movilidad; su pérdida de función en el cáncer está asociada a incrementos en la proliferación, invasión y metástasis (Cheng & Blumenthal, 2010)(Kayser et al., 2011).

2.1.4.1 Metabolismo del cáncer de pulmón. La actividad metabólica determina la capacidad de supervivencia celular, así como la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, se conoce que las células cancerígenas emplean diferentes estrategias metabólicas, para lograr mantener la energía y los precursores biosintéticos requeridos en la proliferación celular (Bamji-stocke et al., 2019). Uno de los principales metabolitos alterados es la glucosa, la cual se encuentra sobre expresada garantizando una producción elevada de energía (en términos de la producción de ATP); permitiendo así la replicación incesante de las células (Rinaldi, Rossi, & Fendt, 2017). Dicha alteración fue descubierta en 1920 por Otto Warburg, quien encontró que había un gran consumo de glucosa en tejidos cancerosos, en comparación con los sanos. También, que contrario a lo que sucede en las células normales (la glucosa produce piruvato, ATP y CO₂); en las células malignas ocurre la fermentación de la glucosa en lactato aún en presencia de oxígeno (glucólisis aeróbica)(Liberti & Locasale, 2016).

2.1.4.2 Metabolismo de aminoácidos en células cancerígenas. Los aminoácidos están implicados en diversos procesos celulares como la biosíntesis de proteínas, nucleótidos, lípidos, glutatión, glucosaminas, poliaminas y metabolitos intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Así mismo, estudios en plasma de pacientes enfermos han reportado un aumento de aminoácidos como L-leucina, L-valina, L-isoleucina, L-treonina, L-serine, L-cisteina, entre otros, en comparación con personas sanas (Tang et al., 2019).

La **leucina, valina e isoleucina** son parte de los nueve aminoácidos esenciales (obtenidos de la dieta) involucrados en la síntesis de proteínas. Además, éstos tres aminoácidos a su vez son aminoácidos de cadena ramificada. Cada uno de ellos sufre una transaminación reversible catalizada por una aminotransferasa de cadena ramificado, produciendo sus respectivos cetoácidos. Estos cetoácidos se someten a una descarboxilación oxidativa irreversible, catalizada por un cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada. De esta manera a partir de los productos obtenidos en la descarboxilación (y junto a reacciones adicionales), se produce acetil coenzima A (Acetil CoA), propionil CoA, acetoacetato y succinil CoA productos de importancia en el ciclo del ácido cítrico (The Human Metabolome Database, 2020),(PubChem, 2020).

- ✓ La **L-alanina** es un aminoácido no esencial, el cual es un importante regulador del metabolismo de la glucosa. Así mismo, está involucrada en diversos trastornos metabólicos entre los cuales se encuentran la vía de glutaminólisis y el cáncer de pulmón (PubChem, 2020)(The Human Metabolome Database, 2020).
- ✓ La **L-histidina** es un precursor de la histamina que regula la producción de especies reactivas de oxígeno en las células, lo cual podría desempeñar funciones antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. También la histamina juega un papel importante en estudios clínicos para el tratamiento contra ciertos tipos de cáncer y enfermedades virales. Dado que ésta (histamina) suprime la producción de especies reactivas de oxígeno, conlleva a la inhibición de la supresión de las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos T citotóxicos; permitiendo que las células NK sean más eficaces atacando las células cancerígenas y las afectadas por un virus (The Human Metabolome Database, 2020)(PubChem, 2020).

- ✓ La **L-ornitina** es un aminoácido no esencial, la cual tiene un papel principal en el ciclo de la urea y la eliminación del exceso de nitrógeno (amoníaco). A su vez, este aminoácido es un precursor de citrulina y arginina. Está implicada en el metabolismo de la arginina y prolina, la vía de biosíntesis de la espermidina y espermina, y el metabolismo de la glicina y serina (PubChem, 2020) (The Human Metabolome Database, 2020).
- ✓ La **cisteína** es el único aminoácido que contiene el grupo tiol, puede ser sintetizada en el cuerpo humano siempre y cuando exista suficiente metionina disponible. Además, tiene propiedades antioxidantes, que permiten (junto con la glicina y el ácido glutámico) la biosíntesis de la glutatona (GHS) metabolito disminuido en fumadores(PubChem, 2020).
- ✓ La **L-serina** es de gran importancia para la proliferación celular, puesto que dicho aminoácido se convierte en glicina lo que a su vez produce las unidades de carbono necesarias para la síntesis de las bases de purina, adenina y guanina. Así, cuando estas bases se unen a los azúcares pentosas se producen mediante varias rutas metabólicas adenosín trifosfato (ATP) y guanosín trifosato (GTP) los cuales proporcionan la energía celular (PubChem, 2020).

2.1.5 Tratamientos. Los principales tratamientos contra el cáncer utilizados actualmente son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia.

2.1.5.1 Cirugía. La cirugía es el mejor tratamiento para aquellos pacientes que están en los estadios I y II, pero depende si se cumplen o no los criterios de operabilidad tales como localización del tumor, extensión de la enfermedad y reserva cardiopulmonar. Pese a esto, la supervivencia estimada en 5 años es del 30 al 67% , por lo que en algunas personas se realiza

posteriormente quimioterapia neoadyuvante (Mozo et al., 2001; Resano Barrio & Anta Mejía, 2014).

2.1.5.2 Quimioterapia. Es considerado el tratamiento estándar en pacientes con enfermedad localmente avanzada y diseminada. Algunos de los fármacos utilizados son: cisplatino, docetaxel, paclitaxel, etopósido, topotecan, vinblastina, vindesina, carboplatino, vinorelbina, ifosfamida, gemcitabina, irinotecan, mitomicina-C; se combinan fármacos con respuestas superiores al 15%, entre los cuales están el cisplatino-etopósido 30%, cisplatino-gemcitabina 40%, cisplatino-ifosfamida 20%-30%, cisplatino-vindesina 14%-30%, cisplatino-5-fluoracilo-leucovorin 29%, cisplatino-mitomicina C 30%-60%, en donde el fármaco que ha demostrado mayor actividad en cualquier combinación es el cisplatino (Mozo et al., 2001).

a) Cisplatino

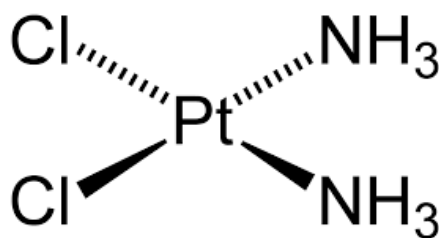


Figura 1. Estructura del Cisplatino.(Dasari & Tchounwou, 2014)

El cisplatino (Figura 1), fue el primer compuesto de platino para el tratamiento del cáncer aprobado por la FDA en 1978, gracias a su efectividad contra varios tipos de cáncer. Su modo de acción se relaciona con la capacidad de entrecruzamiento con las bases púricas del ADN,

interfiriendo en los mecanismos de reparación del ADN, causando daño en el ADN y posteriormente induciendo la apoptosis en las células cancerosas. A pesar de su fuerte actividad antitumoral presenta efectos secundarios que incluyen toxicidad renal, náuseas y vómitos (Dasari & Tchounwou, 2014).

b) Docetaxel y Paclitaxel

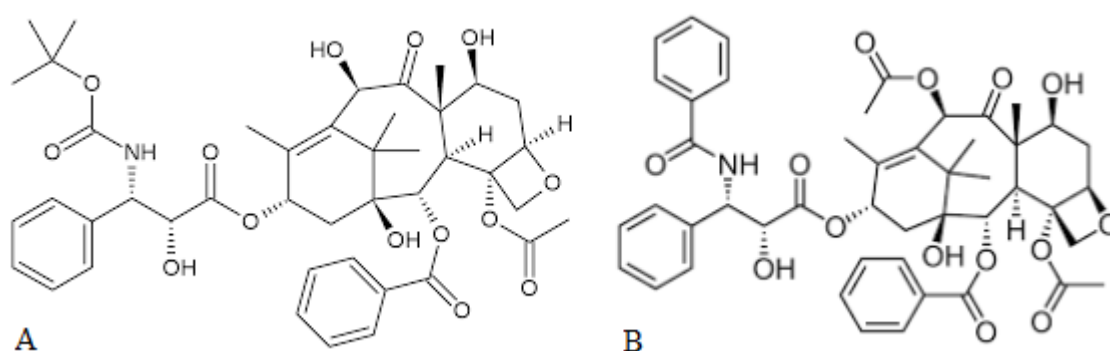


Figura 2. (A) estructura del docetaxel. (B) estructura del paclitaxel.(Andersen et al., 2006)

Son compuestos conocidos como taxanos (Figura 2), su mecanismo de acción consiste en la unión de éstos a la fracción β de los microtúbulos impidiendo su despolimerización, generando enlaces estables y, por ende, túbulos no funcionales. Esto afecta de manera dinámica la división celular e induce la muerte de las células en replicación constante.(Lorenzo et al., 2008) Además, presenta otro mecanismo de acción en el cual se induce la expresión génica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la detención en la fase G₂, potenciando el efecto de las radiaciones ionizantes (Lorenzo et al., 2008).

Ambos fármacos atacan a las células cancerosas preferentemente, ya que se dividen con mayor frecuencia que las no tumorales, pero dado que también existen células normales con una alta tasa de proliferación, como los linfocitos y los folículos pilosos, resultan afectadas por el uso de estas terapias, lo que desencadena la depresión del sistema inmune, pérdida del cabello y náuseas (Morales, Cárdenas, & Verde, 2016).

c) Vinblastina, Vindesina y Vinorelbina

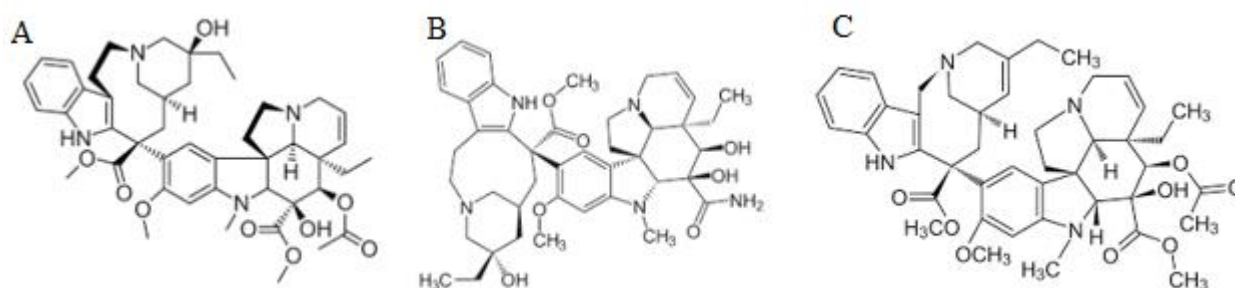


Figura 3.(A) estructura de la vinblastina. (B) estructura de la vindesina. (C) estructura de la vinorelbina. (Dine et al., 1991)

La vinblastina, vindesina y vinorelbina (Figura3), son agentes específicos del ciclo celular que actúan durante la metafase de la mitosis. Se unen con la tubulina, proteína que forma el huso mitótico alterando el movimiento del huso celular ocasionando su destrucción y la dispersión de los cromosomas impidiendo la mitosis (Lorenzo et al., 2008).

La toxicidad de cada uno de los fármacos es un poco diferente, pues la vinblastina y vinorelbina producen leucopenia, mucositis; mientras que la vindesina y vinorelbina, alopecia. Además, tienen

dos mecanismos de resistencia, el primero es la resistencia pleiotrópica a través de la glucoproteína P. El segundo, es la alteración estructural o funcional de las tubulinas α y β por mutaciones puntuales del genoma (Lorenzo et al., 2008).

d) Mitomicina C

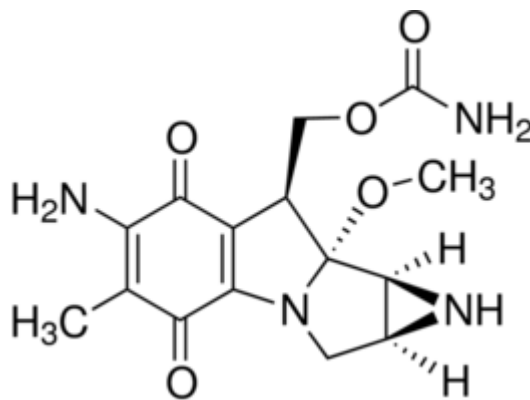


Figura 4. Estructura de la mitomicina C. (Kennedy, Rockwell, & Salterelli, 1980)

Es un fármaco antitumoral (Figura 4) que actúa como un agente alquilante bifuncional, creando puentes intracatenarios e intercatenarios en el ADN y generando radicales libres. Actúa en las fases G_1 y S del ciclo celular. Puede causar aparición de anorexia, náuseas, vómitos, mielosupresión dependiendo de la dosis acumulada, e incluso fibrosis pulmonar irreversible; por lo cual en la actualidad su uso es muy restringido dada su alta toxicidad (Lorenzo et al., 2008).

e) Etopósido

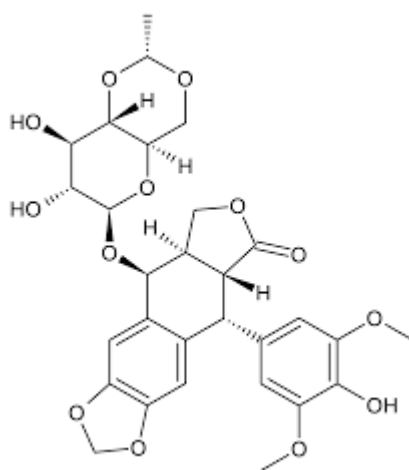


Figura 5. Estructura de etopósido.(O'Dwyer, Jones, Leyland, Alonso, Marsoni, & Wittes, 1985)

El etopósido (Figura 5) actúa como inhibidor de la topoisomerasa II, una enzima nuclear que resuelve diversos problemas topológicos del ADN que surgen en la división celular, tales como transcripción, recombinación-replicación y reparación cromosómica. Entre los problemas asociados a su uso se encuentran mielosupresión, desarrollo de resistencia y baja disponibilidad oral (Morales et al., 2016).

f) Topotecán e Irinotecán

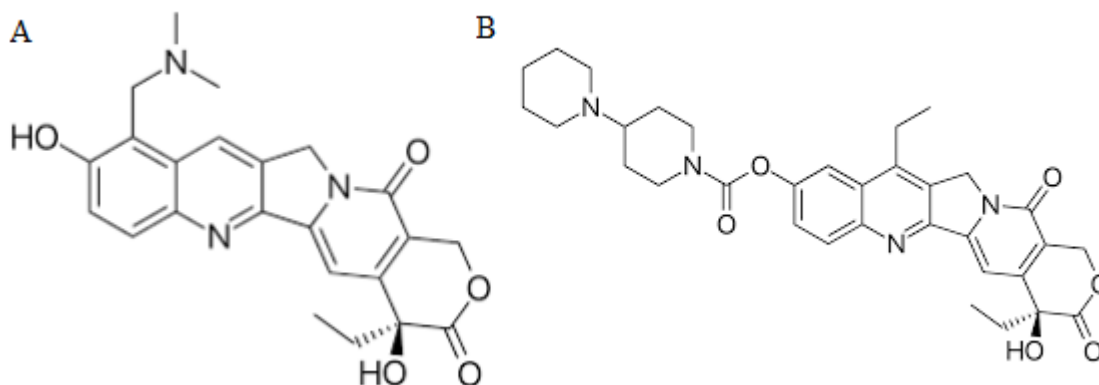


Figura 6. (A) estructura del topotecán. (B) estructura del irinotecán.(Cragg & Newman, 2005)

Son compuestos derivados de la camptotecina (Figura 6), inhibidores de la topoisomerasa I, enzima que tiene un papel importante en la transcripción, replicación y reparación del ADN. Así, la inhibición de esta enzima por los compuestos impide la religación, causando la acumulación de roturas monocatenarias, lesiones que son la causa de la muerte celular por apoptosis. Uno de los inconvenientes al usar éstos fármacos es la aparición de resistencia como resultado de mutaciones en la topoisomerasa I (Alberto, 1997).

2.1.5.3 Radioterapia. La radioterapia torácica es la mejor elección para los pacientes en etapa I, II y III del cáncer de pulmón, que rechazan la cirugía o es imposible realizarla. La desventaja y preocupación de usar este método es que el corazón, esófago y médula espinal que son afectados durante la radiación, por lo cual sufren efectos secundarios. Se presenta inflamación bronquial, esofagitis y radiodermatitis que suelen ser irreversibles. Además, a largo plazo puede aparecer neumonitis, fibrosis pulmonar y radiodermatitis (Resano Barrio & Anta Mejía, 2014).

Las deficiencias presentes en los tratamientos actuales, especialmente en la quimioterapia, lleva a la búsqueda de nuevas moléculas como base para el desarrollo de posibles fármacos que sean más efectivos y den una esperanza de vida a aquellos que padecen este tipo de neoplasia.

2.1.6 Tetrahydroquinolinas. Las tetrahydroquinolinas son moléculas de origen natural o sintético, cuyos derivados presentan un amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas,

entre las cuales se contemplan antimalárica, antitumoral, antioxidante, antimicrobacterial. Actualmente se ha prestado especial interés a las moléculas polifuncionales de quinolina usadas como potenciales agentes anticancerígenos, como aquellas que contienen unidades estructurales semejantes a la combrestatina A4, indanocina, (iso) eugenol y otros análogos que han presentado propiedades anticancerígenas (Muñoz et al., 2012).

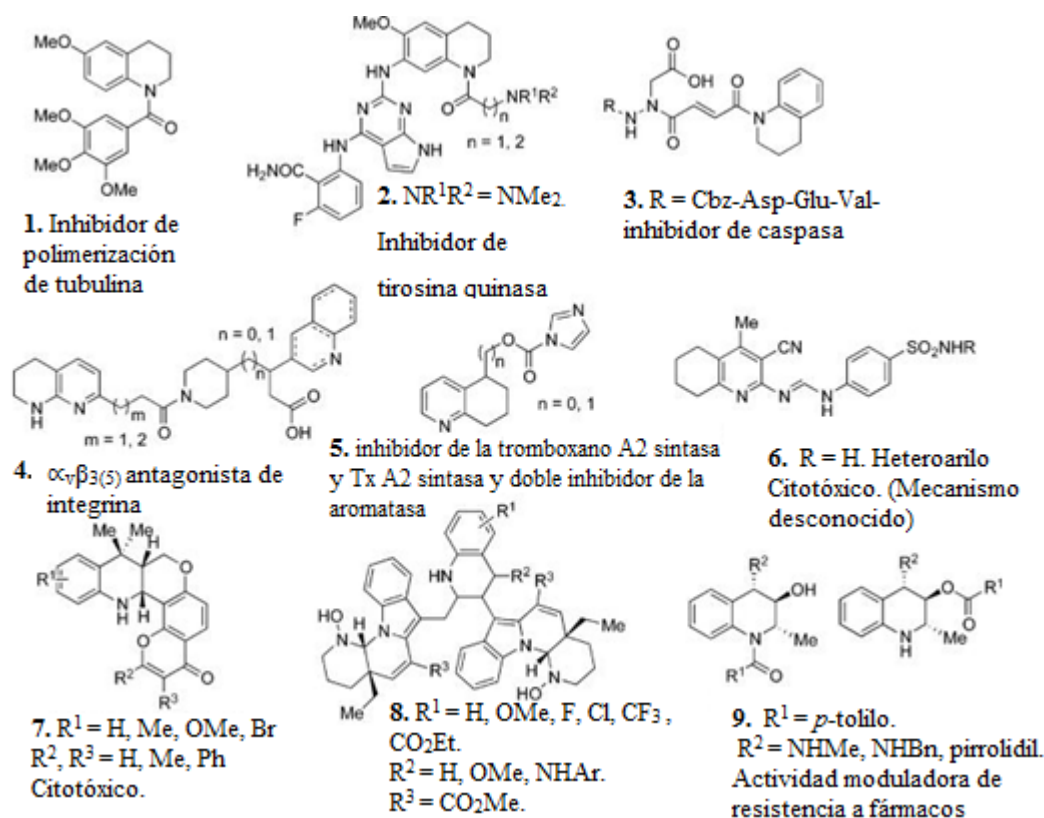


Figura 7. Tetrahidroquinolinas con actividad antitumoral. (Babichev, Kovtunencko, & Tyltin,

1981)

En el caso de la quimioterapia, específicamente, se han encontrado una serie de compuestos como los presentados en la Figura 7, en donde el compuesto 1 tiene actividad citotóxica y actúa como inhibidor de la polimerización de tubulina, el compuesto 2 inhibe la tirosina quinasa IGF-1R, el 3, un inhibidor de las caspasas, el 4 es un antagonista de integrina $\alpha_v\beta_3(5)$ y el 5 inhibe el

tromboxano A₂ sintetasa. Mientras que otros compuestos como el 6-8 han mostrado toxicidad *in vitro*, pero su mecanismo de acción es aún desconocido. Así mismo, se ha reportado que los derivados de la 2-metiltetrahydroquinolina, como el 9 (Figura 7), poseen una actividad moduladora en resistencia a fármacos, la cual es el mayor obstáculo en el uso de éste tratamiento (Babichev et al., 1981).

2.1.7. Isoxazoles. Los isoxazoles son de gran interés para los químicos y farmacólogos ya que son candidatos para el desarrollo de nuevos agentes con actividad biológica variable, debido a que presentan propiedades antimicrobianas, anticonvulsivas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antidepresivas y anticancerígena (Muñoz et al., 2012; Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017)

Dado que la inhibición de la proteína de choque térmico de 90kDa (Hsp90) produce efectos anticancerígenos y sus inhibidores farmacológicos son selectivamente activos contra las células cancerígenas, se ha encontrado una isoxazol amida 10 (Figura 8) cuya capacidad para conectarse en el sitio de unión NH₂ – terminal de la Hsp90 humana, es muy alta, ya que restringe la proliferación de células tumorales mediante apoptosis (Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017).

El compuesto 10 y su análogo 11 también presentaron el mismo mecanismo de unión que la isoxazol amida. Las naftoquinonas e isoquinolinoquinonas fusionadas con isoxazol (13,14) también son capaces de inhibir la actividad de Hsp90; mediante la regulación negativa de la expresión de las proteínas EGFR, Akt, Raf-1 y survivina (Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017).

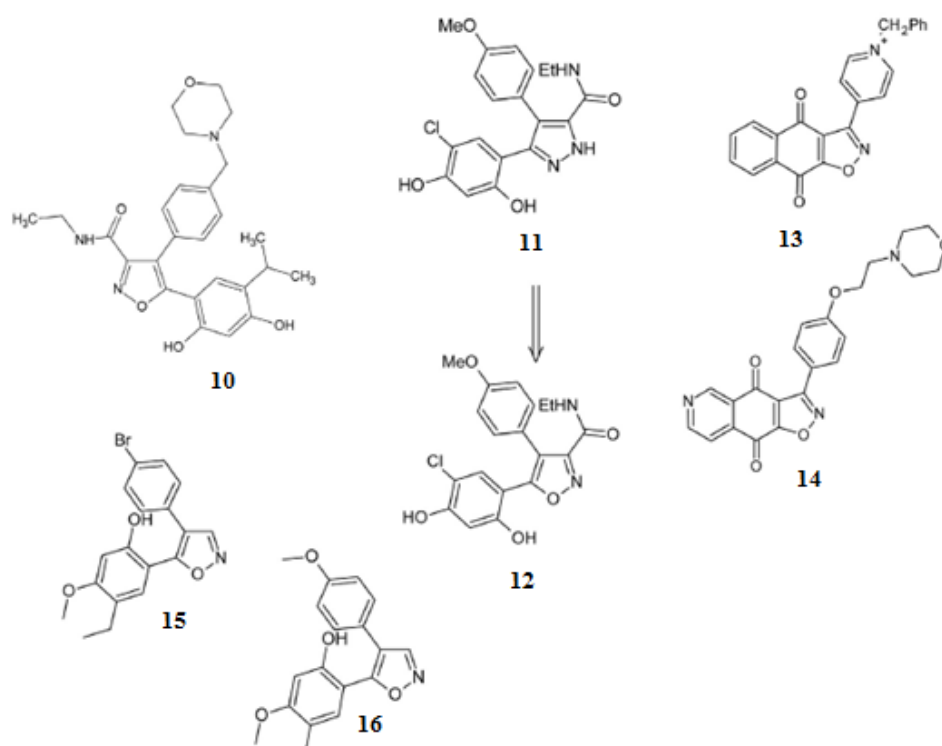


Figura 8. *Compuestos anticancerígenos derivados de isoxazol.*(Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017)

De igual forma, se descubrió que el derivado 15 inhibía la migración e invasión de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (IC₅₀ 50 nM) sin presentar efectos citotóxicos; por lo cual se modificó obteniéndose así el compuesto 16 de actividad similar, demostrándose así la unión de éste a Hsp27 (miembro de la familia Hsp90) responsable del potencial metastásico de las células tumorales (Sysak & Obmińska-Mrukowicz, 2017).

2.1.8 Metabolómica. El término metabolómica se refiere al estudio del perfil de metabolitos asociados a una condición (metaboloma) que puede definirse como la colección de metabolitos de bajo peso molecular de origen exógeno o endógeno. Los metabolitos son los productos finales de todos los procesos que ocurren en las células, y la cantidad de ellos en una enfermedad refleja la adaptación de los sistemas biológicos a los estados patológicos. Se estima que existen más de 2000

metabolitos diferentes que pueden ser sintetizados de manera endógena; igualmente, la dieta integra metabolitos exógenos, como por ejemplo las vitaminas (Avedaño, 2008; Barallobre-Barreiro, Chung, & Mayr, 2013).

Así, el objetivo de la metabolómica es caracterizar el conjunto de moléculas pequeñas de una muestra determinada, evaluar las redes metabólicas en condiciones normales y patológicas, de manera cuantitativa y cualitativa, mediante el uso de diferentes métodos de análisis como la espectrometría de masas (MS), cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) o resonancia magnética nuclear (RMN) (Barallobre-Barreiro et al., 2013).

Gracias a que en 1927 se demostró que el cáncer es principalmente una enfermedad metabólica, en la que las células cancerosas manifiestan un fenotipo metabólico diferente, consumiendo hasta 200 veces más glucosa que las células normales (efecto Warbug) (Wishart, Mandal, Stanislaus, & Ramirez-Gaona, 2016) explorar dicho metaboloma puede ser la manera más eficaz de revelar los cambios fenotípicos en relación con la función biológica de un fármaco. Por esta razón la metabolómica se ha convertido en una de las disciplinas de mayor aporte en la investigación de tan devastadora enfermedad (Armitage & Barbas, 2014).

Dado que en las células tumorales se ven afectadas las rutas metabólicas de la glucólisis y las pentosas fosfato, además de la biosíntesis de proteínas y nucleótidos, el recambio de lípidos y fosfolípidos e incluso el ciclo del ácido cítrico, es un gran desafío para los científicos rastrear información sobre el rol fisiológico o las vías específicas que los metabolitos asociados con el cáncer pueden estar afectando. Es aún más difícil la identificación de los metabolitos a partir de

los respectivos espectros, por lo que es necesario el uso de bases de datos integrales que contienen información referencial actualizada sobre metabolitos, vías metabólicas, biomarcadores, entre otros, que permiten la identificación de compuestos (Wishart et al., 2016).

Actualmente se cuenta con bases de datos como “Human Metabolome Database (HMDB)” que contiene cerca de 42000 entradas de metabolitos, casi 800 rutas metabólicas e información detallada sobre biomarcadores de cáncer, “Golm Database”, “METLIN Database”, “LIPID MAPS” y otras bases de datos espectrales que pueden ser usadas como soporte.(Beger, 2013; Wishart et al., 2016).

Gracias a los alcances de la metabolómica, se han reportado estudios sobre la evaluación de fármacos antitumorales en relación a los niveles de nucleótidos, en dónde se emplea RP-HPLC para una determinación simple, sensible y simultánea de 12 nucleótidos en líneas celulares A549, HepG2, A204, SKOV3 y MCF7 tratadas con epirrubicina, dactinomicina D y daunorrubicina, encontrando así que UTP y ATP eran los mejores biomarcadores (Wang, Liu, Liu, Liu, & Sun, 2015).

También, la metabolómica permite establecer conexiones directas entre datos *in vivo* e *in vitro*, para la caracterización de agentes quimioterapéuticos (Armiñán et al., 2018). Así, se han utilizado perfiles metabólicos basados en RMN para analizar las vías bioquímicas implicadas en la respuesta a un fármaco de antraciclina (Doxorrubicina) y un copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) conjugado (HPMA-Doxorrubicina); sobre un cultivo

celular de adenocarcinoma de mama MCF7, revelando que la conjugación con el polímero reduce la glucólisis y conduce a un aumento de la apoptosis (Armiñán et al., 2018).

Además, mediante el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS), se investigó el mecanismo de toxicidad del compuesto 2,2',4,4'-tetrabromodifenilo éter (BDE-47) en la línea celular MCF7, mostrando que la toxicidad aumentaba en éstas células a medida que a concentración de BDE-47 en el medio excedía 1 μ M; viéndose afectadas mayormente las rutas metabólicas de las purinas y las pirimidinas (Wei et al., 2018).

A su vez, es posible determinar el diagnóstico de diversos tipos de tumores pulmonares basados en los perfiles metabólicos de los ganglios linfáticos; mediante el análisis de aspirados nodales de pacientes con adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y afecciones no malignas utilizando espectrometría de masas (Sappington et al., 2018), permitiendo también la medición de las concentraciones de metabolitos participantes en las rutas de cinarina y glutatión por espectrometría de masas en tándem, donde se demostró que las concentraciones son diferentes para pacientes con y sin enfermedad (Sappington et al., 2018).

Basado en los grandes alcances de la metabolómica, se empleó en el desarrollo del presente proyecto, usando la técnica GC-MS permitiendo así un análisis completo de los perfiles metabólicos en la línea celular A549 al ser tratada con el compuesto THQ-IZ-3J.

2.1.9 Identificación de metabolitos por GC-MS. Para la identificación de los metabolitos de carcinoma pulmonar, se usó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Una técnica de alta sensibilidad, resolución, reproducibilidad y rentabilidad, en donde la muestra generalmente se ioniza por ionización de electrones (EI); lo que proporciona patrones de fragmentación estables y reproducibles que permiten la identificación de metabolitos a través de bibliotecas de compuestos de referencia.(Musharraf, Mazhar, Choudhary, Rizzi, & Atta-ur-Rahman, 2015) Debido a que GC-MS detecta compuestos volátiles, semivolátiles, de bajo peso molecular y térmicamente estables, es necesario la derivatización de la muestra ya que la mayoría de los metabolitos en la naturaleza poseen grupos funcionales polares que no son volátiles y por lo tanto no pueden analizarse directamente por GC-MS (Moros, Chrysovalantou, Gika, Raikos, & Theodoridis, 2017).

La derivatización consiste en alterar químicamente un metabolito, para GC-MS ésta implica reacciones de sililación (reemplazo de un hidrógeno ácido con un grupo alquilsililo), alquilación (transferencia de un grupo alquilo), o acilación (adición de un grupo acilo a un compuesto). El procedimiento más usado es la adición de metoxiamina antes de la sililación, con el fin de proteger los grupos carbonilos de los aldehídos y cetonas en azúcares reductores de los procesos de ciclación (Clarke, 2017; Moros et al., 2017).

Así, es posible identificar una serie de metabolitos relacionados con el adenocarcinoma pulmonar entre los cuales se encuentran la L-metionina, L-isoleucina, L-fenilalanina los cuales son aminoácidos esenciales (Liu, Jin, Gao, Song, & Liu, 2017). La guanosina, un nucleósido purínico

que ejerce funciones de señalización intracelular y extracelular en los procesos fisiológicos (Bettio, Gil-mohapel, & Rodrigues, 2016).

2.2 Metodología

A continuación, se presenta los métodos desarrollados para llevar a cabo la ejecución del proyecto de investigación.

2.2.1 Cultivo celular. La línea celular A549 de cáncer de pulmón fue donada por el laboratorio de oxidaciones biológicas de la Universidad Federal de Paraná, quienes a su vez las obtuvieron comercialmente de la ATCC (del inglés *American Type Culture Collection*).

Las células se cultivaron en botellas de plástico con medio EMEN; que contenían aminoácidos, sales, glucosa, vitaminas y rojo fenol (pH 7,3) suplementado con gentamicina 100 µg/mL y 7% de suero fetal bovino (SFB) inactivado. Se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ para su adherencia, crecimiento y replicación hasta la obtención de la cantidad necesaria para realizar experimentos (Liu et al., 2017).

2.2.2 Preparación de la muestra. Las células fueron plaqueadas en cajas de Petri de 6 cm (3,5x10⁶ células/6mL), las cuales se incubaron durante 24h hasta total adherencia. Se trataron con 25 µM del compuesto híbrido tipo tetrahydroquinolina-isoxazol (THQ-IZ-J3) (Figura 9), manteniendo una concentración de 0,1% DMSO (dimetilsulfóxido, disolvente), seguidamente, se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ por 12 y 24 h (Liu et al., 2017).

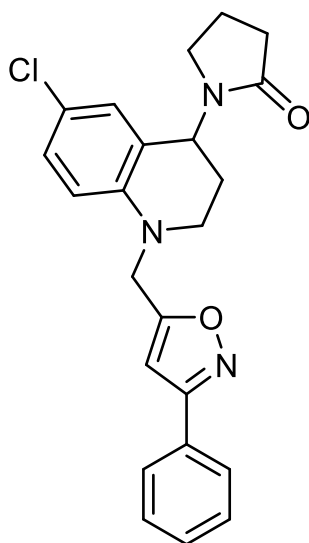


Figura 9. Compuesto híbrido (R/S)-1-(6-cloro-1-((3-fenilisoxazol-5-il)-metil)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il) pirrolidin-2-ona. (THQ-IZ-J3). Fuente: Autor

Posterior a la incubación los cultivos celulares fueron utilizados para la extracción de metabolitos celulares. Las cajas Petri se mantuvieron en un baño de hielo, se retiró el medio y se almacenó a -20 °C, se lavaron dos veces con 2mL de agua tipo I, se adicionó 1mL de solución que contenía Metanol 20 % y 10 µg/mL de adonitol (Cala, Aldana, & Medina, 2018).

Las células fueron removidas mediante raspado, las suspensiones celulares se almacenaron en crioviales para realizar la lisis mediante choque térmico y ultrasonido, para lo cual se sumergieron en nitrógeno líquido, se descongelaron y se sonicaron en baño de hielo por 1 min; este procedimiento se repitió 3 veces. Los residuos celulares fueron removidos por centrifugación (14000 x g, 4 °C, 8 min) y el sobrenadante, conteniendo los metabolitos, se almacenó a -20°C para su posterior análisis (Cala et al., 2018).

Además, se preparó un control de calidad (QC) a partir de volúmenes iguales de todos los tratamientos y controles.

2.2.3 Derivatización. La metodología empleada fue la reportada por (Garcia & Barbas, 2011). Se tomaron 180 μL de extracto metabólico y se liofilizaron en un equipo con serpentín de enfriamiento por 24 h a -79°C y $-0,200$ mbar, se adicionaron 20 μL de metoxiamina (15 mg/mL piridina), se agitó en vórtex por 30 s y se mantuvo durante 16h en oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó la sililación con 20 μL de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSFTA) conteniendo 1% TMCS como catalizador, se agitó en vórtex por 20 s y mantuvo a 70°C por 1 h; posterior a ello se dejó a temperatura ambiente durante 20 min y se adicionó 60 μL de C18 a 20 ppm (preparado en *n*-heptano) como estándar interno, se agitó en vórtex por 15 s (Cala et al., 2018).

2.2.4 Análisis por GC-MS. El análisis metabólico por GC-MS fue realizado de acuerdo a lo reportado por (Cala et al., 2018), Se inyectó 2 μL de la muestra derivatizada al equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas HP 6898 Series equipado con un inyector automático HP 6890 y un detector de masas Agilent 5973. Se utilizó una columna capilar Zebron ZB-5MSi (30m x 0,25mm x0,25); usando helio como gas de arrastre con un flujo constante de 1,0mL/min. La temperatura del inyector fue de 250°C , radio Split 1:10. El gradiente de temperatura inició en 60°C durante 1 min, seguidamente se aumentó la temperatura hasta 320°C a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La temperatura de la línea de transferencia, la fuente de filamento y el cuadrupolo fue de 280, 230 y 150°C , respectivamente. La energía de ionización de la fuente

fue de 70 eV y el espectrómetro de masa fue operado en modo *full scan* aplicando un rango de masa desde m/z 50 a 600.

2.2.5 Procesamiento de datos. El tratamiento de los datos (deconvolución e identificación de metabolitos) se realizó con el software Agilent MassHunter Unknowns Analysis B.07.00, Fiehn versión 2008 y 14 librerías NIST. Para el posterior alineamiento del tiempo de retención se usó el software Agilent Mass Profiler Professional B.12.1, y los resultados fueron exportados a Agilent MassHunter Quantitative B.07.00 para realizar la integración de cada metabolito. El alineamiento y la integración se comprobó manualmente mediante Excel para filtrar por presencia y reproducibilidad, manteniendo aquellos metabolitos detectados en la mayoría de las muestras y con un coeficiente de variación de menos del 30% del mismo metabolito detectado en los QC.

2.2.6 Identificación de Metabolitos. La identificación de los metabolitos obtenidos mediante GC-MS se realizó usando la librería de Fiehn versión 2008 y NIST. La construcción de las posibles vías metabólicas alteradas se realizó usando MetaboAnalyst 4.0. y BioRender.

2.2.7 Estadística. Se empleó el software libre MetaboAnalyst 4.0 para realizar la normalización de los datos con respecto al estándar interno (adonitol); posteriormente se transformaron los datos a escala logarítmica y auto scaling tanto para el grupo control como el tratamiento, con el fin de cumplir los supuestos estadísticos. Así mismo, se determinó el *t-test*, la variable “veces de cambio (o en inglés, Fold Change-FC)” y el análisis de componentes principales (PCA).

Mediante el análisis *t-test* se determinó la variación de los grupos control vs tratamiento; el cual se expresa con el *p*-valor. Así, los metabolitos con un *p*-valor < 0.05 fueron considerados

estadísticamente significativos. De igual manera, el cálculo de Fold Change (FC) permitió tener una medida cuantitativa en cuanto a la sobreexpresión o inhibición de los metabolitos.

2.3 Resultados y discusión.

La concentración empleada del compuesto THQ-IZ-J3 fue de 25 μM , tanto para los ensayos de 12 h, como los de 24h. Esta concentración fue definida a partir de una investigación anterior realizada por el grupo de investigación GIBIM (Güiza et al., 2019). Así, mediante ensayos de viabilidad se determinó que el híbrido molecular THQ-IZ-J3 es citotóxico a partir de la concentración de 25 μM en células de cáncer de pulmón (A549) con ~92% de viabilidad en 12 horas de tratamiento, ~79% de viabilidad en 24 horas de tratamiento y ~42% de viabilidad en 48 horas de tratamiento, como se observa en la figura 10.

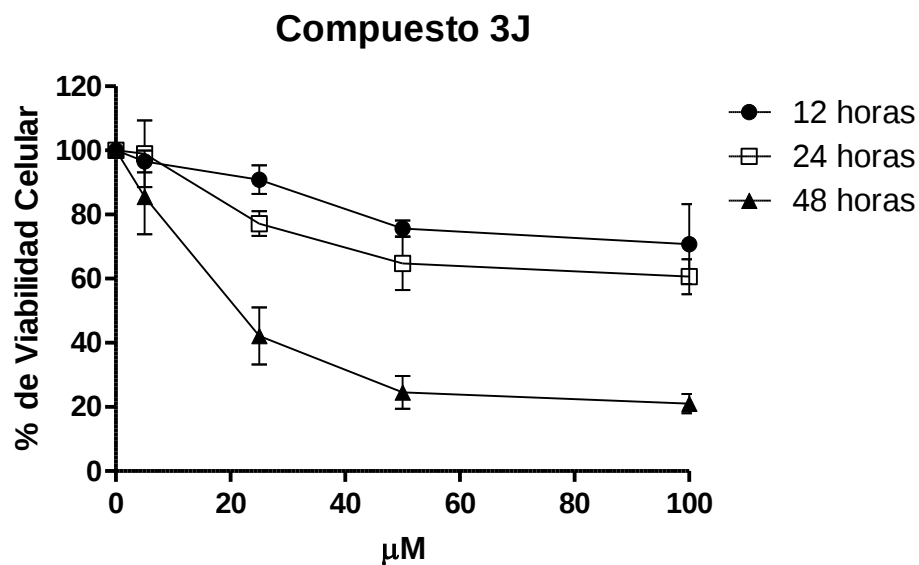


Figura 10. Efecto del compuesto THQ-IZ-J3 sobre la viabilidad de células A549 (Güiza et al., 2019).

2.3.1 Análisis de las alteraciones metabólicas en la línea celular A549 durante 12 horas de interacción con el compuesto THQ-IZ-J3.

Los perfiles metabólicos de los extractos obtenidos de la línea celular A549 tratadas a una concentración de 25 μ M de THQ-IZ-J3 durante 12 horas, se analizaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Una vez realizada la respectiva deconvolución, alineamiento e identificación de los datos, se realizaron los análisis estadísticos mediante el software MetaboAnalyst 4.0 con el fin de determinar los metabolitos que fueron estadísticamente significativos, así como su tasa de cambio con respecto al control (Fold Change) y el análisis de componentes principales (PCA), para finalmente determinar las posibles rutas metabólicas alteradas.

2.3.1.1 identificación y análisis estadísticos de los metabolitos obtenidos en el tratamiento de 12 horas. En la Figura 11 se observa el perfil químico del grupo control, y grupo tratamiento. La identificación de cada uno de los metabolitos se realizó mediante la comparación de cada uno de los espectros de masas obtenidos versus los espectros de la base de datos NIST (La cual proporciona un porcentaje de similitud entre las diferentes moléculas).

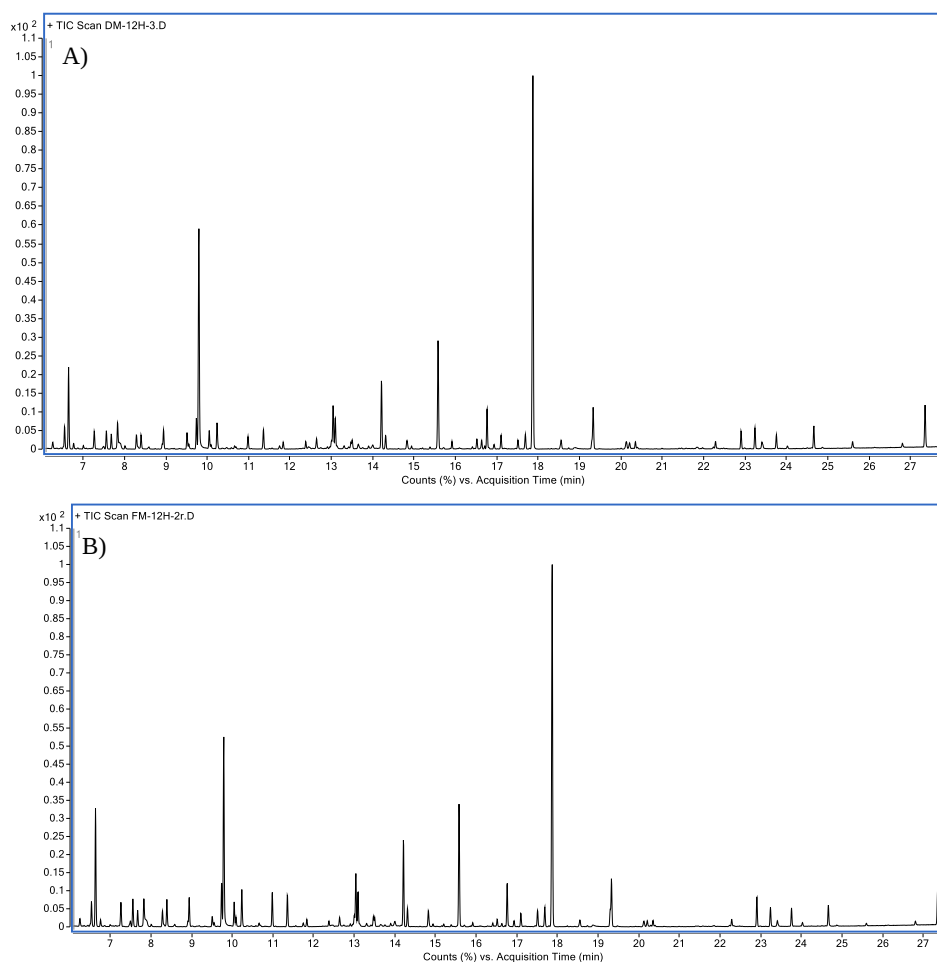


Figura 11. Perfil químico de los extractos metanólicos de la línea celular A549. A) grupo control y B) grupo tratamiento expuesto durante 12 horas al compuesto THQ-IZ-J3.

En la Figura 12, se muestra la comparación del espectro del ácido cítrico obtenido experimentalmente (rojo) vs el espectro de la base de datos NIST (azul), con un porcentaje de probabilidad del 85.9%.

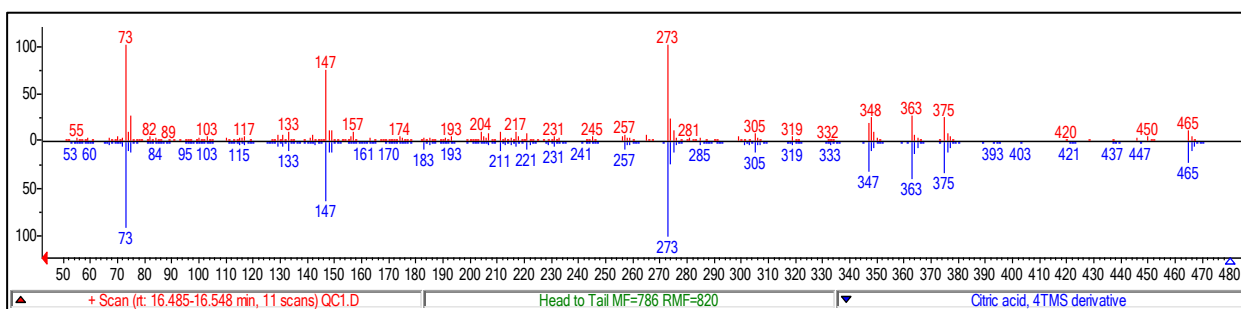


Figura 12. Espectro de masas experimental del ácido cítrico derivatizado (rojo) vs espectro de masas teórico del ácido cítrico derivatizado (azul).

Lo anterior se reporta en la sección de anexos para los metabolitos estadísticamente significativos.

En la Tabla 1 se reportan los porcentajes de probabilidad, p -valor y tasa de cambio (fold change, FC) en relación tratamiento vs control. Los valores de FC menores a 1.0 indican una inhibición del metabolito respecto al grupo control, mientras que un valor mayor a 1.0 indica una sobreexpresión del metabolito con respecto al control. Para los p -valores menores a 0.05 se consideraron datos estadísticamente significativos.

Tabla 1.

Datos estadísticos y porcentaje de probabilidad para cada uno de metabolitos con p -valor menor a 0,05

Metabolito	Tiempo de retención (min)	p -valor	% probabilidad	Fold change (FC)
Ácido fosfórico	9.806	0.0093	90.5	0.76597 ↓
Leucina	8.009	0.0281	60.5	0.37037 ↓

Ácido málico	12.046	0.0299	80.6	0.66334 ↓
Alanina	11.840	0.0375	96.2	0.56137 ↓
Valina	6.996	0.0381	92.4	0.40618 ↓
Isoleucina	8.315	0.0394	68.7	0.26906 ↓
Ácido cítrico	16.520	0.0472	85.9	0.58051 ↓

Nota: FC: fold change. ↑: metabolito sobreexpresado en relación con el control. ↓: metabolito inhibido respecto al control (sin THQ-IZ-J3).

En la Figura 13, se puede observar mediante el análisis de componentes principales, una separación significativa del grupo control vs tratamiento; con una varianza explicada del 42% para el componente principal 1 (PC1) y de 29.8% para el componente principal 2 (PC2).

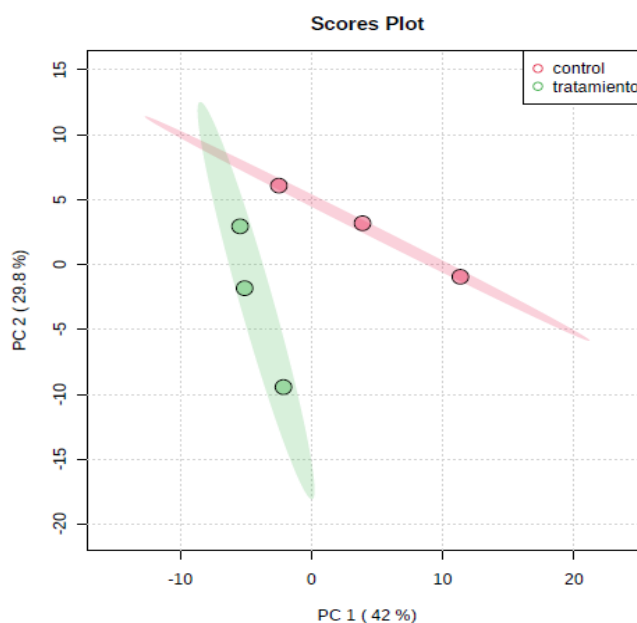


Figura 13. Análisis de componentes principales PCA. Muestras control (rojo) vs tratamiento (verde).

Los datos obtenidos anteriormente sugieren una diferencia entre el grupo control y grupo tratamiento, posiblemente siendo una alteración en la concentración de cada uno de los analitos del grupo tratamiento.

2.3.2 Análisis de las rutas metabólicas alteradas en la línea celular A549 durante 12 horas de interacción con el compuesto THQ-IZ-J3.

Durante este periodo, se encontraron posibles alteraciones en la glicólisis, el ciclo del ácido cítrico y la ruta de las pentosas fosfato representadas en la figura 14, en donde todos los metabolitos relacionados se encuentran inhibidos con relación al grupo control.

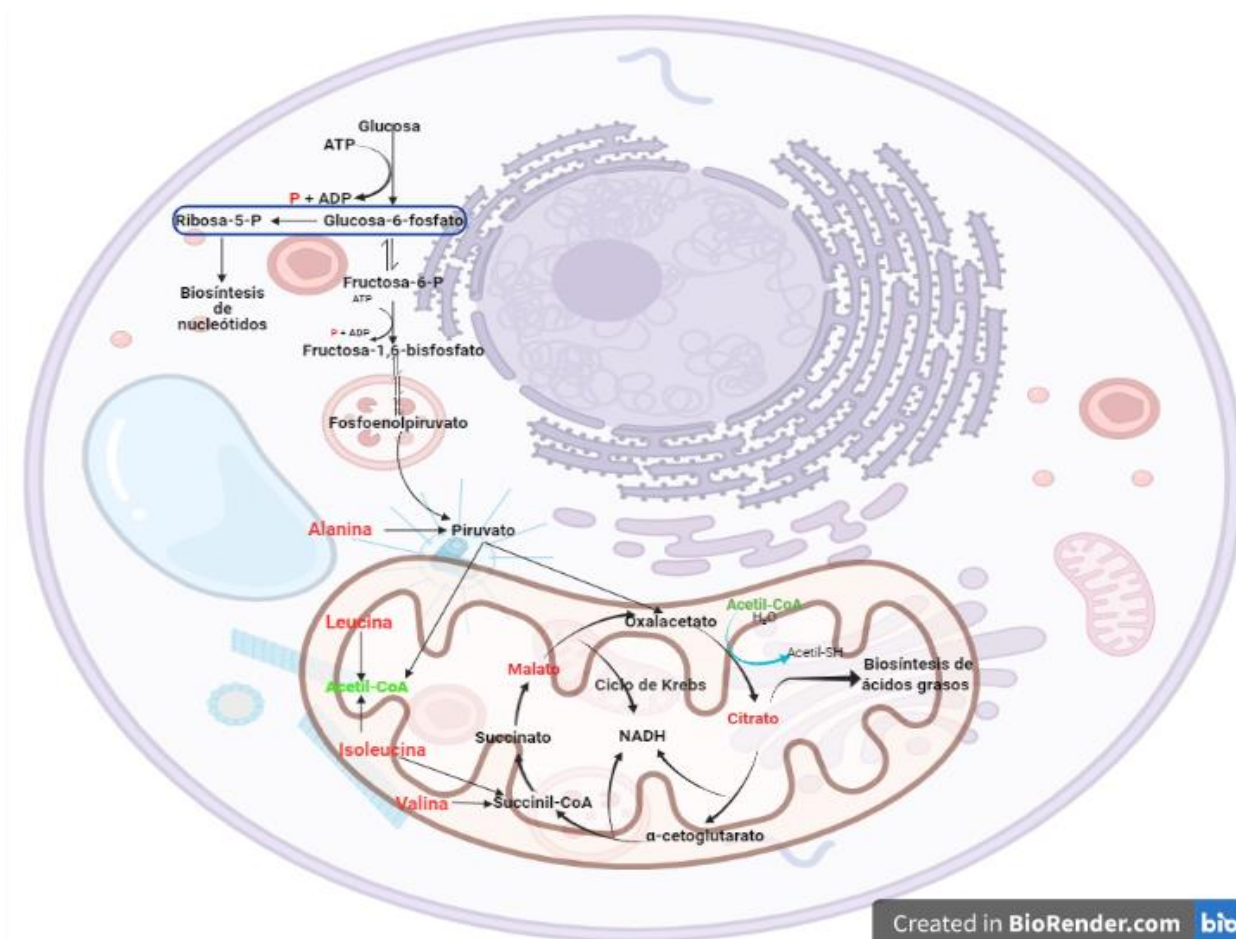
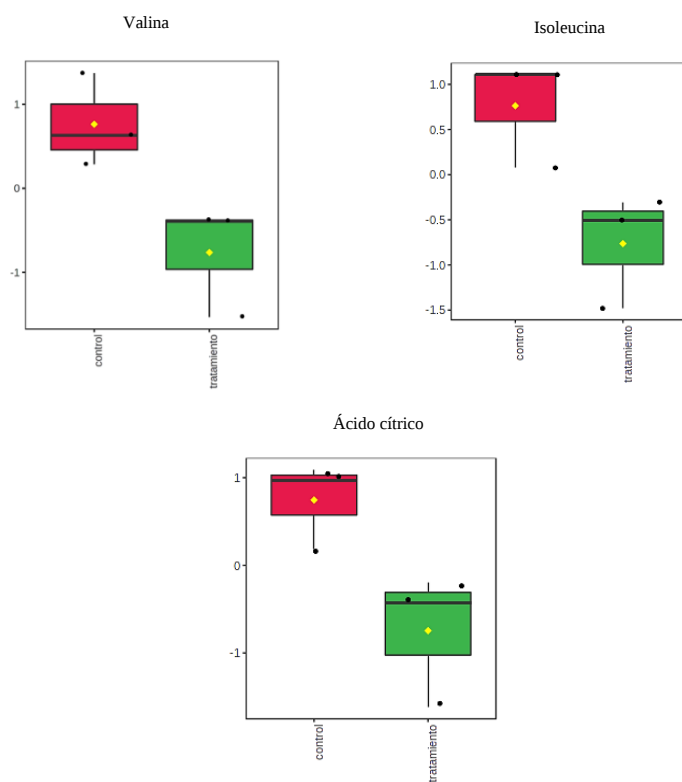


Figura 14. Posibles rutas metabólicas alteradas en la línea celular A549 durante 12 horas de interacción con el compuesto THQ-IZ-J3. Los metabolitos resaltados en rojo representan aquellos que se encontraron disminuidos con relación al grupo control.

La incontrolable proliferación celular es una de las principales características del cáncer y las células A549 no son la excepción. Así, las células cancerígenas de pulmón necesitan mayor energía para realizar dichos procesos de proliferación (Yu, Li, & Zhang, 2017); por lo tanto, deben alterar la ruta de la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico. En los resultados obtenidos, se evidencian bajas concentraciones de malato y citrato, sugiriendo inhibición del ciclo del ácido cítrico. Adicionalmente, se evidencia disminución de la concentración de alanina, leucina, isoleucina y valina (figura 14), sugiriendo que las rutas anapleróticas fueron activadas en un intento mantener la producción de energía. Por ello, los aminoácidos actúan como precursores del ciclo de Krebs, en donde la alanina se degrada a piruvato, la leucina a Acetil-CoA, la isoleucina y valina en Succinil-CoA; para la obtención de energía a partir del ciclo de Krebs (Callejón-leblic, García-barrera, & Pereira-vega, 2019).

En la literatura se reporta que las células de cáncer de pulmón promueven la síntesis de ácidos grasos a partir del citrato y nucleótidos a partir de la ruta de las pentosas fosfato, garantizando la proliferación de las células. (Yu et al., 2017), (Namikawa-kanai, Miyazaki, Matsubara, Shigefuku, & Ono, 2020), (Chen et al., 2014). Aunque no se evidenció inhibición de la expresión de metabolitos relacionados con la ruta de las pentosas fosfato después del tratamiento con THQ-IZ-J3, sí se observó inhibición del fosfato (ácido fosfórico) lo cual podría ocasionar una

sobreexpresión de ATP sugiriendo de esta manera una inhibición de la glicólisis generando de igual manera una posible inhibición de la ruta de las pentosas fosfato (Lunt & Heiden, 2011).



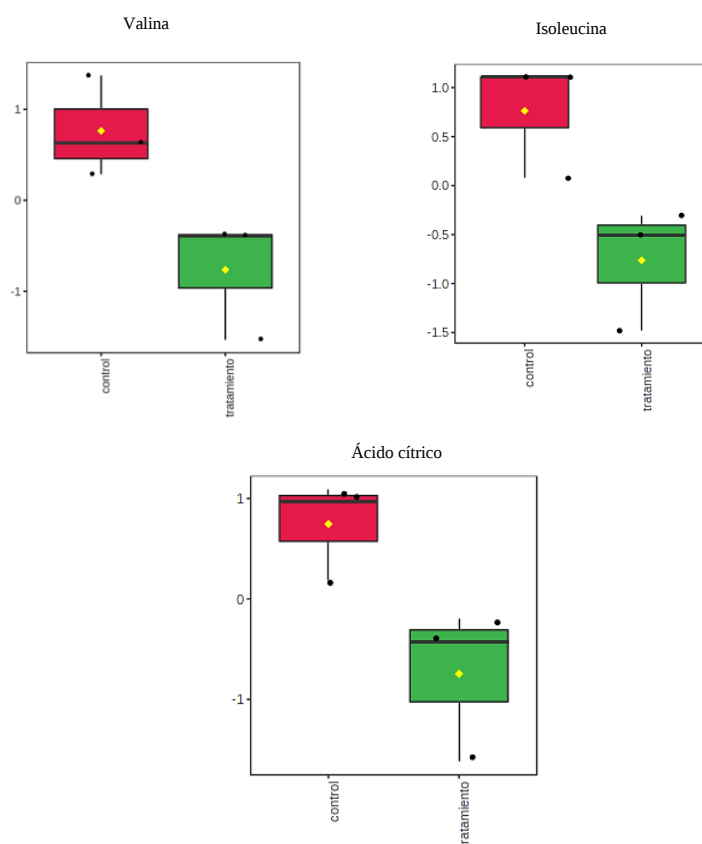


Figura 15. Representación gráfica de la alteración de los metabolitos estadísticamente significativos con relación al grupo control.

Así, los resultados sugieren que el compuesto *THQ-IZ-J3* induce inhibición de la vía glucolítica, la biosíntesis de ácidos grasos, la biosíntesis de nucleótidos y la producción de ATP por fosforilación oxidativa en células A549 después de 12 horas de tratamiento.

2.3.3 Análisis de las alteraciones metabólicas en la línea celular A549 durante 24 horas de interacción con el compuesto *THQ-IZ-J3*.

Los perfiles metabólicos de los extractos obtenidos de la línea celular A549 tratadas a una concentración de 25 μM de *THQ-IZ-J3* durante 24 horas, se realizó por cromatografía de gases

acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). El proceso de datos se realizó de acuerdo con el mencionado en la sección 2.3.1.

2.3.3.1 identificación y análisis estadístico de los datos obtenidos durante el periodo de 24 horas de exposición al compuesto THQ-IZ-J3. En la Figura 16 se observa el perfil químico del grupo control, y grupo tratamiento. La identificación de cada uno de los metabolitos se realizó mediante la comparación de cada uno de los espectros de masas obtenidos versus los espectros de la base de datos NIST.

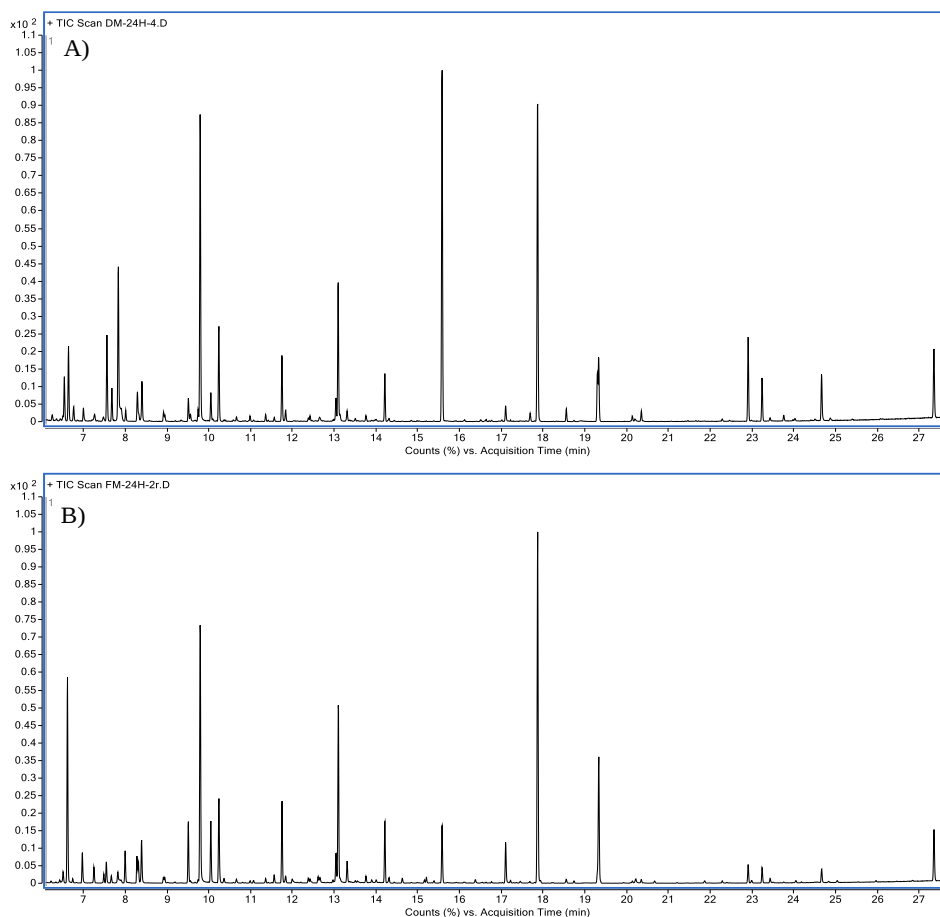


Figura 16. Perfil químico del extracto metabólico en la línea celular A549. A) grupo control y B) grupo tratamiento, expuesto durante 24 horas al compuesto THQ-IZ-J3.

En este análisis también se obtiene un porcentaje de probabilidad de semejanza entre los compuestos, y se compara el espectro obtenido en los análisis de los extractos metabólicos vs el encontrado en la base de datos.

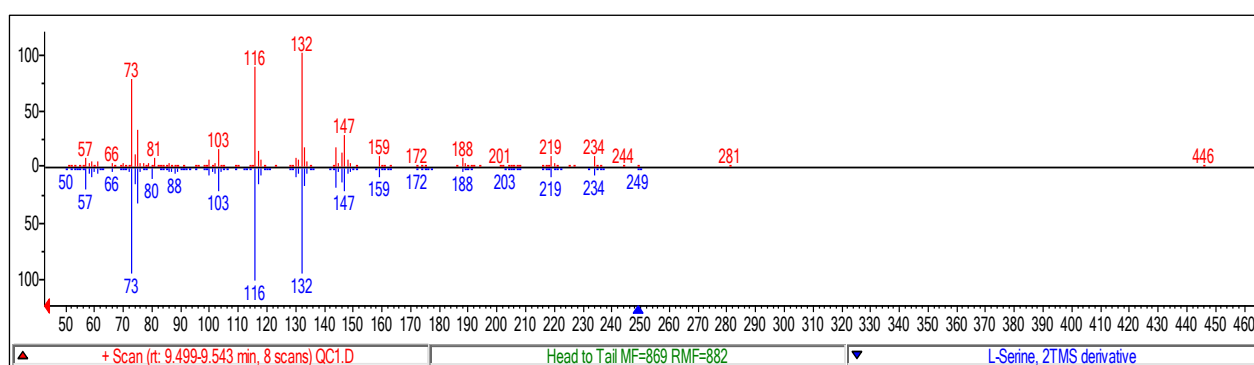


Figura 17. Espectro de masas experimental de la L-serina (rojo) vs espectro de masas teórico L-serina (azul).

En la Figura 17, se muestra la comparación entre la L-serina presente en los extractos celulares (rojo) vs el reportado en la base de datos (azul), con un porcentaje de probabilidad del 96,6%. Recordando, que dicho porcentaje de probabilidad se realiza entre metabolitos derivatizados.

En la Tabla 2 se reportan los porcentajes de probabilidad, *p*-valor y tasa de cambio (fold change) en relación tratamiento vs control. El procesamiento de datos se realizó de acuerdo con el mencionado en la sección 2.3.1.1

Tabla 2.

Datos estadísticos y porcentaje de probabilidad para cada uno de los metabolitos significativos a 24h.

Metabolito	Tiempo de retención	<i>p</i> -valor	% probabilidad	FC
Adenina	16.936	0.0094	95.3	0.044933 ↓
Ornitina	16.464	0.0116	90.5	0.038841 ↓
Cisteína	13.476	0.0126	58.4	0.03552 ↓
Prolina	10.102	0.0127	91.8	0.042236 ↓
Serina	10.989	0.0163	96.6	0.023517 ↓
Hipoxantina	16.288	0.0209	80.6	0.038202 ↓
Leucina	9.747	0.0211	68.7	0.044431 ↓
Treonina	11.361	0.0304	96.0	0.041861 ↓
Valina	8.947	0.0351	92.4	0.048951 ↓
Metionina	13.005	0.0363	87.9	0.031141 ↓
Isoleucina	10.034	0.0380	68.7	0.046239 ↓

Nota: FC: fold change. ↑: metabolito sobreexpresado con relación al control. ↓: metabolito inhibido respecto al control (sin THQ-IZ-J3).

En la Figura 17, se presenta el score plot, en donde se observa una separación significativa del grupo control vs tratamiento; con una varianza del 80.4% para el componente principal 1 (PC1) y de 8.2 % para el componente principal 2 (PC2).

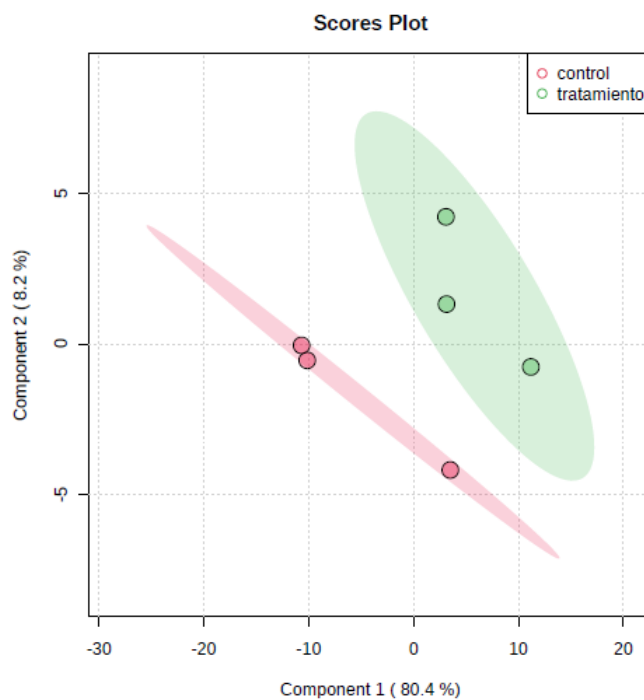


Figura 18. Análisis de componentes principales (PCA) del perfil químico de los extractos metabólicos en muestras control 24h (rojo) vs tratamiento 24h (verde).

Por lo cual, se deduce una posible alteración o inhibición de los metabolitos implicado con respecto al grupo control.

2.3.4 Análisis de las rutas metabólicas alteradas en la línea celular A549 durante 24 horas de interacción con el compuesto THQ-IZ-J3.

En la Figura 19 se observan las posibles rutas metabólicas alteradas durante este periodo de tratamiento, en donde los metabolitos observados se representan en rojo.

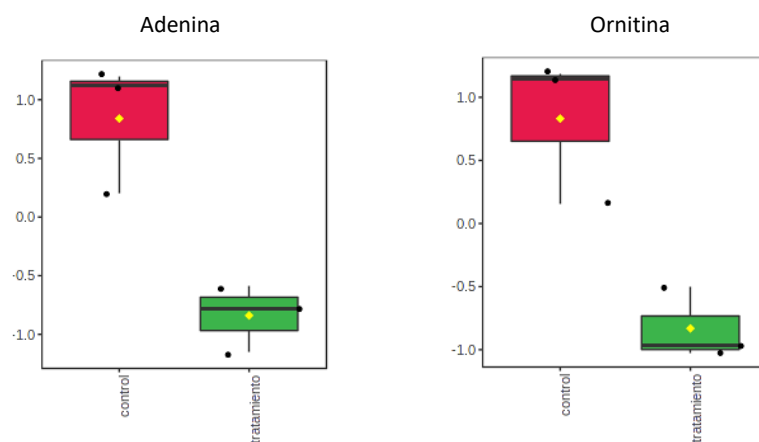


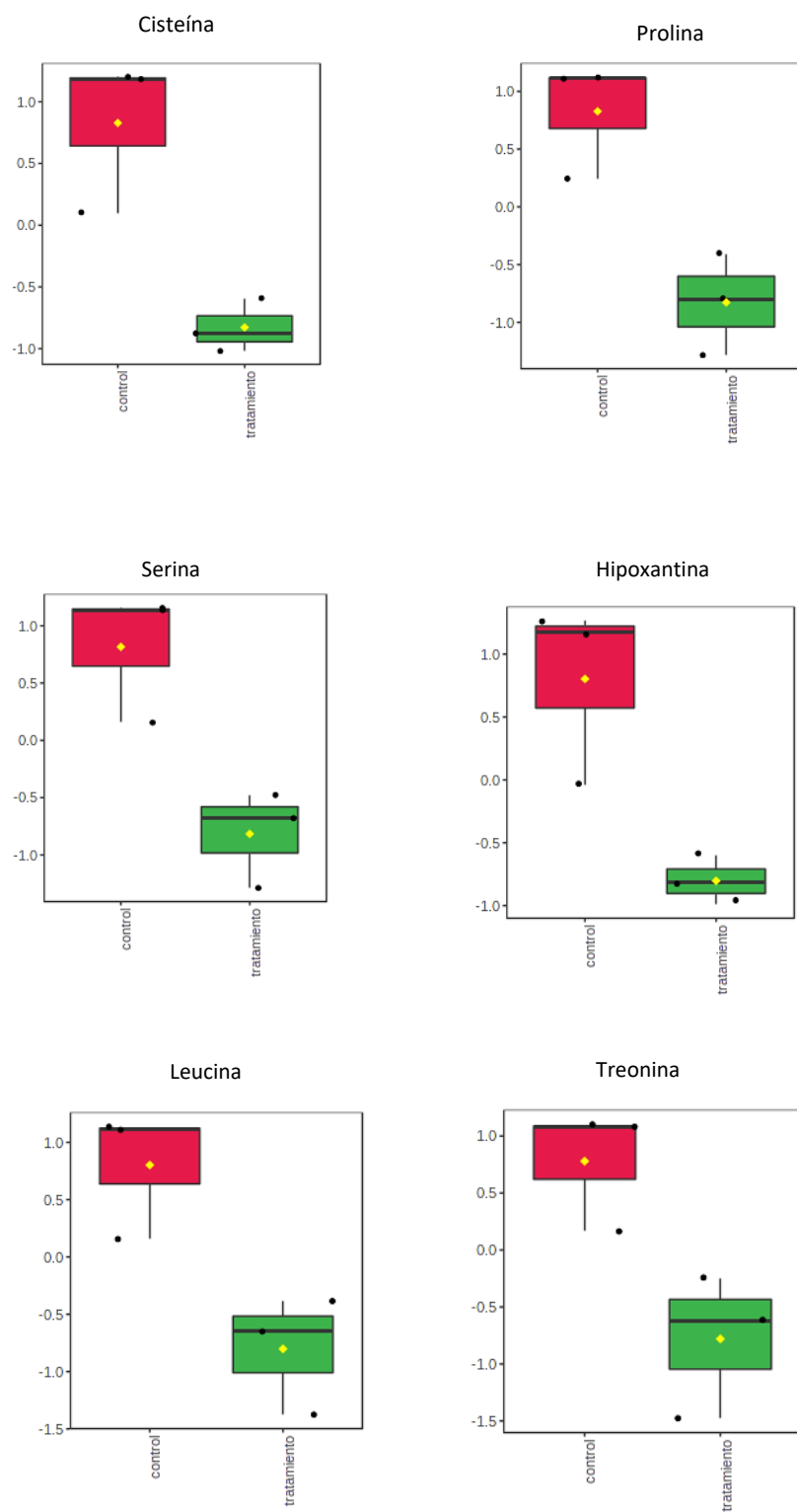
Las células cancerígenas de pulmón necesitan de fuentes de energía adicionales para garantizar su supervivencia y replicación, dependiendo principalmente de la glicólisis (Namikawa-kanai et al., 2020) y de la producción de energía mediante el ciclo de Krebs (Lieu, Nguyen, Rhyne, & Kim, 2020). El ciclo de Krebs puede producir energía mediante reacciones anapleróticas, proporcionando intermediarios como Succinil-CoA (a partir de isoleucina, valina, metionina),

Las células cancerígenas de pulmón necesitan de fuentes de energía adicionales para garantizar su supervivencia y replicación, dependiendo principalmente de la glicólisis (Namikawa-kanai et al., 2020) y de la producción de energía mediante el ciclo de Krebs (Lieu, Nguyen, Rhyne, & Kim, 2020). El ciclo de Krebs puede producir energía mediante reacciones anapleróticas, proporcionando intermediarios como Succinil-CoA (a partir de isoleucina, valina, metionina),

Acetil-CoA (a partir de leucina), α -cetoglutarato (a partir de prolina) y piruvato (a partir de cisteína, serina y treonina) (Lieu et al., 2020; Nambiar, How, Gummer, & Trengove, 2019). Garantizando el funcionamiento continuo del ciclo del ácido cítrico permitiendo posiblemente la biosíntesis de ácidos grasos a partir del citrato (Selwan & Edinger, 2017).

Sin embargo, a pesar del intento de las células A549 por mantener la producción de energía, los resultados obtenidos indican una inhibición de aminoácidos lo que sugiere una inhibición del ciclo de Krebs, de la biosíntesis de ácidos grasos y una posible inhibición en la ruta de las pentosas fosfato ya que la adenina e hipoxantina, metabolitos producto de la ruta de las pentosas fosfato se encontraron inhibidos.





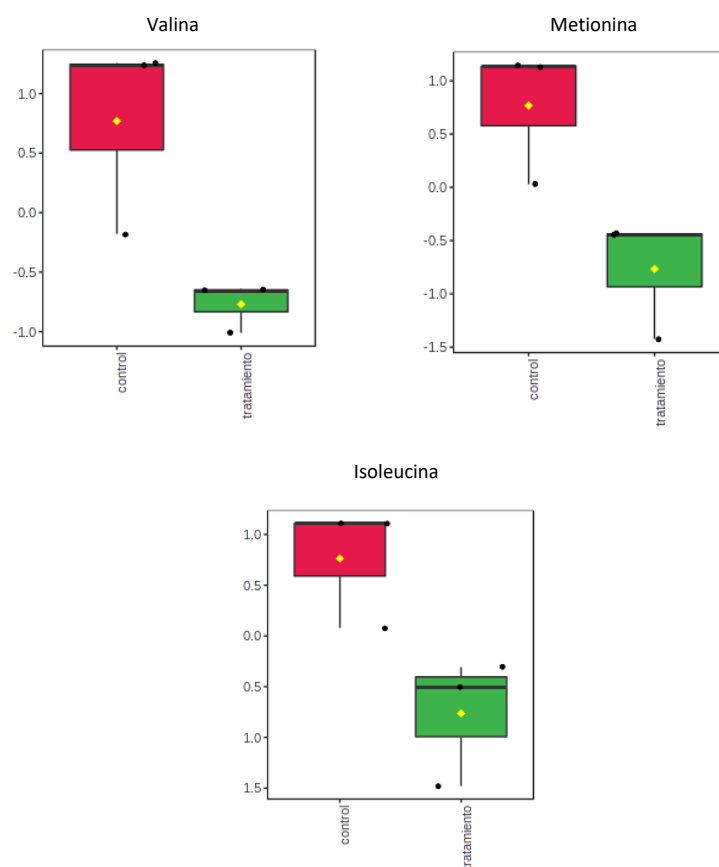


Figura 20. Representación gráfica de la alteración de los metabolitos estadísticamente significativos con relación al grupo control

Los metao

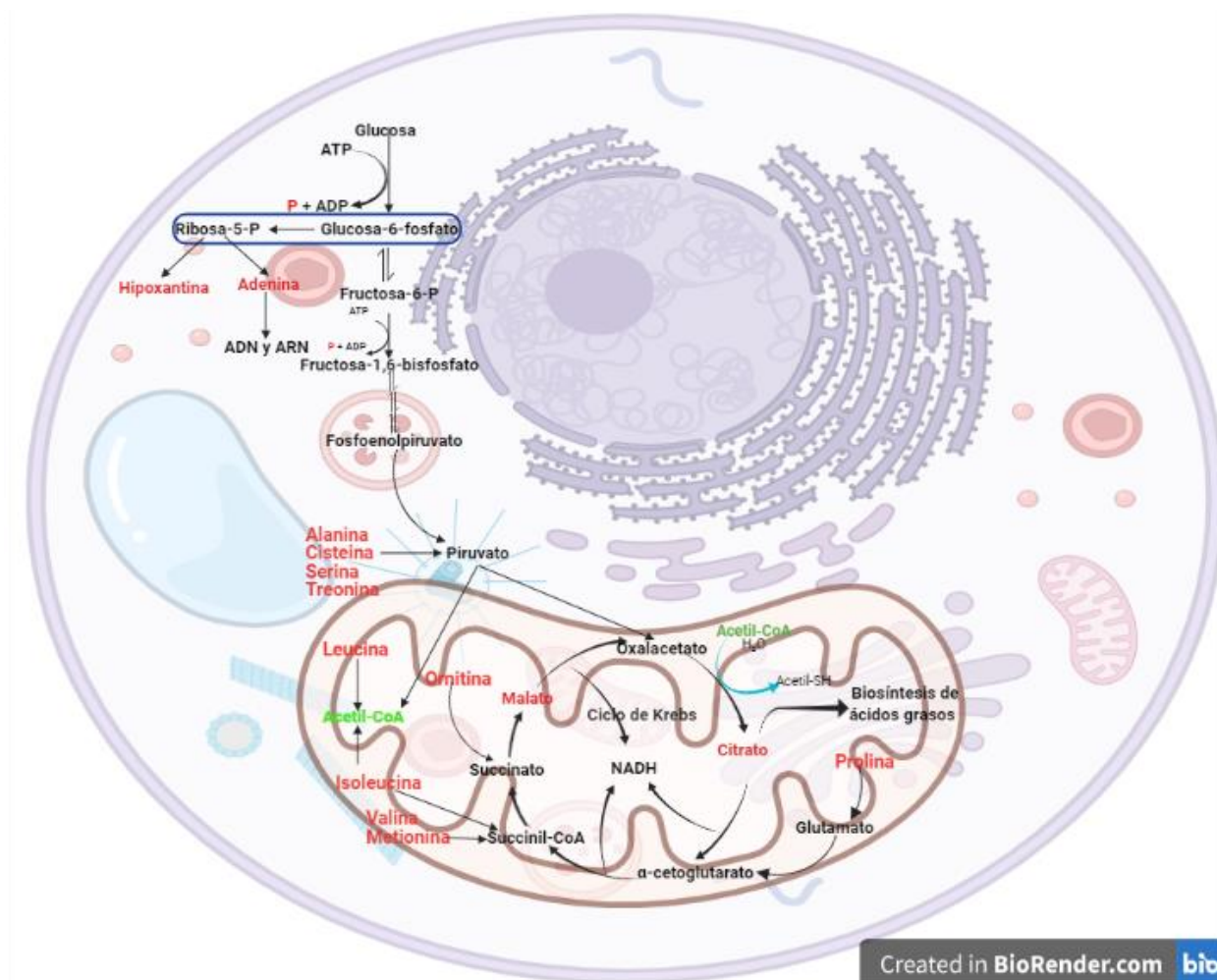


Figura 211. Posibles rutas metabólicas alteradas en la línea celular A549 durante 12 y 24 horas de su interacción con el compuesto THQ-IZ-J3. Los metabolitos en rojo significan inhibición respecto al control.

Así, los resultados obtenidos para el tratamiento de 24 horas respaldan los obtenidos en el tratamiento de 12 horas, donde posiblemente iniciaría el proceso de inhibición metabólica. Por ende, en la Figura 21 se muestra de manera general la posible alteración metabólica causada por el compuesto THQ-IZ-J3 en las células A549 de cáncer de pulmón.

4. Conclusiones

- ✓ La interacción de la línea celular A549 con el compuesto THQ-IZ-J3 (en los tratamientos de 12 y 24 horas), presentó alteraciones en diversos metabolitos relacionados con las principales rutas metabólicas responsables de la supervivencia y proliferación celular como la glicólisis, ruta de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs.
- ✓ Los principales metabolitos alterados en el tratamiento de 12 horas fueron: leucina, valina, alanina, isoleucina, ácido cítrico y malato. Posiblemente, estos se encuentran involucrados en el ciclo del ácido cítrico mediante reacciones anapleróticas, al igual que la glicólisis, la cual puede afectarse por la disminución del ácido fosfórico, sustrato importante para la síntesis de ATP. Todo lo anterior, conduciría probablemente a una disminución en la producción de energía, inhibiendo la proliferación celular.
- ✓ Los metabolitos identificados en el tratamiento de 24 horas, tales como, metionina, treonina, serina, prolina, ornitina, cisteína, adenina e hipoxantina; permitieron dilucidar de igual manera una posible inhibición de la proliferación celular, mediante la alteración de la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo del ácido cítrico.
- ✓ El compuesto THQ-IZ-J3 alteró el metabolismo de la línea celular A549, mediante una inhibición de los metabolitos precursores de los intermediarios del ciclo de Krebs,

glicólisis y ruta de las pentosas fosfato, minimizando así el intento de la célula por mantener activa su incontrolable proliferación celular.

Referencias Bibliográficas

- Alberto, M. (1997). *Cáncer: Genes y Nuevas Terapias* (2da ed.). Madrid: Hélice.
- Andersen, A., Warren, D. J., Brunsvig, P. F., Aamdal, S., Kristensen, G. B., & Olsen, H. (2006). High sensitivity assays for docetaxel and paclitaxel in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV detection. *BMC Clinical Pharmacology*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1472-6904-6-2>
- Aranda, F. I., Alenda, C., Peiró, F. M., & Peiró, G. (2003). Tumores neuroendocrinos pulmonares. *ESP PATOL*, 36(7), 389–404.
- Armiñán, A., Palomino-Schätzlein, M., Deladriere, C., Arroyo-Crespo, J. J., Vicente-Ruiz, S., Vicent, M. J., & Pineda-Lucena, A. (2018). Metabolomics facilitates the discrimination of the specific anti-cancer effects of free- and polymer-conjugated doxorubicin in breast cancer models. *Biomaterials*, 162(18), 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.015>
- Armitage, E. G., & Barbas, C. (2014). Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.041>
- Avedaño, L. H. (2008). *Nefrología Clínica* (3a ed.). España: Medica Panamericana.
- Babichev, F. S., Kovtunenkov, V. A., & Tyltin, A. K. (1981). Advances in the Chemistry of Isoindole. *Russian Chemical Reviews*, 50(11), 1087–1103. <https://doi.org/10.1070/RC1981v050n11ABEH002738>
- Bamji-stocke, S., Berkel, V. Van, Miller, D. M., Frieboes, H. B., Surgery, T., & Brown, G. (2019). HHS Public Access. *Springer Nature*, 14(6), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1376-2.A>

- Barallobre-Barreiro, J., Chung, Y. L., & Mayr, M. (2013). La proteómica y la metabolómica: los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Revista Espanola de Cardiologia*, 66(8), 657–661. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2013.04.010>
- Beger, R. (2013). A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. *Metabolites*, 3(3), 552–574. <https://doi.org/10.3390/metabo3030552>
- Bettio, L. E. B., Gil-mohapel, J., & Rodrigues, A. L. S. (2016). Guanosine and its role in neuropathologies. *Purinergic Signalling*, 12(3), 411–426. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9509-4>
- Boland, J. M., Maleszewski, J. J., Wampfler, J. A., Voss, J. S., Kipp, B. R., Yang, P., & Yi, E. S. (2017). Pulmonary Invasive Mucinous Adenocarcinoma and Mixed Invasive Mucinous/Non-Mucinous Adenocarcinoma- A Clinicopathological and Molecular Genetic Study with Survival Analysis. *Human Pathology*, 17, 1–37. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.08.002>
- Bray, F., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2018). Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bujas, T., Marušić, Z., Perić Balja, M., Mijić, A., Krušlin, B., & Tomas, D. (2011). MAGE-A 3/4 and NY-ESO-1 antigens expression in metastatic esophageal squamous cell carcinoma. *European Journal of Histochemistry*, 55(1), 39–43. <https://doi.org/10.4081/ejh.2011.e7>
- Cala, P., Aldana, J., & Medina, J. (2018). Multiplatform plasma metabolic and lipid fingerprinting of breast cancer : A pilot control- case study in Colombian Hispanic women. *PLOS ONE*, 1–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190958>
- Callejón-leblic, B., García-barrera, T., & Pereira-vega, A. (2019). Metabolomic study of serum ,

- urine and bronchoalveolar lavage fluid based on gas chromatography mass spectrometry to delve into the pathology of lung cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 163, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.055>
- Cancer Today. (2017). Cancer Today. Retrieved September 22, 2017, from <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=11&type=0&sex=0>
- Cancerología, I. N. de. (2017). Instituto Nacional de Cancerología. Retrieved September 22, 2017, from http://www.cancer.gov.co/cancer_en_cifras
- Castro Carpeo, J., Belda-Iniesta, C., Feliu Batlle, J., & González Barn, M. (2006). Cáncer de pulmón (II). Tratamiento médico. *Medicine (Spain)*, 9(66), 4265–4269. [https://doi.org/10.1016/S0211-3449\(06\)74417-4](https://doi.org/10.1016/S0211-3449(06)74417-4)
- Chen, Y., Ma, Z., Li, A., Li, H., Wang, B., Zhong, J., ... Dai, L. (2014). Metabolomic profiling of human serum in lung cancer patients using liquid chromatography / hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography / mass spectrometry. *J Cancer Res Clin Oncol Serum*. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1846-5>
- Cheng, X., & Blumenthal, R. M. (2010). Coordinated chromatin control: Structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry*, 49(14), 2999–3008. <https://doi.org/10.1021/bi100213t>
- Clarke, W. (2017). *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. (H. Nair, Ed.). United States: Mica Haley.
- Cooper, W. A., Lam, D. C. L., O'Toole, S. A., & Minna, J. D. (2013). Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 5(5), 479–490. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03>
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of*

- Ethnopharmacology*, 100, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011>
- Criado Daza, M., & Dáder, M. J. F. (2010). *Estudio de la población de cáncer de pulmón en un hospital y adecuación de la práctica clínica en el área farmacológica al Proceso Asistencial Integrado*. Universidad de Granada.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dine, T., Luyckx, M., Cazin, J. C., Brunet, C., Cazin, M., Goudaliez, F., & Mallevais, M. L. (1991). Stability and compatibility studies of vinblastine, vincristine, vindesine and vinorelbine with PVC infusion bags. *International Journal of Pharmaceutics*, 77(2–3), 279–285. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90328-L](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90328-L)
- Expósito, F. N., González, J. L. L., Castillo, C., Losada, C., & Soto, M. Á. M. (2009). Cáncer de pulmón no microcítico. *Medicine (Spain)*, 10(25), 1639–1650. <https://doi.org/10.1016/j.med.2017.04.001>
- Garcia, A., & Barbas, C. (2011). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)-Based Metabolomics. *Springer Science*, 191–204. <https://doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7>
- González, J. L. L., Yustos, M. A., Martínez, B. M.-A., & Soto, M. Á.-M. (2009). Cáncer de pulmón microcítico. *Medicine (Spain)*, 10(25), 1651–1655. <https://doi.org/10.1016/j.med.2017.04.001>
- Güiza, F. M., Bueno, Y., Mendez-sanchez, S. C., & Bohórquez, A. R. R. (2019). CHEMISTRY Synthesis and in vitro evaluation of substituted tetrahydroquinoline- isoxazole hybrids as anticancer agents. *Medicinal Chemistry Research*, 1182–1196. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02363-z>

- Kanwal, M., Ding, X., & Cao, Y. (2016). Familial risk for lung cancer (Review). *Oncology Letters*, 535–542. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5518>
- Kayser, G., Sienel, W., Kubitz, B., Mattern, D., Stickeler, E., Passlick, B., ... Hausen, A. zur. (2011). Poor outcome in primary non-small cell lung cancers is predicted by transketolase TKTL1 expression. *Pathology*, 43(7), 719–724. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e32834c352b>
- Kennedy, K. A., Rockwell, S., & Salterelli, A. C. (1980). Preferential Activation of Mitomycin C to Cytotoxic Metabolites by Hypoxie Tumor Cells¹. *Cancer Research*, 40(July), 2356–2361.
- La Salle, S., & Trasler, J. M. (2006). Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Developmental Biology*, 296(1), 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.436>
- Liberti, M. V, & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect : How Does it Bene fi t Cancer Cells ? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Lieu, E. L., Nguyen, T., Rhyne, S., & Kim, J. (2020). Amino acids in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0375-3>
- Liu, W., Jin, F., Gao, D., Song, L., & Liu, H. (2017). RSC Advances derivative 9d-induced oxidative stress and cell. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 13149–13158. <https://doi.org/10.1039/C7RA00185A>
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Moro, M. A., & Portolés., A. (2008). *Farmacología Básica y Clínica* (18a ed.). Madrid: Medica Panamericana.
- Lunt, S. Y., & Heiden, M. G. Vander. (2011). Aerobic Glycolysis : Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011. 27:441–64 *The Annual*

- Review Of Cell and Developmental Biology*, 1–27. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Morales, C. R., Cárdenas, M. A. O., & Verde, M. J. (2016). *Investigación en Plantas de Importancia Médica*. México: OmniaScience.
- Moreno, A. P. R., Bruges, R. E., Arboleda, A. C., & Jaramillo, L. F. (2016). Regulación epigenética en cáncer de pulmón : implicaciones para el clínico. *Univ Med*, 57(3), 332–347. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed57-3.recp>
- Moros, G., Chrysovalantou, A. C., Gika, H. G., Raikos, N., & Theodoridis, G. (2017). Investigation of the derivatization conditions for GC – MS metabolomics of biological samples. *Future Science*, 9, 53–65. <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0224>
- Mozo, J. L. M., Carro, J. C., Cirauqui, B. C., & Costa, R. R. (2001). Cáncer de pulmón no microcítico. *Medicine (Spain)*, 8(56), 2985–2995. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(01\)70559-8](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(01)70559-8)
- Muñoz, A., Peticara, M., Sojo, F., Merchan Arenas, D. R., Bello Forero, J. S., Suarez, A., ... Arvelo, F. (2012). Tetrahydroquinolinas : Compuestos de origen sintéticos con propiedades antitumorales sobre líneas de cáncer humano. *Memorias Del Instituto de Biología Experimental*, 6, 77–80.
- Musharraf, S. G., Mazhar, S., Choudhary, M. I., Rizi, N., & Atta-ur-Rahman. (2015). Plasma Metabolite Profiling and Chemometric Analyses of Lung Cancer along with Three Controls through Gas. *SCIENTIFIC REPORTS*, 5(8607), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep08607>
- Nambiar, S. H., How, S. Z. E. B., Gummer, J. O. E. L., & Trengove, R. O. (2019). Metabolomics in chronic lung diseases. *Respirology*. <https://doi.org/10.1111/resp.13530>
- Namikawa-kanai, H., Miyazaki, T., Matsubara, T., Shigefuku, S., & Ono, S. (2020). Comparison

of the amino acid profile between the nontumor and tumor regions in patients with lung cancer. *Am J Cancer Res*, 10(7), 2145–2159.

O'Dwyer, P., Jones, Leyland, M. ., Alonso, M. T., Marsoni, S., & Wittes, R. (1985). The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at REGIONAL T CANCERCENTRUM VAST on January 25, 2015. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights re. *The New Englandn Journal of Medicine*, 312, 700.

Pass, H., Ball, D., & Scagliotti, G. (2017). Lung Cancer in Never-Smokers: A Different Disease. In *IASLC Thoracic Oncology* (Second, pp. 23–30). China: Elsevier.

PubChem. (2020). PubChem. Retrieved October 24, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Renaud, S., Pugacheva, E. M., Delgado, M. D., Braunschweig, R., Abdullaev, Z., Loukinov, D., ... Lobanenkoy, V. (2007). Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7372–7388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm896>

Resano Barrio, P., & Anta Mejía, Y. (2014). Cáncer de pulmón. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(67), 3983–3994. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70873-X](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70873-X)

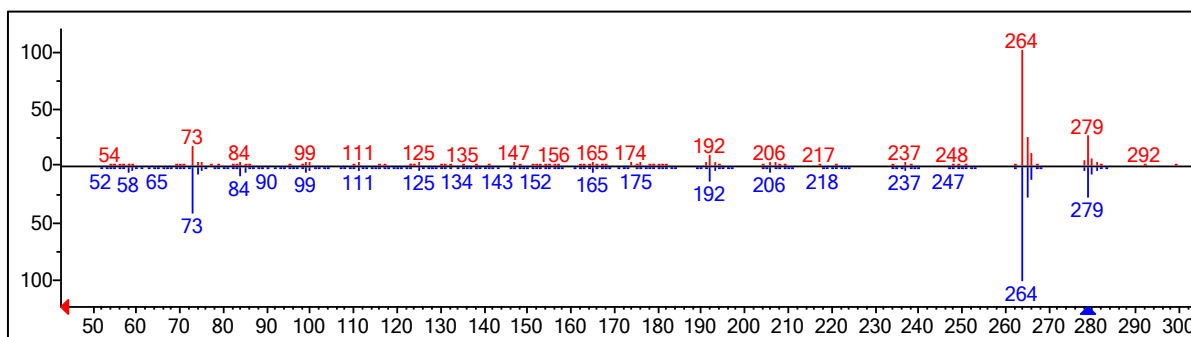
Rinaldi, G., Rossi, M., & Fendt, S. (2017). Metabolic interactions in cancer : cellular metabolism at the interface between the microenvironment , the cancer cell phenotype and the epigenetic landscape. *WIREs System Biology and Medicine*, 1–18. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1397>

Risch, A., & Plass, C. (2008). Lung cancer epigenetics and genetics, 7(January), 1–7. <https://doi.org/10.1002/ijc.23605>

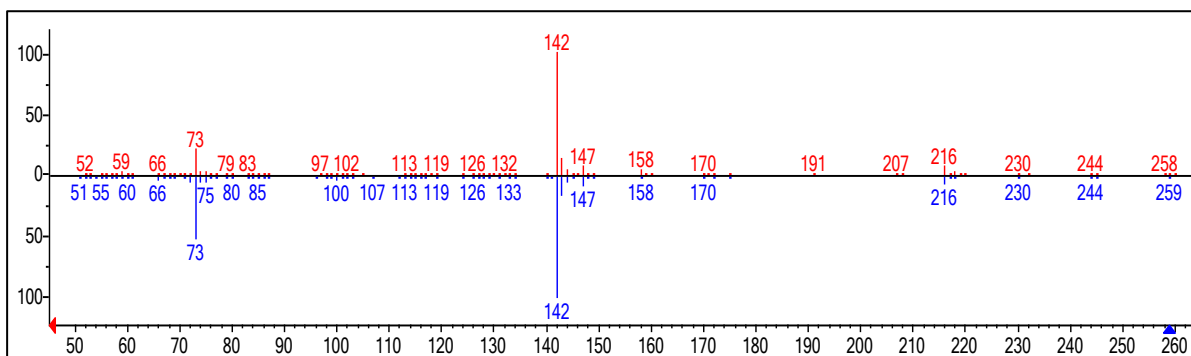
- Sánchez Hernández, I., Izquierdo Alonso, J. L., & Almonacid Sánchez, C. (2006). Situación epidemiológica y pronóstica del cáncer de pulmón en nuestro medio. *Archivos de Bronconeumología*, 42(11), 594–599. <https://doi.org/10.1157/13094327>
- Sappington, D., Helms, S., Siegel, E., Penney, R. B., Jeffus, S., Bartter, T., ... Boysen, G. (2018). Diagnosis of lung tumor types based on metabolomic profiles in lymph node aspirates. *Cancer Treatment and Research Communications*, 14, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2017.08.002>
- Selwan, E. M., & Edinger, A. L. (2017). Branched chain amino acid metabolism and cancer : the importance of keeping things in context, 6(Suppl 3), 578–584. <https://doi.org/10.21037/tcr.2017.05.05>
- Sysak, A., & Obmińska-Mrukowicz, B. (2017). Isoxazole ring as a useful scaffold in a search for new therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 292–309. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.002>
- Tang, Y., Li, Z., Lazar, L., Fang, Z., Tang, C., & Zhao, J. (2019). Clinica Chimica Acta Metabolomics work fl ow for lung cancer : Discovery of biomarkers. *ELSEVIER*, 495(May), 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.05.012>
- Tardon, A. (2014). Polimorfismos genéticos y riesgo de cáncer de pulmón. *Medicina Clínica*, 143(3), 113–114. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.12.004>
- The Human Metabolome Database. (2020). The Human Metabolome Database. Retrieved October 24, 2020, from <https://hmdb.ca>
- Toloz, E. M., Morse, M. A., & Lyster, H. K. (2006). Gene therapy for lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(1), 1–23. <https://doi.org/10.1002/jcb.20851>
- Waldmann, T., & Schneider, R. (2013). Targeting histone modifications - epigenetics in cancer.

- Current Opinion in Cell Biology*, 25(2), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.01.001>
- Wang, F., Liu, X., Liu, C., Liu, Z., & Sun, L. (2015). Effects of antibiotic antitumor drugs on nucleotide levels in cultured tumor cells: An exploratory method to distinguish the mechanisms of antitumor drug action based on targeted metabolomics. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(3), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.03.010>
- Wei, J., Xiang, L., Yuan, Z., Li, S., Yang, C., Liu, H., ... Cai, Z. (2018). Metabolic profiling on the effect of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in MCF-7 cells. *Chemosphere*, 192(17), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.170>
- Westcott, P. M. K., & To, M. D. (2013). The genetics and biology of KRAS in lung cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 32(2), 63–70. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10098>
- Wishart, D. S., Mandal, R., Stanislaus, A., & Ramirez-Gaona, M. (2016). Cancer metabolomics and the human metabolome database. *Metabolites*, 6(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/metabo6010010>
- World Health Organization. (2019). World Health Organization. Retrieved December 9, 2019, from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>
- Yu, L., Li, K., & Zhang, X. (2017). Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis , treatment and precision medicine : mini review. *Oncotarget*, 8(70), 115774–115786.

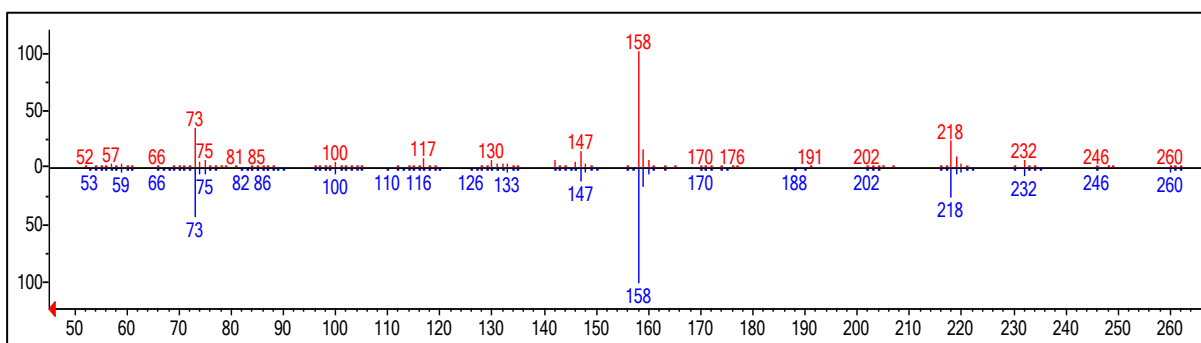
Apéndices



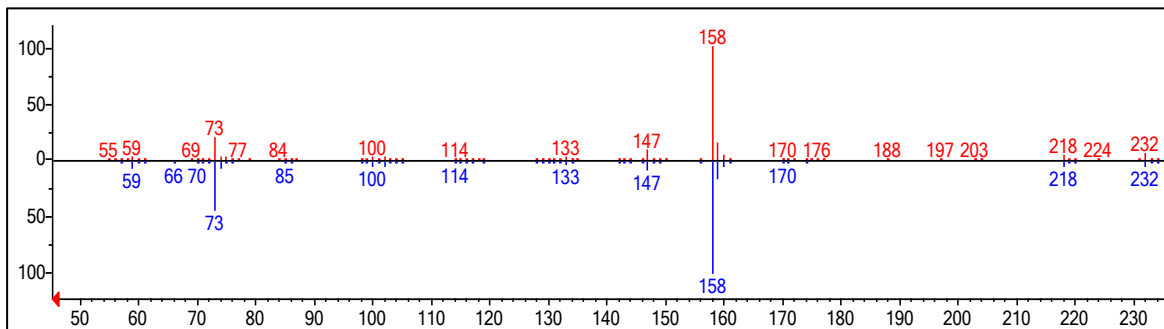
Apéndice 1. Espectro de masas experimental de la adenina (rojo) vs espectro de masas teórico adenina (azul).



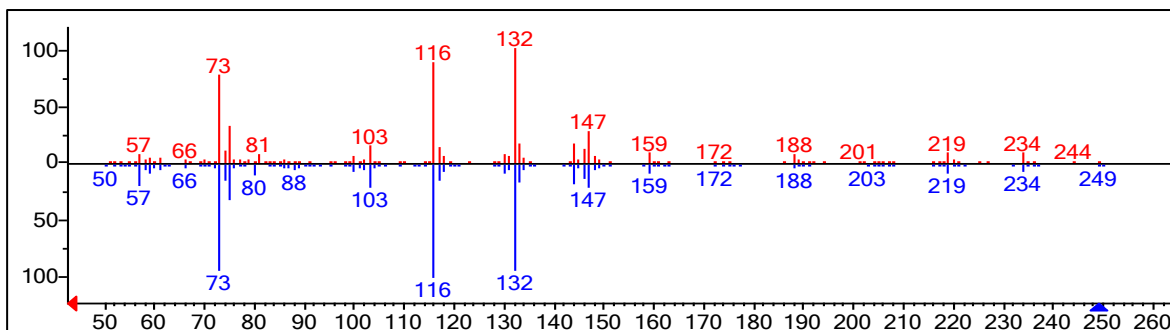
Apéndice 2. Espectro de masas experimental de la prolina (rojo) vs espectro de masas teórico prolina (azul).



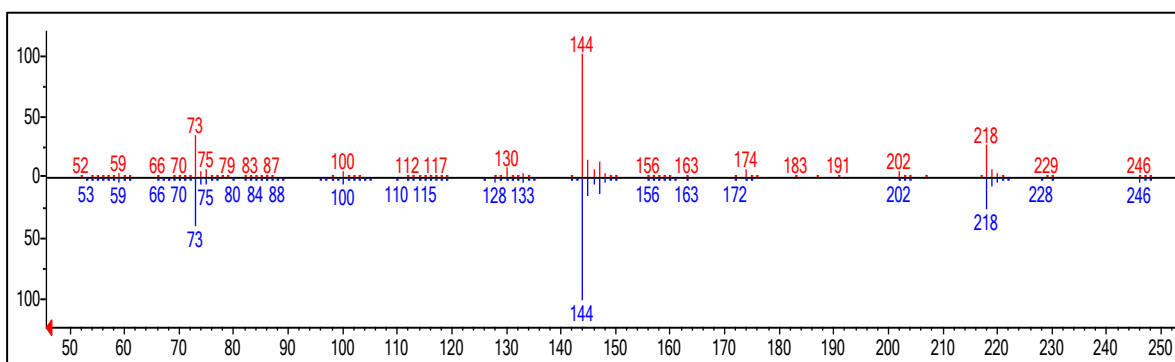
Apéndice 3. Espectro de masas experimental de la isoleucina (rojo) vs espectro de masas teórico isoleucina (azul).



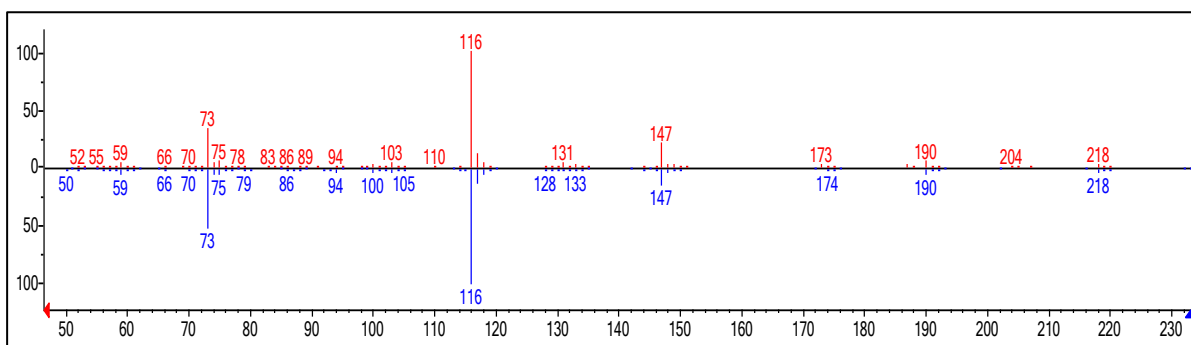
Apéndice 4. Espectro de masas experimental de la leucina (rojo) vs espectro de masas teórico leucina (azul).



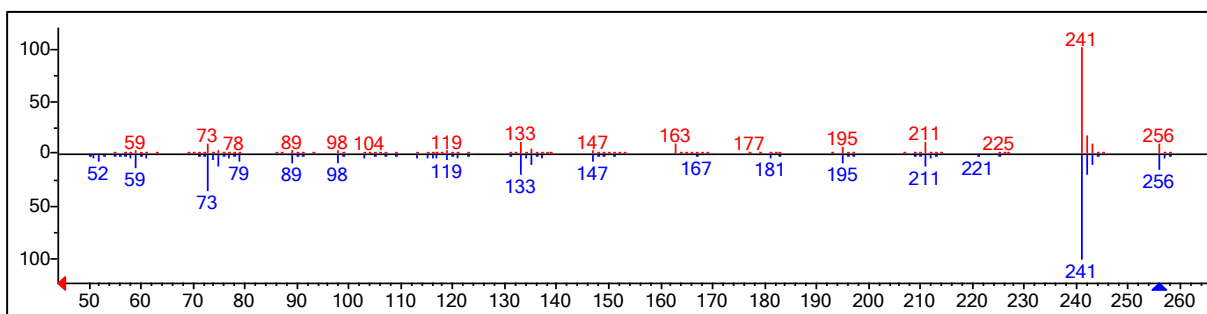
Apéndice 5. Espectro de masas experimental de la serina (rojo) vs espectro de masas teórico serina (azul).



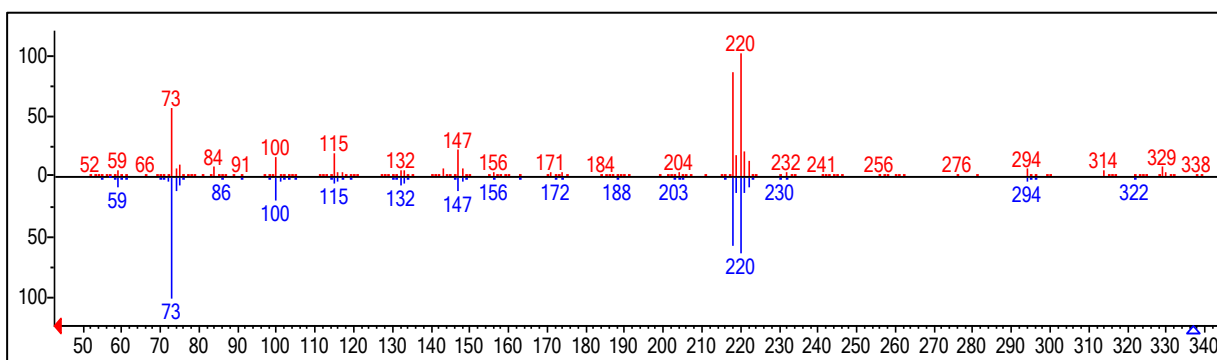
Apéndice 6. Espectro de masas experimental de la valina (rojo) vs espectro de masas teórico valina (azul).



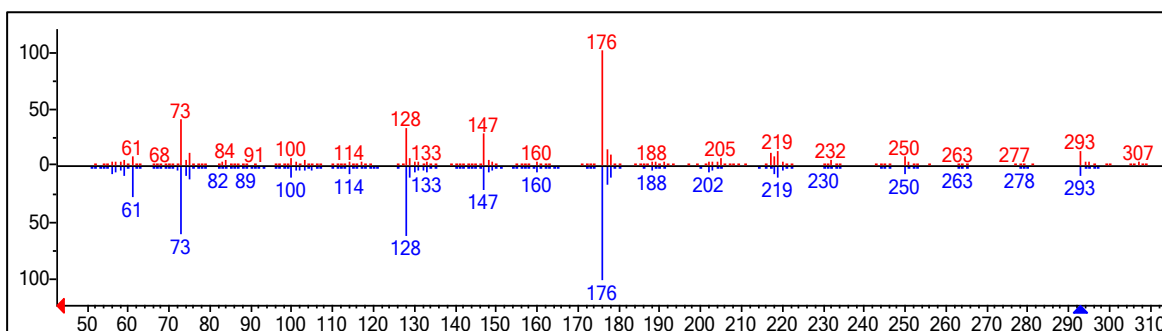
Apéndice 7. Espectro de masas experimental de la alanina (rojo) vs espectro de masas teórico alanina (azul).



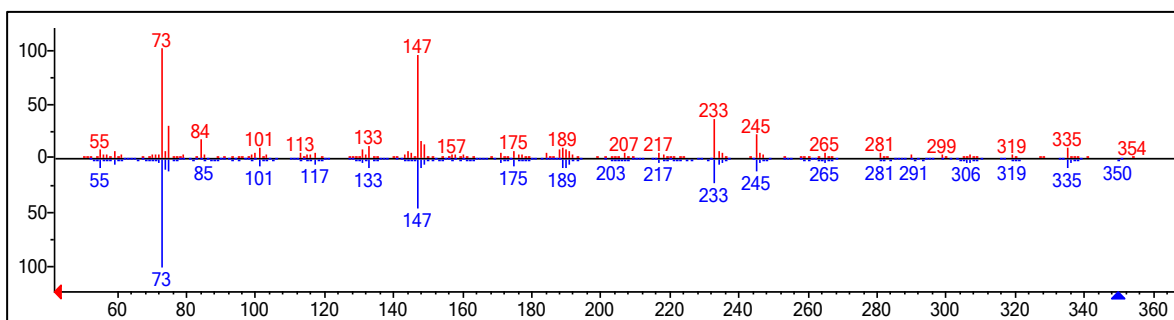
Apéndice 8. Espectro de masas experimental del ácido fosfórico (rojo) vs espectro de masas teórico del ácido fosfórico (azul).



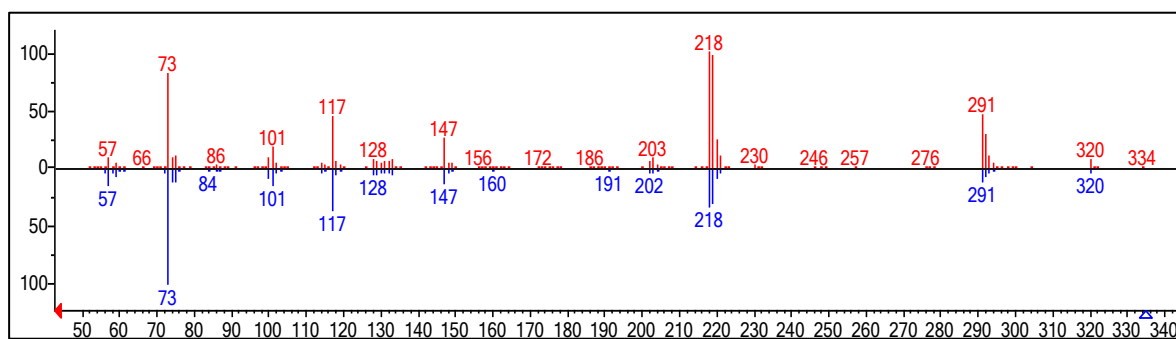
Apéndice 9. Espectro de masas experimental de la cisteína (rojo) vs espectro de masas teórico de la cisteína (azul).



Apéndice 10. Espectro de masas experimental de la metionina (rojo) vs espectro de masas teórico de la metionina (azul).



Apéndice 11. Espectro de masas experimental del ácido málico (rojo) vs espectro de masas teórico del ácido málico (azul).



Apéndice 12. Espectro de masas experimental de la treonina (rojo) vs espectro de masas teórico de la treonina (azul).