



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Estudio metabólico por RMN de la línea tumoral MDA-MB-231 tratada con Casiopeínas®”**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. Karen Resendiz Acevedo

TUTOR: Dra. Lena Ruiz Azuara  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Ciudad de México, Noviembre, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Estudio metabólico por RMN de la línea tumoral MDA-MB-231 tratada  
con Casiopeínas®”**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Q. Karen Resendiz Acevedo**



Ciudad de México,

de 2020.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Julio César Aguilar Cordero

**VOCAL:** Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo

**VOCAL:** Dra. Martha Robles Flores

**VOCAL:** Dr. Arturo Jiménez Sánchez

**SECRETARIO:** Dra. Daniela Araiza Olivera Toro

**Sitio donde se realizó el proyecto:**

Laboratorios 5, 210 (Laboratorio de Química Inorgánica Medicinal) del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear, Instituto de Química, UNAM.

## Agradecimientos

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, por la dirección de este proyecto y por permitirme seguir desarrollándome profesionalmente en su grupo de trabajo.

A CONACyT por la beca otorgada con número de CVU. 822505.

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) del Instituto de Química.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet, por su colaboración en este trabajo, por el apoyo en la adquisición de los espectros de RMN, en el análisis de las muestras, por su tiempo y por las observaciones realizadas a este escrito .

A la M. En C. Martha Elena García, por su apoyo y asesoría durante mis visitas a LURMN, así como a todos los integrantes del grupo de trabajo de la Dra. Nuria Esturau.

A la M. En C. Circe Hernández por la asesoría en el desarrollo de la metodología y por la resolución de dudas.

A la Dra. Daniela Araiza y a su alumno Luis, por su tiempo, atención en la resolución de dudas.

Al M. en C. Mauricio González Ballesteros y al Q.B.C. Rogelio Hurtado Alamea, por ser mi equipo en el laboratorio 5 y por su apoyo en el desarrollo experimental del proyecto.

Al M. en C. Adrián Espinoza Guillén, por su valioso apoyo técnico, por siempre escucharme y por ser para mí, más que nuestro técnico académico.

A la Dra. Silvia Dávila Manzanilla por sus observaciones y recomendaciones para la realización del trabajo.

Al jurado designado por su tiempo, atención y observaciones realizadas a este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 210 y 05, por sus observaciones y aportaciones para la realización de este proyecto.

A los proyectos UNAM-FQ PAIP 50009047, CONACYT CB179119.

# Índice

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>IX</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>XII</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Índice de gráficas.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Cáncer .....</b>	<b>2</b>
1.2. Metabolismo tumoral.....	3
1.2.1. Efecto Warburg .....	4
1.2.2. Glucólisis en cáncer .....	5
1.2.3. Glutaminólisis en cáncer .....	8
1.2.4. Síntesis de ácidos grasos en cáncer.....	9
1.2.5. Aminoácidos en cáncer.....	10
1.3. Especies reactivas de oxígeno en cáncer .....	11
1.4. RMN en estudios de metabolómica.....	12
<b>1.5. Casiopeínas® .....</b>	<b>15</b>
1.5.1. Mecanismo de acción de las <b>Casiopeínas®</b> .....	17
1.6. <b>Casiopeínas®</b> y su efecto sobre el metabolismo celular .....	18
<b>2. Justificación .....</b>	<b>21</b>
<b>3. Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>24</b>
<b>4. Material y métodos .....</b>	<b>27</b>
<b>5. Resultados y análisis de resultados .....</b>	<b>35</b>
<b>6. Discusión de resultados .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>71</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>73</b>

<b>9. ANEXO A. características fisicoquímicas de las Casiopeínas® empleadas.</b>	<b>86</b>
<b>10. ANEXO B. Resultados de los experimentos de viabilidad .....</b>	<b>88</b>
<b>11. ANEXO C. Resultados de los experimentos de QEA y PEA .....</b>	<b>93</b>

## Abreviaturas

<b>3BrPyr</b>	3-bromopiruvato
<b>acac</b>	Acetilacetato
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNmt</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>AE</b>	Análisis elemental
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CasIII-ia</b>	Nitrato de 4,4'-dimetil-2,2'-bipridina acetilacetato cobre(II) monohidratado
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>CoA</b>	Acetil coenzima A
<b>DC</b>	Dicroísmo circular
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media
<b>DMEM-F12</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con la mezcla de nutrientes F-12
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>GCL</b>	Glutación cisteína ligasa
<b>Glut 1</b>	Transportador de glucosa 1
<b>Glut 3</b>	Transportador de glucosa 3
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>HIT1-<math>\alpha</math></b>	Proteína 1-alfa inducida por hipoxia
<b>HKII</b>	Hexocinasa II
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>MTT</b>	Bromuro de tetrazolio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPLS</b>	Proyecciones ortogonales a estructuras latentes
<b>OPLS-DA</b>	Proyecciones ortogonales a estructuras

	latentes con análisis discriminante
<b>OXPHOS</b>	Fosforilación oxidativa
<b>PBS</b>	Disolución amortiguadora de fosfatos pH=7
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PEA</b>	Pathway enrichment analysis
<b>PFK-1</b>	Fosfofructocinasa
<b>PLS</b>	Regresión de mínimos cuadrados parciales
<b>PLS-DA</b>	Regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante
<b>QSAR</b>	Relación cuantitativa estructura actividad
<b>QEA</b>	Quantitative enrichment analysis
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)
<b>salal</b>	Salicilaldehidato
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SDH</b>	Succinato deshidrogenasa
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TCA</b>	Vía del ácido tricarboxílico
<b>TSP</b>	3-(trimetilsilil)( <sup>2</sup> H <sub>4</sub> )propanoato de sodio
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta-visible
<b>VIP</b>	Importancia de la variable para la proyección

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Formación de un tumor sólido.....	2
<b>Figura 2.</b> Proceso de glucólisis en una célula normal.....	5
<b>Figura 3.</b> Ciclo de Krebs.....	6
<b>Figura 4.</b> Comparación entre el proceso de glucólisis llevado a cabo en una célula normal y en una célula cancerosa.....	7
<b>Figura 5.</b> Glutaminólisis en una célula cancerosa. ....	9
<b>Figura 6.</b> Síntesis de lípidos dentro de las células .....	10
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN obtenido para las células MG-63 tratadas con cisplatino.....	13
<b>Figura 8.</b> Estructuras generales de las familias de las <b>Casiopeínas<sup>®</sup></b> .....	15
<b>Figura 9.</b> Red de vías metabólicas perturbadas en células HeLa, después del tratamiento con <b>CasII-gly</b> .....	19
<b>Figura 10.</b> Células MDA-MB-231.....	36
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN intracelular del tratamiento por 20 min de células MDA-MB-231 con <b>CasIII-ia</b> .....	38
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN extracelular del tratamiento por 20 min de células MDA-MB-231 con <b>CasIII-ia</b> .....	40

<b>Figura 13.</b> PLS-DA de scores modelado con los datos espectrales de las muestras intracelulares de los 20 y 40 min.....	42
<b>Figura 14.</b> OPLS-DA de scores modelado con los datos espectrales de las muestras intracelulares de los 20 y 40 min. ....	43
<b>Figura 15.</b> VIP de scores obtenido para los metabolitos intracelulares de los 20 y 40 min.....	44
<b>Figura 16.</b> Análisis de clústers obtenido de acuerdo a los metabolitos intracelulares de los 20y 40 min.....	45
<b>Figura 17.</b> Heat map obtenido de acuerdo a la concentración de los metabolitos intracelulares a los 20 y 40 min.....	46
<b>Figura 18.</b> PCA de scores modelado con los datos espectrales de las muestras extracelulares de los 20 y 40 min.....	47
<b>Figura 19.</b> VIP de scores obtenido para los metabolitos extracelulares de los 20 y 40 min.....	48
<b>Figura 20.</b> Análisis de clústers obtenido de acuerdo a los metabolitos extracelulares de los 20 y 40 min.....	49
<b>Figura 21.</b> Heat map obtenido de acuerdo a la concentración de los metabolitos extracelulares a los 20 y 40 min.....	50

<b>Figura 22.</b> Resultados del análisis QEA para ambos tiempos correspondiente a las muestras intracelulares.....	52
<b>Figura 23.</b> Resultados del análisis QEA para ambos tiempos correspondiente a las muestras extracelulares.....	53
<b>Figura 24.</b> Resultados del análisis PEA para ambos tiempos correspondiente a las muestras intracelulares.....	54
<b>Figura 25 .</b> Resultados del análisis PEA para ambos tiempos correspondiente a las muestras extracelulares.....	55
<b>Figura 26.</b> Vías metabólicas reelevantes para las muestras sin tratamiento y con los tratamientos obtenidas por QEA.....	62
<b>Figura 27.</b> Vías metabólicas reelevantes para las muestras sin tratamiento y con los tratamientos obtenidas por PEA.....	63
<b>Figura 28.</b> Vías metabólicas y metabolitos (coloreados en morado) reelevantes para las muestras sin tratamiento y con tratamiento.....	64

# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las subfamilias de las <b>Casiopeínas<sup>®</sup></b> .....	16
<b>Tabla 2.</b> Clave y fórmula condensada de la <b>Casiopeína<sup>®</sup></b> a evaluar.....	27
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones empleadas de los compuestos para la determinación de la $Cl_{50}$ a 24 h en la línea celular MDA-MB-231.....	35
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones inhibitorias medias de los compuestos de interés en la línea celular MDA-MB-231.....	35
<b>Tabla 5.</b> Metabolitos identificados con su concentración promedio (mM) en las muestras evaluadas.....	39
<b>Tabla 6.</b> Metabolitos extracelulares identificados con su concentración promedio(mM) en las muestras evaluadas.....	41
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de los modelos quimiométricos empleados para las muestras intracelulares.....	44
<b>Tabla 8.</b> Parámetros de los modelos quimiométricos empleados para las muestras extracelulares.....	48

# Índice de gráficas

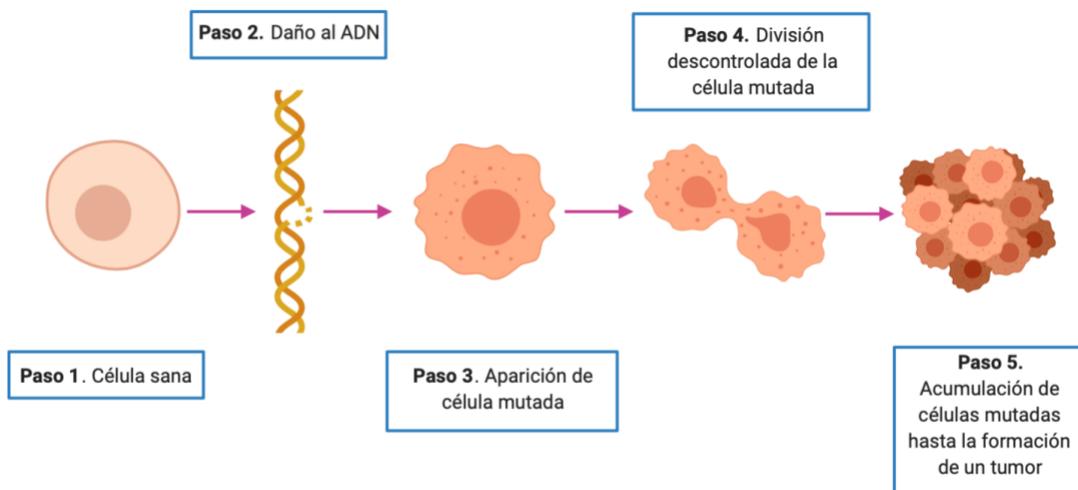
<b>Gráfica 1.</b> Viabilidad promedio de células MDA-MB-231 <b>con y sin tratamiento</b> a diferentes tiempos de incubación .....	37
---	----

# **Capítulo 1. Antecedentes**

# 1. Antecedentes

## 1.1. Cáncer

El cáncer engloba a un conjunto de enfermedades relacionadas con división descontrolada de células anormales que crecen e invaden las células sanas del cuerpo. Esta enfermedad es causada por cambios en los genes que controlan principalmente la forma en la que crecen y se dividen. Estos procesos, al verse alterados, favorecen el crecimiento descontrolado de las mismas, lo que concluye en la formación de una neoplasia (tumor) [1,2]. Una neoplasia es una masa de tejido que no posee función fisiológica y puede ser inofensiva o maligna [3,4]. En la **Figura 1**, se ilustra el proceso de aparición de un tumor maligno: una célula sana sufre un daño en un oncogene y/o en un gen supresor tumoral que la lleva a convertirse en una célula mutada y con ello en una célula cancerosa, de manera que comienza su reproducción descontrolada hasta que la acumulación de éstas genera la formación del tumor.



**Figura 1.** Formación de un tumor sólido [2,5]. El proceso va desde tener una célula sana, la cual sufre un daño en su ADN que resulta en una mutación con la que adquiere la capacidad de dividirse descontroladamente a su acumulación.

Cuando una célula sana se convierte en una célula cancerosa adquiere nuevas características durante esta transición: replicación ilimitada, angiogénesis sostenida, pérdida de apoptosis, invasión de tejidos y metástasis, entre otras [6,7].

Recientemente se ha observado que existen otras dos características que también poseen las células cancerosas: evasión del sistema inmune y reprogramación del metabolismo energético. Las características metabólicas de las células cancerosas, así como las vías a través de las cuales adquieren y reponen sus necesidades metabólicas, son diferentes de las de las células normales debido a la reprogramación metabólica [8]. Debido a que, con el aumento de división celular se requiere que las vías metabólicas sean rediseñadas y así, la célula cancerosa logre satisfacer sus demandas de ATP, NADPH, NADH; esto en su conjunto da como resultado un metabolismo modificado en células tumorales favorecido por factores intrínsecos y extrínsecos como la señalización oncogénica y el microambiente tumoral [7,9].

## **1.2. Metabolismo tumoral**

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren dentro de la célula y que involucran la transformación de moléculas complejas a moléculas más pequeñas, constituyendo la base para la construcción de otras. Estas reacciones se pueden clasificar en reacciones de síntesis (anabolismo), descomposición (catabolismo) o eliminación, y en conjunto mantienen el buen funcionamiento de la célula. Por su parte, los metabolitos son todas aquellas moléculas pequeñas (por debajo de 1500 Da) [10] empleadas o producidas durante el metabolismo [11].

El metabolismo de una célula sana es distinto al metabolismo de una célula cancerosa y algunas de las vías que se encuentran alteradas en estas últimas, se describen a continuación.

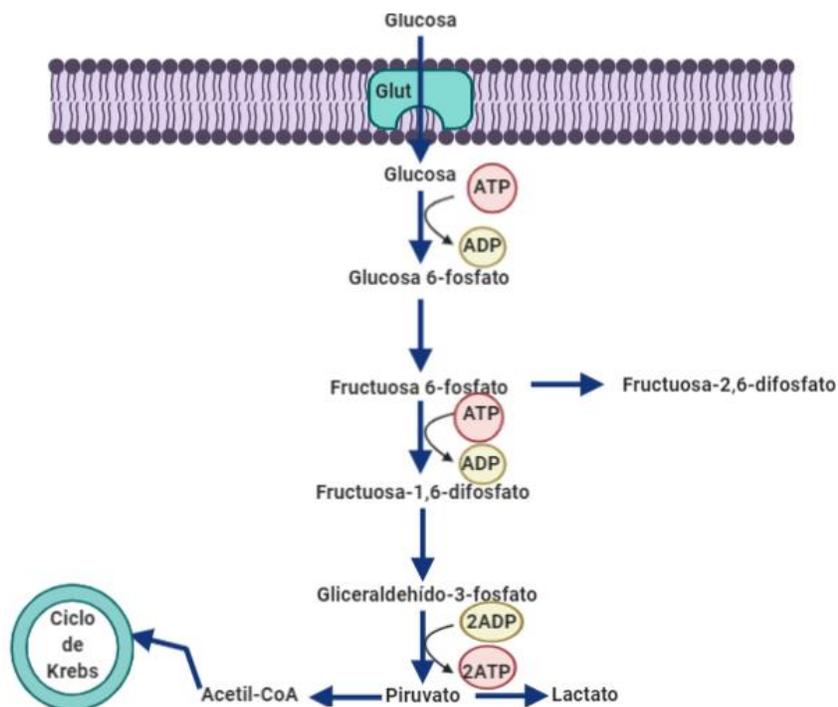
### 1.2.1. Efecto Warburg

Las primeras aproximaciones sobre el metabolismo modificado en células tumorales fueron realizadas en 1920 por Otto Warburg y colaboradores, quienes observaron que los tumores absorbían enormes cantidades de glucosa en comparación con tejidos circundantes produciendo lactato a pesar de la suficiente disponibilidad de oxígeno para llevar a cabo la oxidación de la misma, esto fue denominado efecto Warburg o glucólisis aerobia siendo característica distintiva de los tumores y [7], en la mayoría de los casos, es un resultado de varios factores como la activación de oncogenes, la pérdida de supresores de tumores, el microentorno hipóxico y mutación en el ADN mitocondrial (ADNmt) [12]. Warburg y colaboradores plantearon la hipótesis de que este evento podría ser la principal causa del cáncer y atribuyeron este efecto a una disfunción mitocondrial y con ello la falla de procesos como por ejemplo la fosforilación oxidativa (*OXPHOS*, por sus siglas en inglés) con la cual se genera ATP [7,12,13].

Más adelante, se descartó esta idea, pues se observó que la *OXPHOS* mitocondrial en la mayoría de los tipos de cáncer se encuentra intacta [12,14], además de que, con este daño, las células tumorales también se encontrarían afectadas principalmente por las altas demandas catabólicas y anabólicas necesarias para su proliferación. Posteriormente se determinó que lo que de verdad ocurría es que, para satisfacer estas demandas energéticas, había procesos como la glucólisis y la glutaminólisis que se encontraban modificados en comparación con células sanas [6].

## 1.2.2. Glucólisis en cáncer

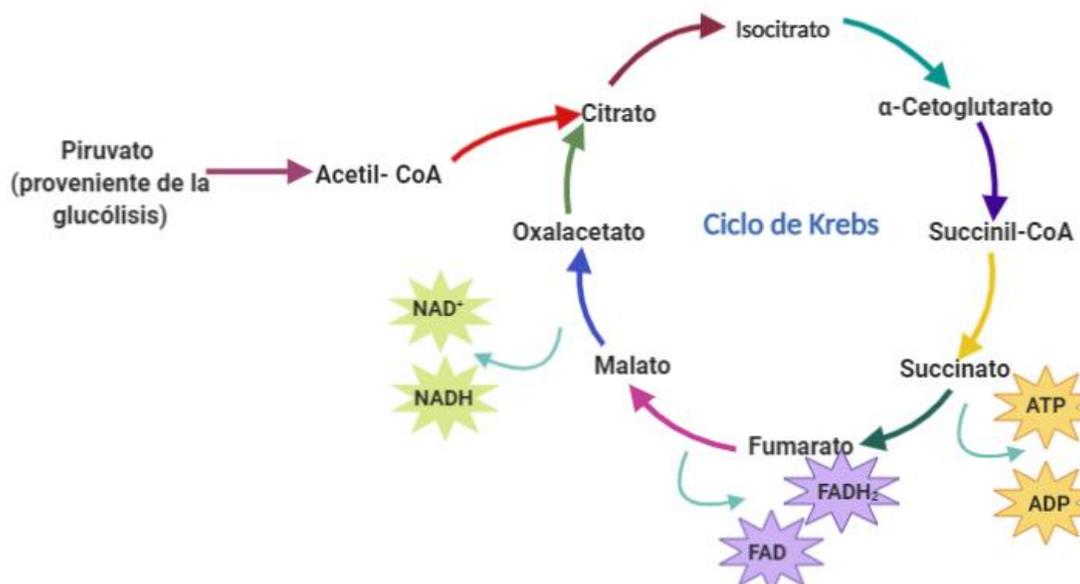
La glucólisis (**Figura 2**) es el proceso mediante el cual una molécula de glucosa es degradada a piruvato y posteriormente a acetil-coenzima A (CoA), a través diversas reacciones catalizadas por enzimas. Esta vía metabólica provee intermediarios indispensables para la generación de energía dentro de la célula, siendo la glucosa el sustrato principal del metabolismo energético para los mamíferos [11].



**Figura 2.** Proceso de glucólisis en una célula normal.

El proceso comienza con la ruptura de la molécula de glucosa hasta la formación del piruvato.

El último paso del proceso de glucólisis involucra la formación de piruvato y acetil-CoA. Este último se metaboliza en una serie de compuestos intermediarios constituyentes del ciclo de Krebs. En este, se liberan ATP y portadores de energía (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NADPH]) que suministran a la *OXPHOS* de electrones, produciendo 18 veces más ATP que la glucólisis [14].

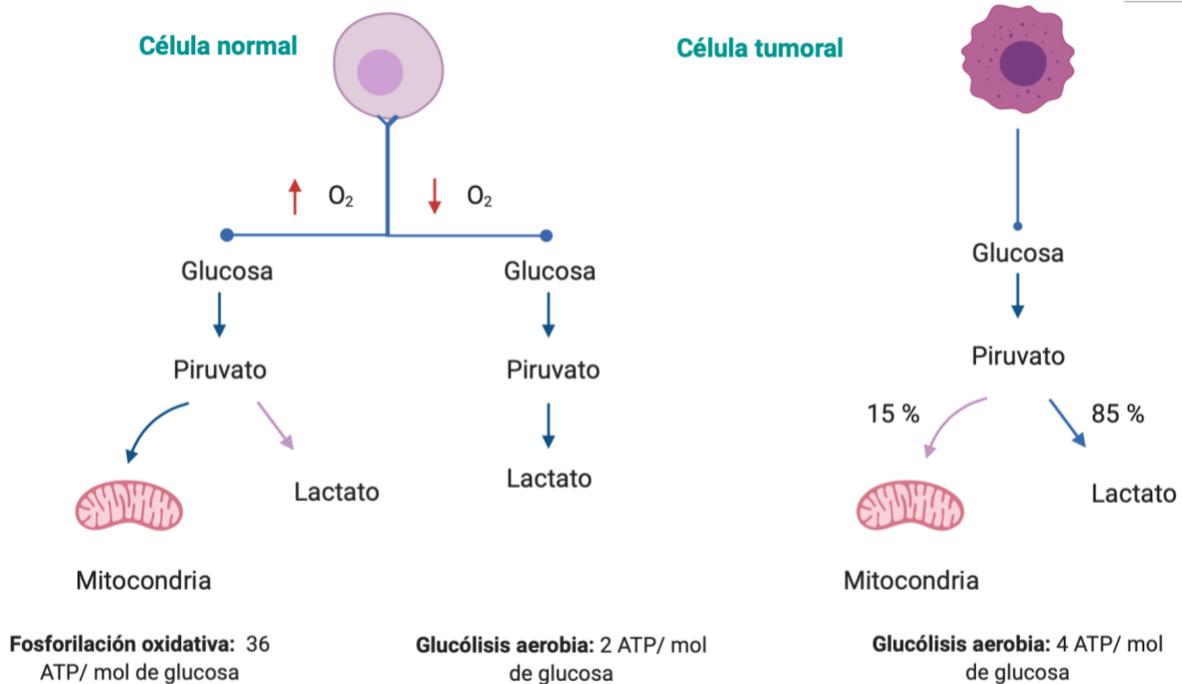


**Figura 3.** Ciclo de Krebs.

El proceso comienza con el piruvato proveniente de la glucólisis pasando por la formación del acetil-CoA precursor del mismo, su destino es la OXPHOS.

Cabe resaltar que la glucólisis proporciona varios metabolitos como por ejemplo la glucosa-6-fosfato, piruvato, acetil-CoA, entre otros; utilizados como precursores en la biosíntesis de macromoléculas que se requieren para la proliferación celular, así como intermediarios del ciclo de Krebs [15].

Cuando el oxígeno es limitante, las células pueden redirigir el piruvato producido en la glucólisis hacia la generación de lactato (glucólisis anaeróbica). Cerca del 85 % de la glucosa se metaboliza hacia lactato y sólo aproximadamente el 15 % se emplea para la OXPHOS incluso en condiciones aeróbicas, dando como resultado una producción mínima de ATP en comparación con la fosforilación oxidativa [14] este proceso se muestra en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Comparación entre el proceso de glucólisis llevado a cabo en una célula normal y en una célula cancerosa.

Se ha propuesto que el hecho de que la célula cancerosa prefiera un mecanismo de generación de energía mucho menos eficiente que la *OXPHOS* [16], podría estar relacionado con Enzimas como la hexocinasa II (HK II), la cual cataliza el paso de glucosa a glucosa-1-fosfato, fosfofructoquinasa (PFK-1) responsable del paso de glucosa-6-fosfato a fructuosa-1,6-bifosfato y la piruvato cinasa, quien cataliza el último paso de la glucólisis de fosfoenolpiruvato a piruvato, también se generan en mayor cantidad en comparación a una célula normal; mutaciones en la succinato deshidrogenasa (SDH) disminuyen la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales (I, III y IV). Estos eventos en conjunto y la alta demanda energética provocan que la célula cancerosa adopte distintas vías de importación de glucosa para satisfacer sus demandas de energía [17].

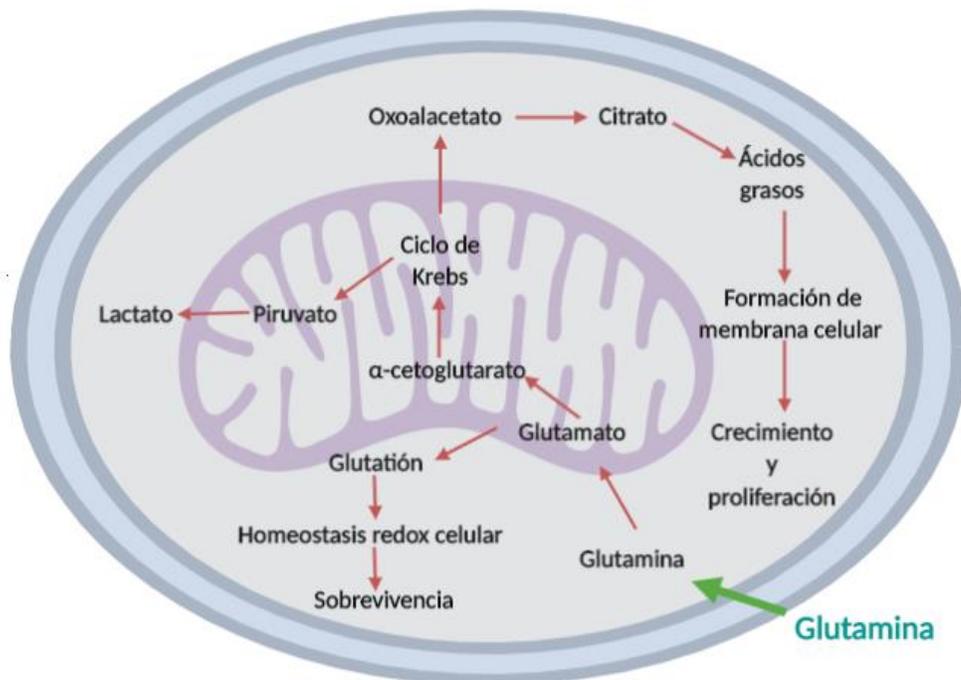
Otro factor importante son las condiciones hipóxicas dentro de un tumor, ocasionadas por el déficit de oxígeno en las células cancerosas y que, en respuesta a ello, se tiene la activación de HIF1- $\alpha$ , a su vez, aumenta la tasa de glucólisis,

desvía al piruvato hacia la producción de lactato y no hacia el ciclo de Krebs, disminuyendo su conversión a subproductos presentes en células normales [18,19].

### **1.2.3. Glutaminólisis en cáncer**

La glutaminólisis involucra una serie de reacciones bioquímicas que catalizan la glutamina en metabolitos como el glutamato y  $\alpha$ -cetoglutarato, que provee de NADH y FADH<sub>2</sub>, utilizados por la cadena de transporte de electrones para la generación de ATP, y es importante para el balance redox y para eventos como la apoptosis y la autofagia [20,21]. Entre otras funciones de la glutaminólisis está la generación de glutatión reducido (GSH) por la enzima glutatión cisteína ligasa (GCL), importante antioxidante celular, ya que esta vía metabólica favorece la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [22].

En cáncer, los productos de la glutaminólisis son muy importantes para suministrar los intermediarios necesarios para el ciclo de Krebs, donde la glutamina por acción de la glutaminasa pierde un grupo amino para formar el glutamato y posteriormente, este último también pierde su grupo amino para dar paso a la formación de  $\alpha$ -cetoglutarato por la enzima glutamato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs. Además, la glutaminólisis provee de nitrógeno y carbono, elementos necesarios para la biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos no esenciales empleados en la producción de membranas celulares, así como en la formación del antioxidante GSH, necesario para el crecimiento y proliferación de las células cancerosas [23].



**Figura 5.** Glutaminólisis en una célula cancerosa.

La glutamina ingresa a la célula por medio de transportadores, se transforma en glutamato para posteriormente participar en múltiples procesos esenciales para la supervivencia de las células tumorales.

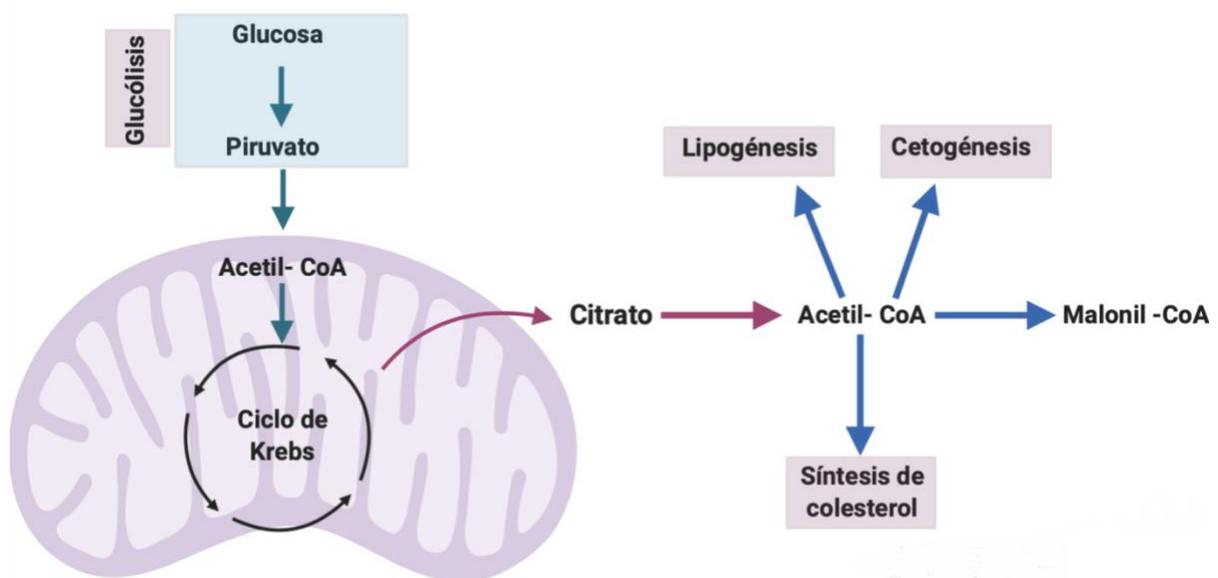
#### 1.2.4. Síntesis de ácidos grasos en cáncer

Los lípidos, son moléculas biológicas constituyentes de las membranas celulares así como responsables de las reservas energéticas. Su función depende tanto de la estructura química que posean, como de su localización dentro del organismo.

La síntesis de ácidos grasos comienza con el piruvato proveniente de la glucólisis, a través de la enzima piruvato deshidrogenasa es convertido en acetil-CoA (sustrato importante también del ciclo de Krebs), y posteriormente, por acción de la enzima citrato sintasa se transforma en citrato, el cual es transportado desde la mitocondria hasta el citosol, lugar donde se lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos, tal como se muestra en la **Figura 6**. Una vez dentro del citosol, el citrato se convierte nuevamente en acetil-CoA y a través de una serie de reacciones se convierte en

ácido palmítico, molécula de dieciséis carbonos que puede desaturarse o alargarse para producir derivados de ácidos grasos insaturados empleados como bloques de construcción para la síntesis de otros lípidos [24, 25]

En cáncer, se ha observado que este proceso, al igual que los mencionados anteriormente, se encuentra regulado al alza, particularmente en este caso tanto los lípidos como los ácidos grasos son elementales para la biosíntesis, formación de la membrana lipídica, señalización celular y supervivencia de las células cancerosas. Además, se han asociado a procesos como metástasis y carcinogénesis [26, 27].



**Figura 6.** Síntesis de lípidos dentro de las células.

El acetil CoA inicia este proceso, posteriormente ingresa al ciclo de Krebs cuyo intermediario (citrato) participa en la formación nuevamente de acetil- CoA que participa en los principales procesos de la síntesis de ácidos grasos.

### 1.2.5. Aminoácidos en cáncer

Aunque el estudio del metabolismo del cáncer se ha centrado principalmente en las vías que involucran al carbono (glucólisis y ciclo de Krebs), recientemente se ha reportado que los aminoácidos y sus derivados juegan un papel importante en la progresión de varios tipos de cáncer. Los aminoácidos dentro del metabolismo

celular cumplen funciones importantes como el mantenimiento del equilibrio redox, regulación energética, síntesis de biomoléculas, principalmente. Dentro del metabolismo de las células cancerosas, el sustento de estas funciones contribuye a la progresión de la enfermedad.

Se ha reportado que aminoácidos como la glutamina, glicina y el aspartato funcionan como proveedores de carbono y nitrógeno [28]; la tirosina por su parte, aumenta la actividad de enzimas glucolíticas, aumentando así la proliferación de células tumorales [29]; aminoácidos como la colina, están relacionados con la síntesis de membranas celulares [30], la adenosina y la fenilalanina, se asocian con la supresión del sistema inmune [31,32]. Esto lleva a la conclusión de que dentro de un estudio metabólico del cáncer es importante tomar en cuenta la participación de los aminoácidos y el efecto que los fármacos en desarrollo puedan tener sobre sus funciones en pro o en contra de la enfermedad.

### **1.3. Especies reactivas de oxígeno en cáncer**

El término especies reactivas de oxígeno (*ROS*, por sus siglas en inglés) se refiere a derivados inestables y reactivos de oxígeno, generados como subproducto de procesos metabólicos normales; incluyen al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^-$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), principalmente actuando como segundos mensajeros en la señalización celular y son esenciales para diversos procesos biológicos tanto en células normales como en las cancerosas. Es importante destacar que aunque las *ROS* pueden beneficiar la progresión de la enfermedad, también pueden provocar la muerte de las células cancerosas; por eso es relevante que los fármacos que actúen sobre esta vía, logren aumentarlas a un nivel donde se pueda llegar a la muerte de las mismas [33]. En cáncer, los niveles de *ROS* aumentan principalmente como consecuencia de la expresión anormal de enzimas y el metabolismo alterado. Se ha observado que en estas células, existe un incremento en el potencial de membrana celular, lo que conduce a un aumento de la presencia electrones y una relación anormal de

NADH/NAD<sup>+</sup>, teniendo como consecuencia una producción significativa del radical O<sub>2</sub><sup>•</sup> [33].

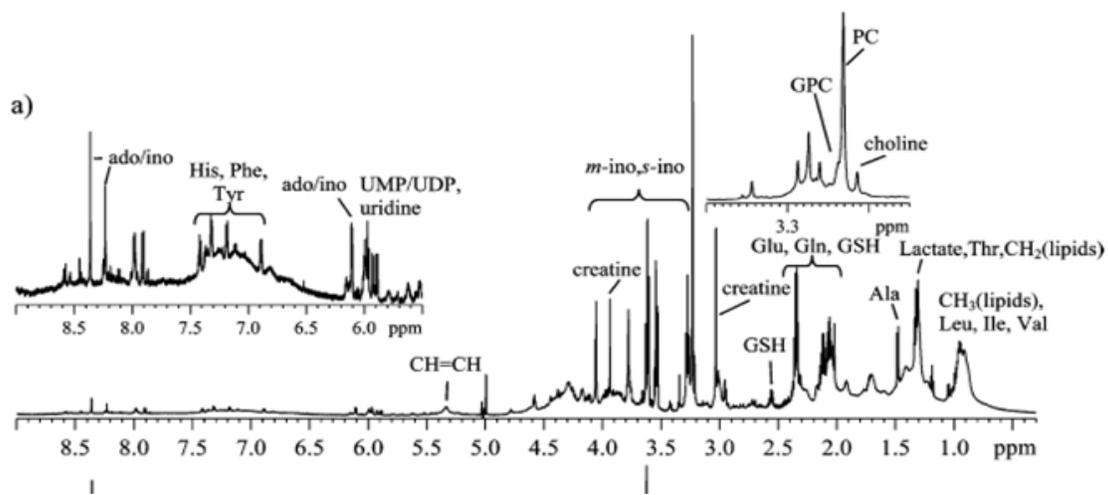
En resumen, estas se han relacionado con el ciclo celular tumoral, progresión, proliferación, supervivencia celular, apoptosis, morfología celular, adhesión celular, motilidad celular, angiogénesis y mantenimiento del tumor [34]. Las células se benefician de los cambios en estos procesos porque les confiere el suministro de los componentes básicos para la síntesis de macromoléculas y la absorción de nutrientes necesarios para su replicación [18]. En conjunto, estas vías que se encuentran alteradas, son parte del metabolismo de las células cancerosas, en otras palabras, constituyen su metaboloma. El metaboloma es el conjunto de metabolitos presentes en una célula o tejido bajo condiciones específicas [11]; por lo que la metabolómica será entonces, en este caso, el estudio de los metabolitos dentro y fuera de las mismas [35].

#### **1.4. <sup>1</sup>H RMN en estudios de metabolómica**

En una enfermedad como el cáncer, la comprensión del metaboloma de estas células, podría ser de utilidad en la detección de la enfermedad, en el desarrollo de fármacos y su estudio puede llevarse a cabo empleando técnicas analíticas como: espectrometría de masas, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H RMN), entre otras [36].

La técnica de <sup>1</sup>H RMN permite el análisis directo y no destructivo de células, tejidos y biofluidos, de manera cuantitativa, automatizada y reproducible; permite obtener información simultánea y en tiempo real si es necesario, de una amplia gama de metabolitos involucrados en diferentes vías bioquímicas, útiles para evaluar la respuesta de células tumorales ante agentes anticancerosos y proporcionar ideas sobre los mecanismos de acción o resistencia de fármacos [37]; además de la posibilidad de utilizar diferentes núcleos en el análisis como carbono, nitrógeno y fósforo [38].

En la **Figura 7**. se muestra un ejemplo de un espectro de  $^1\text{H}$  RMN obtenido para una muestra de células MG-63 (osteosarcoma) tratadas con cisplatino, con la identificación de algunos metabolitos presentes [37].



**Figura 7.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN obtenido para las células MG-63 tratadas con cisplatino (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{pH}=7.4$ ) [37].

Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de muestras biológicas, y en general para estudios de metabolómica, son más complejos por la cantidad de señales presentes, por lo que la interpretación no sigue el procedimiento habitual que cuando se trata una única molécula orgánica. Primero, se realiza un preprocesamiento de los espectros, donde se incluye la referenciación y presentación de datos, la eliminación de regiones no deseadas, normalización, entre otros [39]. Posteriormente, se emplean bibliotecas y bases de datos para hacer la identificación de los metabolitos, teniendo entre las clases de compuestos identificados en muestras de origen biológico: aminoácidos, carbohidratos, nucleótidos, aminas, intermediarios del Ciclo de Krebs, entre otros [40].

La  $^1\text{H}$  RMN aplicada a estudios de metabolómica presenta ventajas tales como que el análisis es no destructivo, automatizable, altamente reproducible, cuantitativa, no requiere derivatización de la muestra, la manipulación de la misma es mínima, permite la identificación de compuestos desconocidos y una característica que ha

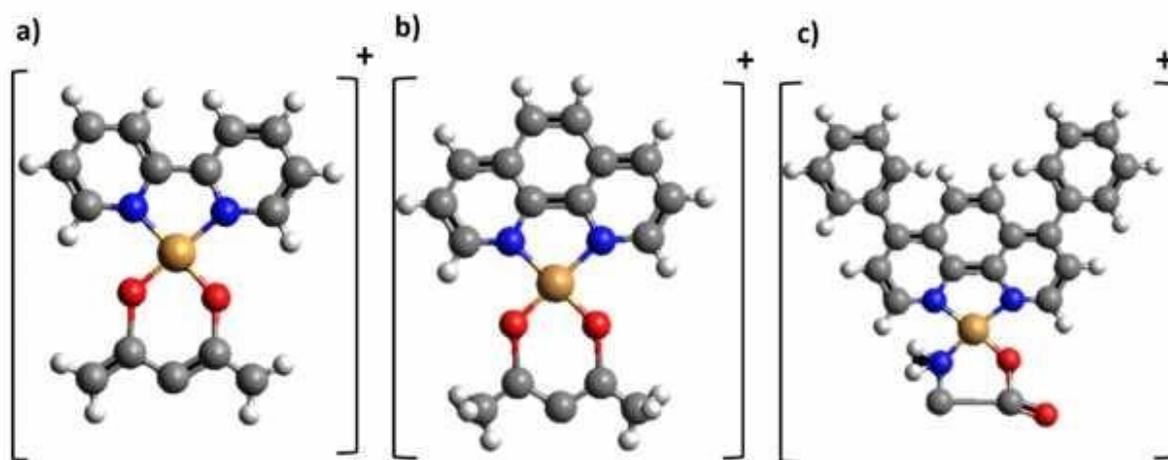
tomado reelevancia en los últimos años es que permite el análisis de células y sistemas vivos [38]. Asimismo presenta ciertas desventajas entre las que destacan su baja sensibilidad, baja selectividad, al presentar superposición de los picos de algunos de los metabolitos presentes en la muestra, así como el costo elevado de la instrumentación empleada [38].

El uso de esta técnica, ha tomado reelevancia en el área farmacéutica, ya que resulta útil en casi todo el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos, que abarca desde la identificación de compuestos activos hasta la farmacovigilancia de los mismos. referencia [41].

Cuando se desarrolla un fármaco se busca que presente una buena actividad biológica y, si es el caso, una mayor actividad en comparación con el del medicamento ya aprobado. En el caso del cáncer, los fármacos por excelencia son el cisplatino y sus derivados, sin embargo, el cisplatino presenta efectos secundarios como hipostenia, astenia, pérdida de peso, alteraciones del ritmo cardiaco, nefrotoxicidad, ototoxicidad, hepatotoxicidad, entre otros [42] y, es por ello, que se han diseñado fármacos que puedan reemplazar al cisplatino con una actividad biológica igual o mejorada, pero reduciendo los efectos adversos. Algunos de estos fármacos, tienen en su estructura otros metales y, de forma más específica, metales esenciales, los cuales se encuentran naturalmente presentes en el cuerpo y tienen asociados procesos homeostáticos en el mismo, con la hipótesis de que esto pueda disminuir su toxicidad [43]. Tal es el caso de moléculas que en su estructura integran al cobre(II) y que han resultado ser atractivas como agentes anticancerígenos [44]. El cobre es un elemento esencial que se encuentra en el cerebro, riñón, corazón e hígado del cuerpo humano [45]; es importante para la función de varias enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo energético, la respiración y la síntesis de ADN; en particular del citocromo oxidasa y el superóxido dismutasa (SOD) [46]. Las principales funciones biológicas del cobre implican reacciones redox [47], como cofactor catalítico en la química redox de la mitocondria [48], respiración celular [49] en la absorción de hierro [50] y en la eliminación de radicales libres [51].

## 1.5. Casiopeínas<sup>®</sup>

La necesidad de encontrar una alternativa más efectiva y menos tóxica que los quimioterapéuticos actuales es de gran importancia, por ello en el grupo de trabajo se han desarrollado una serie de compuestos de coordinación a base de metales esenciales denominados Casiopeínas<sup>®</sup> (**Figura 8**), los cuales son quelatos mixtos de cobre(II), cuya fórmula general es  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$  [52], donde N-N corresponde a bipyridinas o fenantrolinas sustituidas (ligantes primarios); N-O corresponde a aminoácidos o péptidos, y O-O corresponde a acetilacetato o salicilaldehidato (ligantes secundarios) [53,54,55].



**Figura 8.** Estructuras generales de las familias de las Casiopeínas<sup>®</sup>. a)  $[\text{Cu}2,2'$ -bipiridina)(acetilacetato)] $\text{NO}_3$ , b)  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$  y c)  $[\text{Cu}(4,7\text{-difeníl-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ .

En la actualidad, se han sintetizado más de 100 **Casiopeínas<sup>®</sup>**, las cuales se agrupan en subfamilias tal como se muestra en la **Tabla 1** [54].

**Tabla 1.** Resumen de las subfamilias de las Casiopeínas<sup>®</sup> con su fórmula general [54].

Subfamilia y clave		Fórmula general
I	CasI-(N-O)	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
II	CasII(N-O)	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
III	CasIII-Xa o xa	[Cu(N-N)(acac)]NO <sub>3</sub>
	CasIII-Xs o xs	[Cu(N-N)(salal)]NO <sub>3</sub>
IV	CasIV-(N-O)	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
V	CasV-(N-O)	[Cu(5-R-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
VI	CasVI-(N-O)	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
VII	CasVII-(N-O)	[Cu(1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
VIII	CasVIII-(N-O)	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
IX	CasIX-(N-O)	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)]NO <sub>3</sub>

N-O: α-aminoacidato; acac, **a**: acetilacetato, salal, **s**: salicilaldehidato; N-N: diimina sustituida, donde x = letra minúscula, bipiridina o X = letra mayúscula, fenantrolina. La molécula de agua coordinada ha sido eliminada de las fórmulas por claridad.

Estudios como, la caracterización, estabilidad, determinación de concentraciones inhibitorias medias (CI<sub>50</sub>) en líneas celulares tumorales [56], estudios cuantitativos de correlación estructura actividad (QSAR), así como la evaluación *in vivo* para evaluar la eficacia antitumoral y la determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), ya se encuentran reportados para algunos de estos compuestos [56,57,58,59], y se ha observado que, presentan actividad genotóxica [60] citotóxica [61] y antitumoral [60,61]; además

que, aquellas Casiopeínas<sup>®</sup> con fenantrolina como ligante primario, presentan mayor actividad biológica que las que tienen biperidina; mientras que el ligante secundario tiene menor influencia en la misma y se propone que, los tres anillos aromáticos de la fenantrolina, permiten una mayor afinidad con el ADN, por ejemplo [61].

### 1.5.1. Mecanismo de acción de las Casiopeínas<sup>®</sup>

Las **Casiopeínas<sup>®</sup>** han sido estudiadas por diversas técnicas con el fin de elucidar su mecanismo de acción en el organismo humano. Hay evidencia que sugiere que estos compuestos son capaces de inhibir la proliferación celular e inducir a la muerte de la célula por apoptosis. Además se observó en la línea tumoral HeLa (cervicouterino), en presencia de uno de los compuestos, **CasII-gly**, -la cual contiene dentro de su estructura como ligante primario fenantrolina y como ligante secundario glicina-, los procesos de crecimiento celular se ven apagados mientras que aquellos de muerte celular se encienden [62]. También se ha determinado que pueden conducir a la autofagia [63,64]. Se propone que estos compuestos tienen dos vías de acción principales, los cuales incluyen a la mitocondria [56] o al núcleo [65,66]. En diversos estudios en células tumorales, se ha encontrado que hay generación de *ROS* que en principio podrían derivar del efecto de estas sobre la mitocondria, así como daño al ADN a través de una interacción directa con las **Casiopeínas<sup>®</sup>** [67,68].

En los experimentos encaminados a obtener la  $CI_{50}$  de diversas líneas cancerosas, se observó que algunos compuestos de la familia de las **Casiopeínas<sup>®</sup>**, son capaces de consumir glutatión como fuente de electrones para catalizar reacciones de tipo Fenton, causando una sobreproducción de *ROS* y, en consecuencia la disfunción mitocondrial y subsecuente muerte celular [68, 69].

El efecto observado a nivel mitocondrial sugiere, también, que podría intervenir en procesos metabólicos de las células cancerosas. Por ejemplo, el bloqueo de la replicación del ADN por **CasII-gly** en experimentos de larga duración (24-72 h) en células tumorales, éste afecta severamente la *OXPHOS* [70].

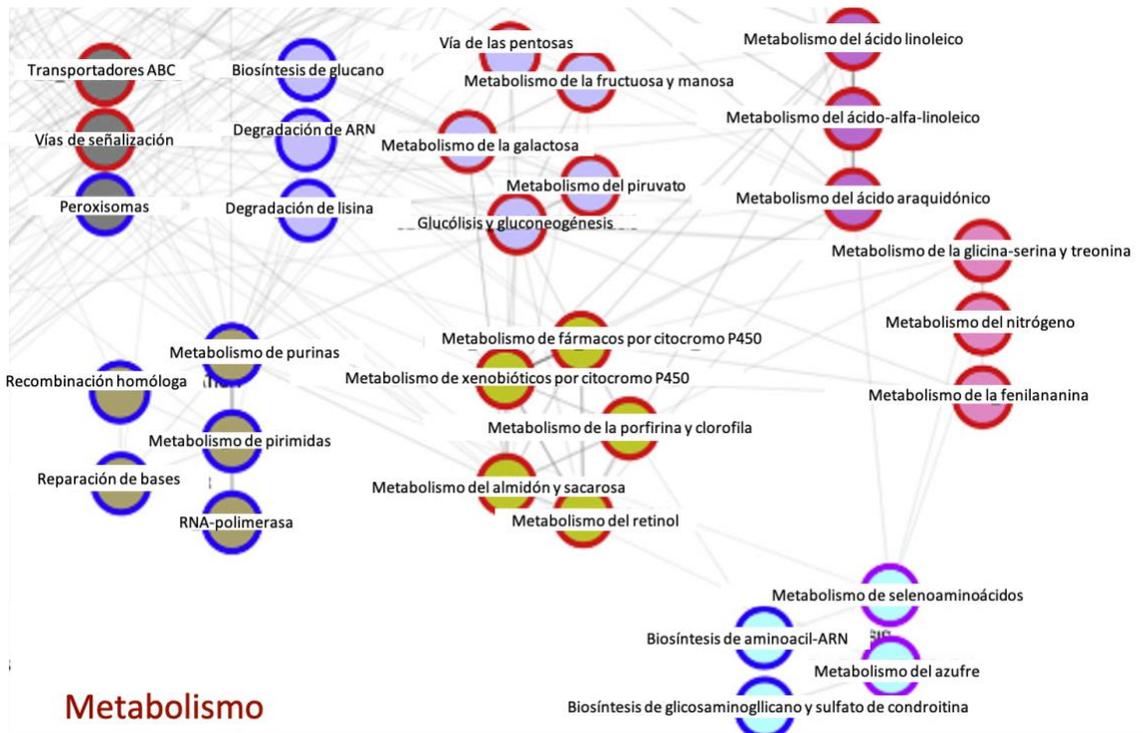
## 1.6. Casiopeínas® y su efecto sobre el metabolismo celular

En 2012, Moreno-Sánchez y colaboradores, realizaron un estudio empleando la **CasII-gly** sobre células AS-30D (hepatocarcinoma de ratón), donde se evaluó la actividad de diferentes enzimas involucradas en la glucólisis como la enzima hexocinasa II (HKII), enzima que regula la transformación de glucosa a glucosa-6-fosfato en el primer paso de la glucólisis y, determinaron que en un periodo de 60 min, una concentración de 100  $\mu\text{M}$  del compuesto es suficiente para modificar e inhibir las actividades glucolíticas de estas células sin afectar la viabilidad ni los niveles de glutatión de las mismas. En este mismo estudio y con el mismo compuesto en concentración 5  $\mu\text{M}$ , evaluaron la actividad de la enzima HKII en células HeLa entre 24 y 72 h, observando que su actividad es inhibida del 77- 93 % durante este tiempo, y que esta inhibición se acompaña de una disminución en el flujo glucolítico y en el proceso de OXPHOS.

Como conclusiones globales de este trabajo se propuso que la enzima HKII fue la única enzima glucolítica afectada por el tratamiento con **CasII-gly**, además de que fue un inhibidor más potente de la HKII que compuestos como el 3-bromopiruvato (3BrPyr), cisplatino, entre otros y que el blanco de este compuesto fue en principio la mitocondria, mientras que la glucólisis fue un objetivo secundario del mismo [71].

En estudios más recientes, utilizando el ensayo de microarreglos en cultivos de células tumorales HeLa tratada con **CasII-gly**, se identificaron vías biológicas que se perturban después del tratamiento (**Figura 9**) y se encontró que el metabolismo de los carbohidratos y aminoácidos fue perturbado, presentando vías a la alza de glucólisis y gluconeogénesis, fructosa, manosa, galactosa y piruvato, así como alteraciones en el metabolismo de lípidos, entre otros [72]<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>El estudio presentado anteriormente (microarreglos), empleando la **CasIII-ia**, se encuentra en proceso.



**Figura 9.** Red de vías metabólicas perturbadas en células HeLa, después del tratamiento con **CasII-gly**. El color del borde representa el tipo de perturbación: rojo para la regulación positiva, azul para la regulación negativa y púrpura para los efectos mixtos [72].

Por otro lado, también se han realizado estudios empleando la **CasII-gly**, **CasIII-Ea** y la **CasIII-ia** en células SK-N-SH (neuroblastoma), se observó que estos compuestos disminuyen la concentración de GSH después de las 6 h de incubación con las células; además, se observa un daño mitocondrial de entre 30 - 35 % que resulta en una sobreproducción de ROS a partir de las 4 h de exposición, presentando un comportamiento similar al del cisplatino. Se propone que estos compuestos son capaces de inducir un daño a las células tumorales en tiempos relativamente cortos [73].

En este trabajo se describen los resultados sobre el efecto de las **Casiopeínas®** sobre el metabolismo celular tumoral, y se complementa con el estudio del perfil metabólico de células MDA-MB-231 cuando se administra el tratamiento con la **Casiopeína® CasIII-ia**.

## **Capítulo 2. Justificación**

## 2. Justificación

En 2018, el cáncer se ha catalogado como la segunda causa principal de muerte a nivel mundial, provocando un estimado de 9.6 millones de muertes, o visto de otra manera, produce una de cada seis muertes en el mundo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) [74]. En particular, el cáncer de mama es un tipo de cáncer muy común que representa la segunda causa de muerte en mujeres y dónde la tasa de supervivencia es de 5 años con el 27%, para su variante metastásica [75].

Las variantes metastásicas de los tipos de cáncer, han representado un reto para la comunidad científica, pues algunos de los medicamentos existentes no resultan tan efectivos ante este tipo de células, además de que se ha observado en la mayoría de los casos el desarrollo de resistencia por parte de las células cancerosas a los tratamientos [76]. Adicionalmente, algunos de los estudios para evaluar los efectos de los fármacos en células metastásicas, sólo se realizan a las 24 h o más, desconociendo el efecto a tiempos más cortos [27].

El conocimiento detallado de la patología, en este caso de su metabolismo, proporciona oportunidades para el desarrollo de métodos nuevos o mejorados de diagnóstico y tratamiento. Aunado a este propósito, el desarrollo de las **Casiopeínas**<sup>®</sup>, ha proporcionado una buena alternativa ante los antineoplásicos actuales, debido a la actividad biológica que presentan, los mecanismos celulares en los que se ven involucradas cuando se administran en células cancerosas, además de que existe evidencia de que los principales blancos incluyen la mitocondria y el núcleo celular [75], lo que podría impedir su proliferación/división [77,78,79,80]. Al tener las **Casiopeínas**<sup>®</sup> estas dianas biológicas en las células cancerosas, brinda la posibilidad de que se observe un efecto a nivel metabólico, y si es así, se podría analizar si ese efecto es consecuencia de los mecanismos de acción hasta ahora propuestos o pudieran ser parte de alguno aún no estudiado.

Entre los compuestos más estudiados de esta familia, está la **CasIII-ia** que, aunque no es de las más activas, ha demostrado tener baja toxicidad, lo que la ha posicionado en fase clínica I, por lo que también se eligió para estudiarla durante este proyecto.

En este trabajo se emplea la técnica de  $^1\text{H}$  RMN en una de sus aplicaciones más novedosas, como los estudios metabólicos *in vitro*, en combinación con métodos estadísticos multivariados basados en métodos de clasificación, para obtener patrones de comportamiento en las muestras asociados al tratamiento de las **Casiopeínas® CasIII-ia** y **CasII-gly** sobre la línea celular MDA-MB-231 y posteriormente determinar la concentración de los metabolitos asociados a los desplazamientos químicos que generan las diferencias.

## **Capítulo 3. Hipótesis y objetivos**

## 3.1. Hipótesis

El tratamiento de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con las **Casiopeínas® CasIII-ia** y **CasII-gly** promoverá cambios en la presencia y concentración de metabolitos asociados a rutas metabólicas importantes (glucólisis, gluconeogénesis, vía de las pentosas, entre otros) por efecto del metalofármaco, mismos que serán observables por  $^1\text{H}$  RMN .

## 3.2. Objetivos

### Objetivo general

Determinar por medio de  $^1\text{H}$  RMN, la concentración de metabolitos en la línea celular tumoral MDA-MB-231 incubadas a diferentes tiempos con las **Casiopeínas® CasII-gly** y **CasIII-ia**.

### Objetivos particulares

- Definir la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ), la cual será la cantidad a administrar del cisplatino y de las **Casiopeínas®** en la línea tumoral MDA-MB-231, mediante el método de MTT.
- Evaluar la viabilidad de la línea celular ya mencionada, al administrar la  $CI_{50}$  del cisplatino, de la **CasIII-ia** y de la **CasII-gly**, por medio de azul tripano a los minutos 0,20,40,60 y a las 2,4 y 6 horas.
- Realizar la adquisición de los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de las muestras incubadas a los 20 y 40 min.

- Realizar los análisis multivariantes sobre los datos de espectroscopía para determinar similitudes o diferencias entre las muestras de células sin tratamiento, con cisplatino y las expuestas a la **Casiopeínas®** en los tiempos de incubación.
- Identificar y cuantificar los metabolitos en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de las muestras.
- Analizar cuáles son las vías metabólicas mayormente impactadas en la línea celular por el cisplatino y por las **Casiopeínas®** empleadas por los métodos: Análisis cuantitativo de enriquecimiento (Quantitative enrichment analysis-QEA) y análisis de enriquecimiento de vía (Pathway enrichment analysis-PEA).

## **Capítulo 4. Material y métodos**

## 4. Material y métodos.

### 4.1. Diseño experimental

Para este trabajo se empleó la línea celular MDA-MB-231 (mama hormono-independiente del tipo denominado triple negativo).

Para la evaluación de la línea celular se tuvieron: como controles, células sin tratamiento y células tratadas con cisplatino (medicamento, usado como compuesto de referencia); los compuestos de interés fueron la **Casiopeínas® CasIII-ia** y la **CasII-gly** (Tabla 2) que fueron previamente sintetizadas y caracterizadas mediante análisis elemental (AE), infrarrojo (IR) y UV-visible (UV) por Bravo-Gómez de acuerdo con los procedimientos descritos en la patente<sup>1</sup> [53,54,55].

Los ensayos se realizaron incubando la línea celular con y sin tratamiento a dos tiempos: 20 y 40 minutos.

<i>Clave del Compuesto</i>	<i>Sustituyentes del ligante primario/ secundario</i>	<i>Fórmula condensada</i>
<b>CasII-gly</b> 	4,7-dimetil fen	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> Cu <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O
<b>CasIII-ia</b> 	4,4-dimetil bipy / acetilacetonato	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Cu

**Tabla 2.** Clave y fórmula condensada de las **Casiopeínas®** a evaluar.

<sup>1</sup> Más información acerca de las **Casiopeínas®** empleadas, se encuentra en el **Anexo A**.

## 4.2. Proliferación de la línea celular

La línea celular se descongeló a temperatura ambiente agregando medio Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con la mezcla de nutrientes F-12 (DMEM-F12) marca Biowest<sup>®</sup>, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Biowest<sup>®</sup>), 1% antibiótico-antimicótico (ATCC<sup>®</sup>) y 0.5% de aminoácidos no esenciales (GIBCO<sup>®</sup>). Las células se depositaron en un tubo Falcon de 15 mL se centrifugaron a 3500 xg durante 5 min, después de lo cual se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL del medio preparado. Las células resuspendidas se colocaron en una botella de cultivo CORNING<sup>®</sup> de 75 cm<sup>2</sup>, agregando 7 mL de medio adicionales para su crecimiento. Posteriormente se introdujeron a la incubadora a 37 °C y 5 % de atmósfera de CO<sub>2</sub>. Una vez que las células llegaron al 80 % de confluencia, se procedió a despegar las células con verseno (KCl, EDTA, NaCl y Tris-HCl) y a realizar el conteo de las mismas por medio de azul tripano al 0.4 % empleando una cámara de Neubauer. Su cultivo posterior en placas de 96 pozos se empleó para la determinación de la CI<sub>50</sub> de los compuestos, así como en cajas petri de 10 cm para los ensayos de metabolómica.

## 4.3 Determinación de la concentración inhibitoria media de los compuestos (CI<sub>50</sub>)

Con la finalidad de establecer las concentraciones a administrar en los ensayos tanto del cisplatino como de las **Casiopeínas**<sup>®</sup>, se determinaron las CI<sub>50</sub> asociadas a cada uno para cada una de las líneas celulares establecidas. Esto se realizó por medio del ensayo de MTT (Mosmann 1983), el cual se basa en la reducción del colorante de tetrazolio MTT bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a su correspondiente sal de formazán insoluble de color púrpura por medio de enzimas deshidrogenasas; este proceso sólo puede llevarse a cabo en células vivas, por lo que resulta un método atractivo para ensayos de viabilidad y citotoxicidad [81].

De manera breve, el procedimiento consiste en sembrar en una placa de 96 pozos 10,000 células por cada uno, agregando 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM-F12 suplementado e incubando a 37°C y 5 % de  $\text{CO}_2$  las mismas durante 24 h. Posteriormente, se retiró el medio de toda la placa y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de medio a los pozos control y 90  $\mu\text{L}$  de medio más 10  $\mu\text{L}$  de las disoluciones de los compuestos en evaluación a los pozos con tratamiento. Se prepararon disoluciones “stock” para cada uno de los compuestos y a partir de éstas, se hicieron cuatro diluciones posteriores las cuales fueron añadidas directamente a la placa. Las células se incubaron durante 24 h después de administrarles los compuestos a 37°C y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Al finalizar el tiempo, se les retiró el tratamiento y se les añadió 30  $\mu\text{L}$  de MTT en una concentración de 5 mg/mL, sin exposición a la luz y se incubaron nuevamente a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 4 h. Después de esto, se les retiró el MTT y se les agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla isopropanol/dodecilsulfato de sodio (SDS) / HCl 1 M para su posterior lectura a 570 nm con el equipo microplate reader (AgileReader®).

Los tratamientos con los compuestos se administraron por cuatuplicado en cada placa y se hicieron tres ensayos de manera independiente.

#### **4.4. Ensayos de metabolómica**

Una vez teniendo la línea celular en confluencia y habiendo ya realizado el ensayo de determinación de  $\text{CI}_{50}$ , se procedió al cultivo de aproximadamente 1 000 000 de células en cajas petri de 10 cm durante 24 h a 37°C y 5 % de  $\text{CO}_2$ , para los tiempos de evaluación establecidos (20 y 40 minutos), cada uno con sus 3 respectivas réplicas. Después de 24 h cuando las células se encontraban adheridas, se comenzaron los experimentos incubando cada una de las cajas petri a los tiempos ya mencionados, con 6 mL de medio DMEM-F12 alto en glucosa para el caso de las células sin tratamiento (control) y con 5.4 mL de medio DMEM-F12 alto en glucosa más 600  $\mu\text{L}$  de la disolución de los compuestos a evaluar (cisplatino, **CasIII-ia** y **CasII-gly**) en la concentración definida por los ensayos de  $\text{CI}_{50}$ .

## **4.6. Evaluación de la viabilidad de la línea celular**

Al finalizar cada uno de los tiempos de evaluación de las células con y sin tratamiento, el medio de crecimiento se recuperó, se hicieron 2 lavados con 2 mL cada uno con disolución amortiguadora de fosfatos (PBS) marca Biowest; posteriormente se adicionaron nuevamente 1.5 mL de PBS y se procedió al raspado de éstas, resuspendiéndolas y transfiriéndolas a tubos eppendorff de 2 mL. Terminado esto, el conteo de las células se realizó con azul tripano al 0.4 % con una cámara de Neubauer, agregando 50 µL de la suspensión celular y 150 µL del colorante. Para el cálculo de la viabilidad celular, se hizo el conteo de las células vivas y muertas presentes en cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara y mediante la siguiente ecuación, se obtuvo el porcentaje:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$

## **4.7. Extracción de metabolitos**

### **4.7.1. Extracción de metabolitos intracelulares**

Una vez realizado el conteo de las células y obtenido el porcentaje de viabilidad para cada ensayo, la suspensión celular se centrifugó a 3500 xg por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el botón celular se mantuvo durante 5 min en un baño de hielo. Después se agregó 1 mL de la mezcla fría acetonitrilo/agua al 50% y se colocaron en el sonicador durante 20 min para finalmente centrifugarse a 14 500 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante de las muestras se recuperó y de éste, se

evaporó el acetonitrilo para después almacenarlas a  $-22^{\circ}\text{C}$  hasta su lectura por  $^1\text{H}$  RMN [82].

#### **4.7.2. Extracción de metabolitos extracelulares**

El medio de crecimiento recuperado después de la incubación de las células a los tiempos establecidos se centrifugó a 3500 g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , posteriormente, se recuperaron 500  $\mu\text{L}$  del mismo y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla fría acetonitrilo/agua al 50%, se homogeneizó y se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, finalmente se centrifugó a 14 500 g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se recuperó y se evaporó el acetonitrilo de las muestras para después almacenarlas a  $-22^{\circ}\text{C}$  hasta su lectura por  $^1\text{H}$  RMN [77].

### **4.8. Preparación de las muestras para la lectura por $^1\text{H}$ RMN**

#### **4.8.1. Preparación de muestras de metabolitos intracelulares**

Las muestras secas de los metabolitos intracelulares extraídos, se descongelaron y se resuspendieron en 700  $\mu\text{L}$  de una disolución amortiguadora de PBS-TSP preparada con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1 mM) /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 mM) / 3-(trimetilsilil)( $^2\text{H}_4$ )propanoato de sodio (TSP) (0.02 mM). Las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron a 12 000 g durante 5 min. El sobrenadante de cada muestra se trasvasó a un tubo de resonancia para su análisis.

#### **4.8.2. Preparación de muestras de metabolitos extracelulares**

Las muestras secas de los metabolitos extracelulares extraídos, se descongelaron y se resuspendieron en 700  $\mu\text{L}$  de la disolución amortiguadora PBS-TPS  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1 mM) /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 mM) / 3-(trimetilsilil)( $^2\text{H}_4$ ) propanoato de sodio (TSP) (1 mM). Las muestras se homogeneizaron y centrifugaron a 12 000 xg durante 5 min, el sobrenadante de cada muestra se trasvasó a un tubo de resonancia para su análisis.

Los espectros de resonancia fueron adquiridos con un espectrómetro *Bruker Avance III* de 700 MHz.

#### **4.9. Experimentos de $^1\text{H}$ RMN**

Todos los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III HD de 700 MHz (frecuencia de precesión del protón: 699.97 MHz), equipado con una criosonda enfriada por Helio y un automuestreador Sample Jet.

Las muestras intracelulares se adquirieron con la secuencia CPMG-presat (cpmgpr1d), 256 scans, 64k puntos complejos del dominio del tiempo con un ancho de ventana de 12 ppm (8403.361 Hz), un tiempo de relajación D1 de 4 s, un tiempo de eliminación de la señal de eco de espín D20 de 0.3 ms y 126 loops de filtro T2.

Las muestras extracelulares se adquirieron con la secuencia protón con pre-saturación (noesygppr1d), 256 scans, 64K puntos complejos del dominio del tiempo con un ancho de ventana de 21 ppm (14705.883 Hz) y un tiempo de relajación D1 de 4 s.

#### **4.10. Pre-Procesamiento de los espectros**

El procesamiento de los espectros adquiridos se realizó con el software *Bruker's TopSpin™ 4.0* donde se realizó la corrección de la línea base, el ajuste de la fase y se empleó una función de apodización exponencial con un factor de 5. Posteriormente se referenciaron a la concentración del TSP y normalizaron al total del área en el software *Chemomx NMR Suite 8.6*, donde se construyó una matriz con los datos realizando un binning cada 0.2 ppm excluyendo el pico correspondiente al agua.

#### **4.11. Procesamiento de los espectros**

Con la matriz de datos, se realizó el análisis quimiométrico (PCA, PLS-DA y OPLS-DA) mediante el software *SIMCA 16.0.1*.

Posteriormente la identificación y cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo mediante el software *Chenomx NMR Suite 8.6*. Primero se realizó la identificación de los metabolitos de acuerdo a las señales encontradas con ayuda de la biblioteca de compuestos incluida con el programa. Posteriormente se asignaron las señales y se cuantificó la concentración de cada especie, esta fue ajustada en cada muestra a un número fijo de células ( $1 * 10^6$ ) para su posterior comparación y análisis.

Los estudios Análisis cuantitativo de enriquecimiento (QEA por sus siglas en inglés) y Análisis de enriquecimiento de vías (PEA por sus siglas en inglés), se realizaron empleando el software *MetaboAnalyst 4.0*.

## **Capítulo 5. Resultados y análisis de resultados**

## 5. Resultados y análisis de resultados

### 5.1. Determinación de la concentración inhibitoria media de los compuestos

A continuación, se presentan las concentraciones evaluadas en la línea celular para cada compuesto (**Tabla 3**). Estas concentraciones se eligieron con base en la  $CI_{50}$  reportada anteriormente para los compuestos y donde se estableció ese valor como central y a partir de ella se propusieron concentraciones por arriba y por debajo de ese valor, para tener un rango donde la  $CI_{50}$  de este trabajo pudiera encontrarse.

En la **Imagen 10** se muestran células MDA-MB-231 en proliferación empleadas para la evaluación de la  $CI_{50}$ .

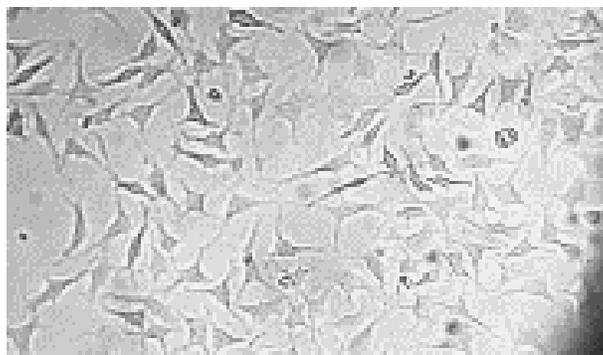
<i>Línea celular</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Concentraciones evaluadas (<math>\mu M</math>)</i>
<b>MDA-MB-231</b>	<b>Cisplatino</b>	10.66, 21.33, 42.66, 85.33
	<b>CasII-gly</b>	0.70, 2.34, 7.02, 23.43
	<b>CasIII-ia</b>	0.68, 2.28, 6.83, 22.77

**Tabla 3.** Concentraciones empleadas de los compuestos para la determinación de  $CI_{50}$  a 24 h en las células MDA-MB-231.

En la **Tabla 4.** se muestra el promedio de las  $CI_{50}$  obtenidas en los tres ensayos independientes para los compuestos en la línea celular de interés a las 24 h.

<i>Línea celular</i>	<i><math>CI_{50}</math> Cisplatino (<math>\mu M</math>)</i>	<i><math>CI_{50}</math> CasII-gly (<math>\mu M</math>)</i>	<i><math>CI_{50}</math> CasIII-ia (<math>\mu M</math>)</i>
<b>MDA-MB-231</b>	21.71	1.55	15.55

**Tabla 4.** Concentraciones inhibitorias medias para los compuestos de interés en la línea celular MDA-MB-231.

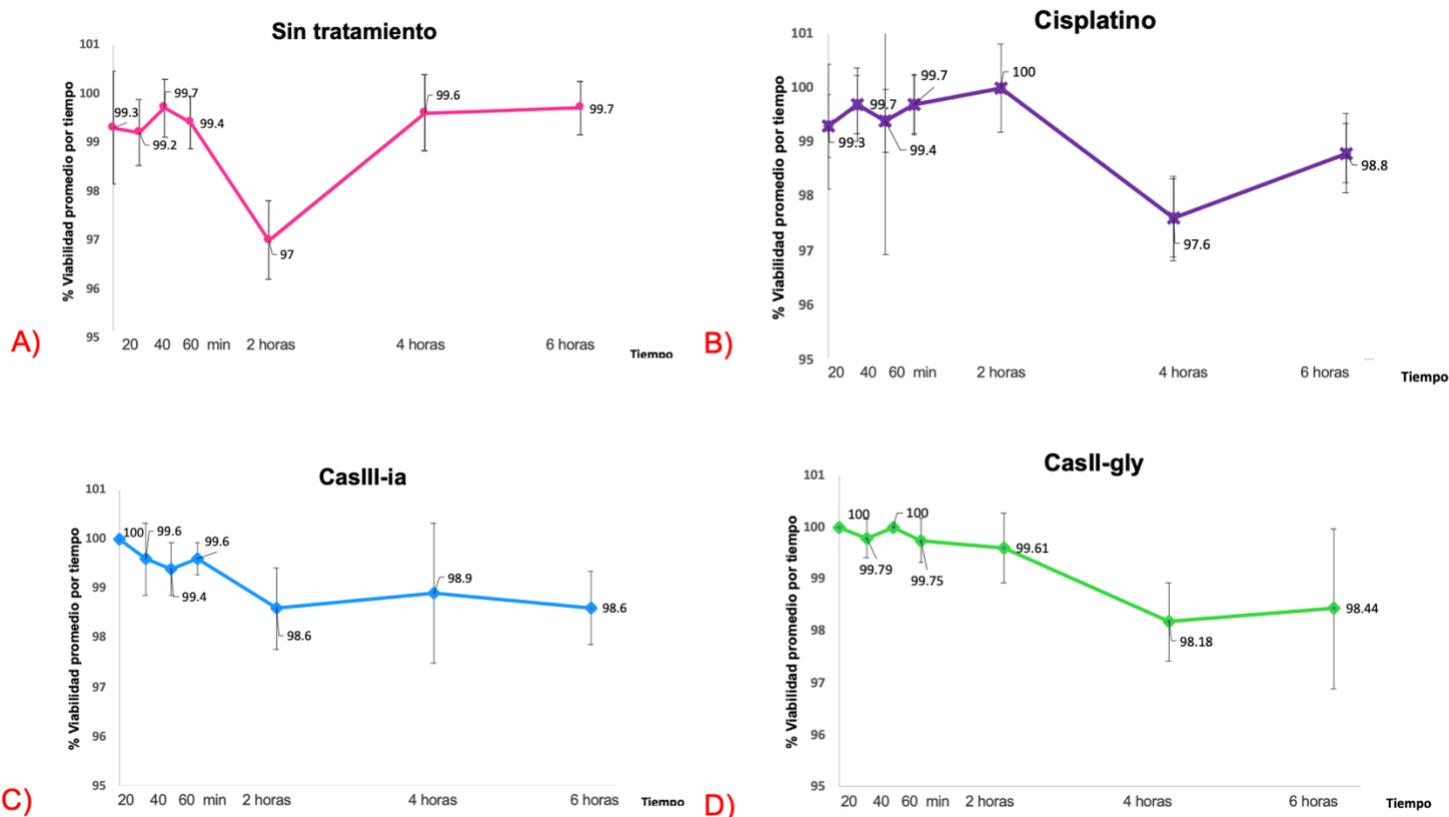


**Figura 10.** Células MDA-MB-231 en proliferación a las que se les administró medio DMEM-F12 alto en glucosa suplementado y 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 5.2. Viabilidad en células sin tratamiento

Con la finalidad de confirmar que las células expuestas a la  $CI_{50}$  no sufrían alteraciones en su viabilidad y garantizar que los metabolitos observados posteriormente por RMN no fueran asociados a muerte celular sino por acción de los tratamientos, se verificó a los tiempos 0, 20, 40, 60, 120 min, 4 y 6 h con y sin tratamiento. La **Gráfica 1** compara la viabilidad de las células MDA-MB-231 con y sin tratamiento a los diferentes tiempos de incubación, donde se empleó la  $CI_{50}$  calculada anteriormente.

Los resultados del conteo de células para el cálculo de la viabilidad para cada una de las tres réplicas realizadas en los tiempos en las células sin tratamiento, así como con los dos compuestos, se encuentran en el **Anexo B**.



**Gráfica 1. A)** Viabilidad promedio de células MDA-MB-231 sin tratamiento, **B)** Viabilidad promedio de células MDA-MB-231 con cisplatino, **C)** Viabilidad promedio de células MDA-MB-231 con **CasIII-ia**, **D)** Viabilidad promedio de células MDA-MB-231 con **CasII-gly**. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida de las 3 réplicas de cada ensayo.

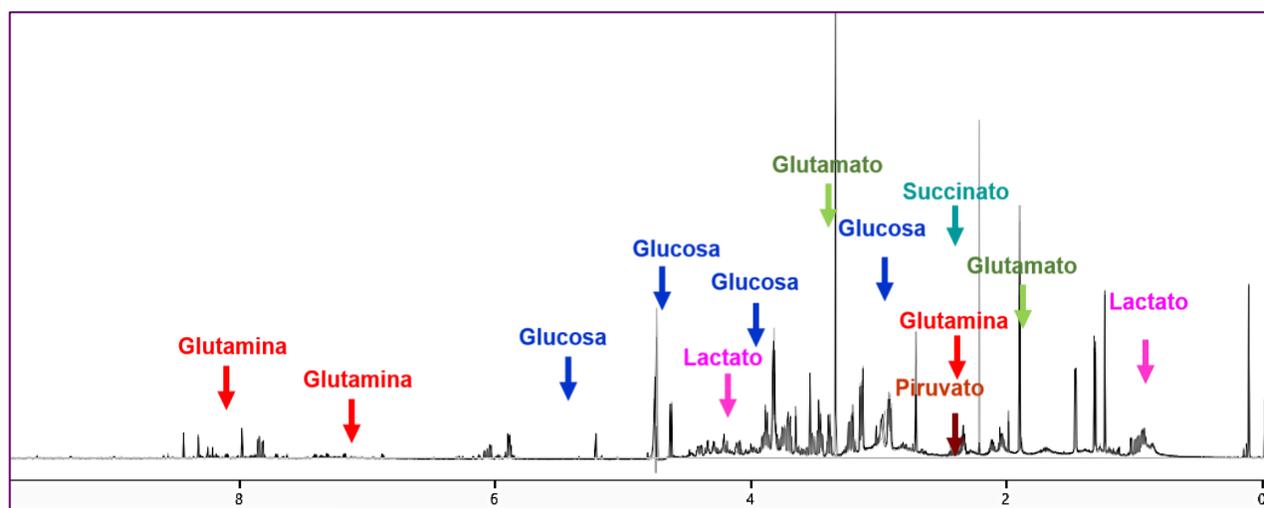
La viabilidad para las células sin tratamiento, se mantuvo arriba del 99% hasta las 2 h donde hubo una disminución de la misma al 97% y posteriormente aumentó nuevamente al 99% donde se mantuvo así hasta las 6 h. En el caso del cisplatino, permaneció arriba del 99% hasta las 4 horas donde disminuyó al 97%, para aumentar de nuevo a las 6 h a 99%. Las **Casiopéínas**<sup>®</sup>, no provocaron una variación considerable de la viabilidad, ya que a lo largo del tiempo se mantuvieron por arriba de 98%. Las variaciones observadas pueden atribuirse al crecimiento de las células, que posiblemente fue diferente en todas las muestras.

La viabilidad de manera general fue aceptable en los cuatro casos pues se mantuvo superior al 97%, por lo que se decidió emplear la  $CI_{50}$  para los experimentos posteriores.

### 5.3. Identificación y cuantificación de metabolitos intracelulares

Una vez concluidos los experimentos de viabilidad, se comenzaron con los estudios de metabolómica por  $^1\text{H}$  RMN. A continuación, se presenta un ejemplo de los espectros obtenidos para las muestras intracelulares en los dos tiempos de evaluación indicando la presencia de señales asociadas a algunos de los metabolitos.

Se puede observar que en la región del espectro que va desde 2-4 ppm es donde se encuentran la mayoría de los metabolitos identificados. En esta región aparecen principalmente los carbohidratos como la glucosa y sus derivados glucosa-6-fosfato, glucosa-1-fosfato; también metabolitos como succinato, glutamina, lactato, entre otros.



**Figura 11.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN (700 MHz, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O 10/90, 25°C, 1D-NOESY-Presat) del extracto intracelular MDA-MB-231 con 20 min de tratamiento con **CasIII-ia** (15.55  $\mu\text{M}$ ).

Algunos de los metabolitos están identificados en el espectro.

Los metabolitos identificados en el medio intracelular, así como su concentración promedio sin tratamiento y a los 20 y 40 min de tratamiento con cisplatino y con ambas **Casiopéinas**<sup>®</sup> se presentan a continuación.

Metabolito	Sin tratamiento 20 min	Sin tratamiento 40 min	Cisplatino 20 min	Cisplatino 40 min	CasIII-ia 20 min	CasIII-ia 40 min	CasII-gly 20 min	CasII-gly 40 min	CasII-gly 120 min
Acetato	0.024	0.015	0.096	0.069	0.116	0.053	0.084	0.054	0.006
Adenosina	0.001	0.003	0.010	0.018	0.016	0.012	0.007	NE	NE
ADP	0.003	0.004	0.009	0.007	0.011	0.012	0.009	NE	NE
Alanina	0.016	0.024	0.071	0.055	0.024	0.026	0.061	0.059	NE
ATP	0.002	0.004	0.006	0.006	0.011	0.012	0.010	0.007	0.062
Citidina	0.008	0.003	0.005	0.017	0.013	0.013	0.016	NE	0.010
Colina	0.001	0.030	0.002	0.051	0.002	0.088	0.003	0.003	0.001
Etanol	0.181	0.076	0.082	0.019	0.010	0.029	0.009	0.046	0.010
Fenilacetato	0.016	0.019	0.050	0.045	0.059	0.066	0.028	0.030	0.018
Fenilalanina	0.003	0.005	0.007	0.007	0.008	0.008	0.009	0.006	0.016
Glicina	0.018	0.030	0.060	0.051	0.087	0.088	0.043	0.047	0.014
Glucosa	0.026	0.027	0.134	0.081	0.112	0.113	0.123	0.115	0.008
Glucosa-6-fosfato	0.022	0.014	0.061	0.051	0.041	0.036	0.073	0.072	0.005
Glutamato	0.038	0.058	0.124	0.112	0.152	0.173	0.077	0.091	0.089
Glutamina	0.007	0.012	0.019	0.020	0.022	0.030	0.022	0.020	0.007
Isoleucina	0.005	0.011	0.017	0.013	0.019	0.020	0.017	0.017	NE
Lactato	0.022	0.035	0.100	0.102	0.087	0.101	0.078	0.080	0.003
Leucina	0.007	0.019	0.024	0.022	0.028	0.031	0.027	0.024	0.002
NAD	0.011	0.010	0.012	0.024	0.019	0.018	0.013	0.018	0.002
Piruvato	0.004	0.006	0.014	0.013	0.017	0.017	0.011	0.014	NE
Succinato	0.001	0.001	0.004	0.022	0.006	0.008	0.004	0.004	0.001
Tirosina	0.003	0.007	0.007	0.007	0.011	0.012	0.012	0.011	0.006
UDP-glucosa	NE	0.002	0.012	NE	0.012	0.010	NE	NE	NE
Uridina	0.009	0.007	0.011	0.033	0.024	0.020	0.025	0.059	NE
Valina	0.006	0.016	0.020	0.018	0.022	0.024	0.020	0.021	NE

NE: No encontrado

**Tabla 5.** Metabolitos identificados con su concentración promedio (mM) en las muestras evaluadas.

En total en las muestras intracelulares se lograron identificar 25 metabolitos.

En el caso de las células sin tratamiento se tiene en general un aumento en la concentración de los metabolitos de los 20 a 40 min, con la excepción del acetato, citidina, glucosa-6-fosfato, NAD<sup>+</sup> y uridina.

En el caso del cisplatino, disminuyen de los 20 a los 40 min las concentraciones del acetato, ADP, alanina, etanol, fenilacetato, glicina, glucosa, glucosa-6-fosfato, isoleucina, leucina, piruvato, UDP-glucosa y valina; se mantienen sin cambio las concentraciones de ATP, fenilalanina y tirosina.

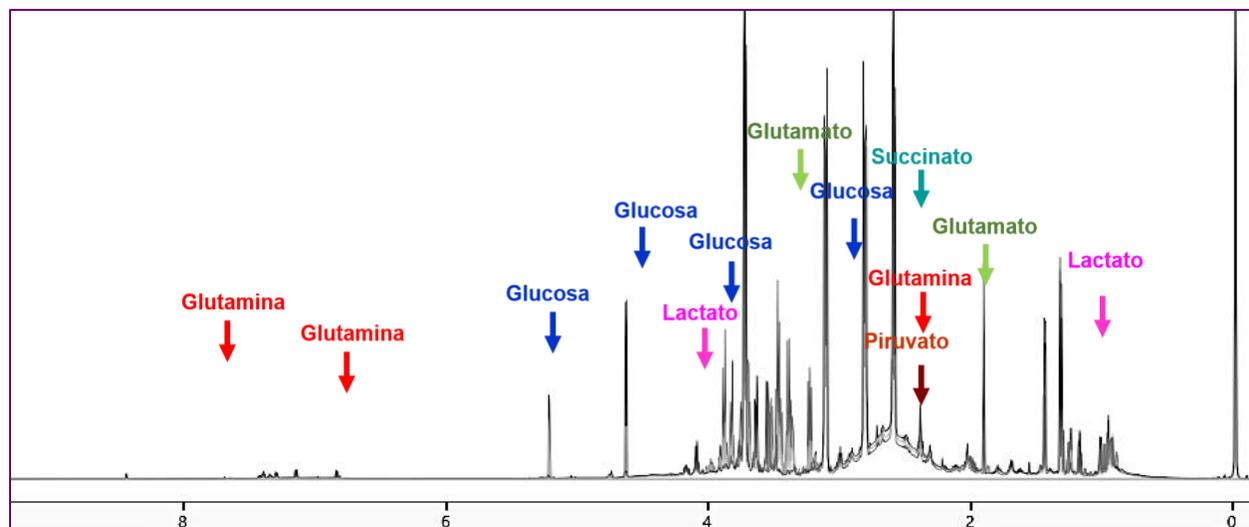
Por otro lado la **CasIII-ia** disminuye de los 20 a 40 min las concentraciones del acetato, adenosina, glucosa-6-fosfato, NAD<sup>+</sup>, UDP-glucosa y uridina; manteniendo constantes los niveles de citidina, fenilalanina y piruvato.

Para la **CasII-gly** se tuvo oportunidad de evaluar hasta los 120 min y se observan cambios interesantes, de los 20 a los 40 min disminuyen las concentraciones de mayor cantidad de metabolitos como son el acetato, adenosina, ADP, alanina, ATP, citidina, fenilalanina, glucosa, glucosa-6-fosfato, glutamina, leucina y tirosina, manteniendo constantes las concentraciones de la colina y el succinato. Para los 120 min se tiene que prácticamente la concentración de todos los metabolitos disminuye con la desaparición de compuestos como la adenosina, ADP, alanina, isoleucina, piruvato, UDP-glucosa, uridina y valina.

#### **5.4. Identificación y cuantificación de metabolitos extracelulares**

La siguiente imagen muestra uno de los espectros de <sup>1</sup>H RMN obtenidos para los experimentos extracelulares en ambos tiempos de evaluación identificando de igual manera las señales de algunos de los metabolitos presentes.

Al igual que el caso anterior, se observa que de las 2-4 ppm es donde se encuentran la mayoría de los metabolitos identificados, destacando la glutamina, succinato, glucosa, glucosa-6-fosfato, principalmente.



**Figura 12.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  10/90,  $25^\circ\text{C}$ , 1D-NOESY-Presat) del extracto extracelular MDA-MB-231 con 20 min de tratamiento con **CasIII-ia** ( $15.55\ \mu\text{M}$ ).

Algunos de los metabolitos están identificados en el espectro.

Los metabolitos identificados así como su concentración promedio a los 20 y 40 min extracelularmente en las muestras sin tratamiento, con cisplatino y con ambas **Casiopeínas**<sup>®</sup> se presentan a continuación.

Metabolito	Sin tratamiento 20 min	Sin tratamiento 40 min	Cisplatino 20 min	Cisplatino 40 min	CasIII-ia 20 min	CasIII-ia 40 min	CasII-gly 20 min	CasII-gly 40 min
Acetato	0.309	0.247	0.230	0.205	0.144	0.297	0.425	0.315
Adenosina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
ADP	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Alanina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.220
ATP	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Citidina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Colina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.069	0.118
Etanol	0.349	0.654	0.583	0.530	0.598	0.685	0.546	0.707
Fenilacetato	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.479	0.252
Fenilalanina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.160	0.141
Glicina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.559	0.288
Glucosa	2.868	2.067	2.101	1.974	1.249	2.729	1.403	3.498
Glucosa-6-fosfato	1.595	1.755	1.155	1.307	0.839	2.458	0.710	2.341
Glutamato	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1.521	1.869
Glutamina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Isoleucina	0.479	0.353	0.372	0.362	NE	NE	0.361	0.467
Lactato	1.371	1.146	1.216	1.152	0.518	1.262	1.169	1.617
Leucina	0.585	0.432	0.501	0.467	0.224	0.273	0.521	0.602
NAD	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Piruvato	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Succinato	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.422	0.451
Tirosina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.050	NE
UDP-glucosa	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Uridina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Valina	0.251	0.326	0.349	0.335	0.219	0.086	0.397	0.513

NE: No encontrado

**Tabla 6.** Metabolitos extracelulares identificados con su concentración promedio(mM) en las muestras evaluadas.

Se identificaron 8 metabolitos en total para las muestras extracelulares.

En el caso de las células sin tratamiento las concentraciones del acetato, glucosa, isoleucina, lactato y leucina disminuyeron.

En las células que se trataron con cisplatino, los metabolitos que aminoraron en concentración fueron el acetato, etanol, glucosa, isoleucina, leucina y valina.

Para los tratamientos con la **CasIII-ia** se tuvo únicamente disminución en la concentración de la valina.

Por otro lado en el caso de la **CasII-gly**, disminuyeron las concentraciones del acetato, fenilacetato, fenilalanina, glicina, lactato y tirosina.

En retrospectiva el hecho de que los compuestos aumentaran la concentración de los metabolitos en el primer tiempo (20 min) intracelularmente a comparación de las células sin tratamiento, podría sugerir que las células al entrar en contacto con el tratamiento pueden estar sufriendo un estrés que provoca una mayor actividad en las rutas metabólicas celulares para tratar de compensar la presencia del fármaco, y a partir de los 40 min, algunos de los metabolitos comienzan a disminuir posiblemente debido a la afectación de las vías metabólicas donde se encuentran involucrados.

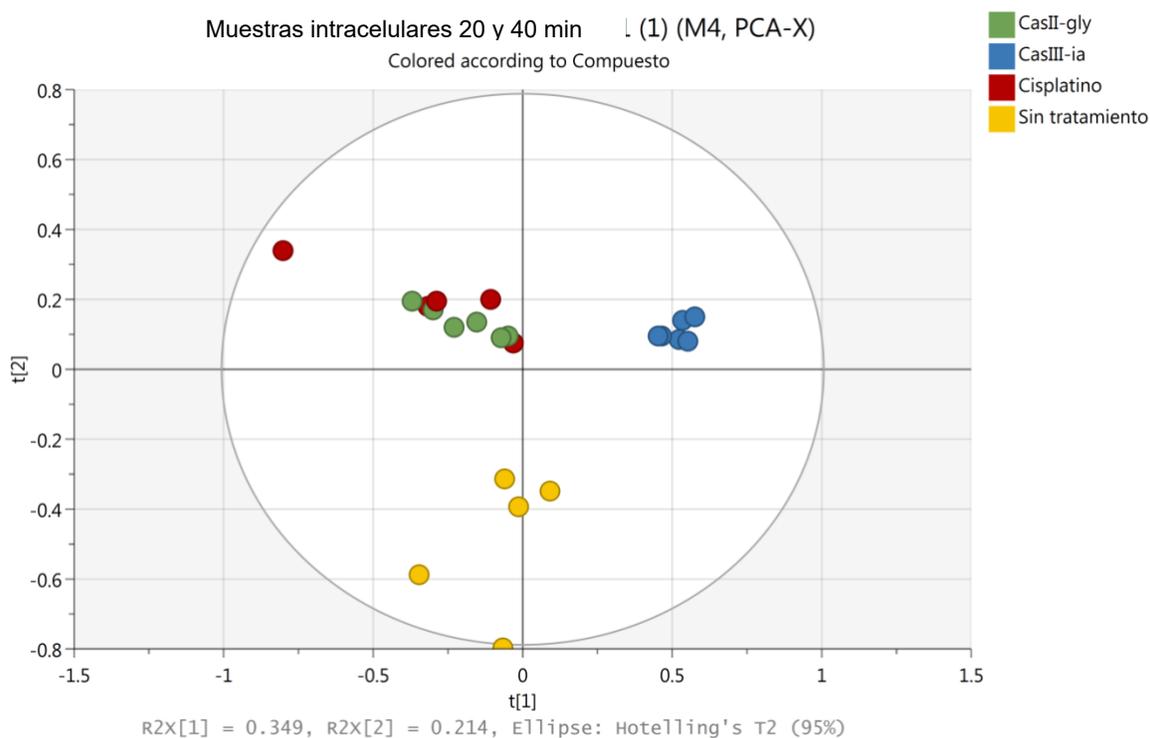
En el caso de los metabolitos extracelulares tiene un efecto contrario, disminuyen y esto probablemente sea porque las células requieren de ellos y los consumen.

La propuesta de una posible generación de estrés en los primeros tiempos después de administrar un tratamiento, ya se propuso por Yu y colaboradores en 2018 para el cisplatino [83].

## **5.5. Análisis quimiométrico de muestras intracelulares**

Una vez identificados y cuantificados los metabolitos se procedió al análisis estadístico multivariado de los mismos con la finalidad de agrupar, clasificar e identificar la mayor fuente de variación entre las muestras para la mayor comprensión de los fenómenos presentes [84]. Entre los métodos multivariados que se realizaron se encuentran, el análisis de componentes principales (PCA), mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (PLS-DA), y proyecciones ortogonales a estructuras latentes (OPLS), entre otros.

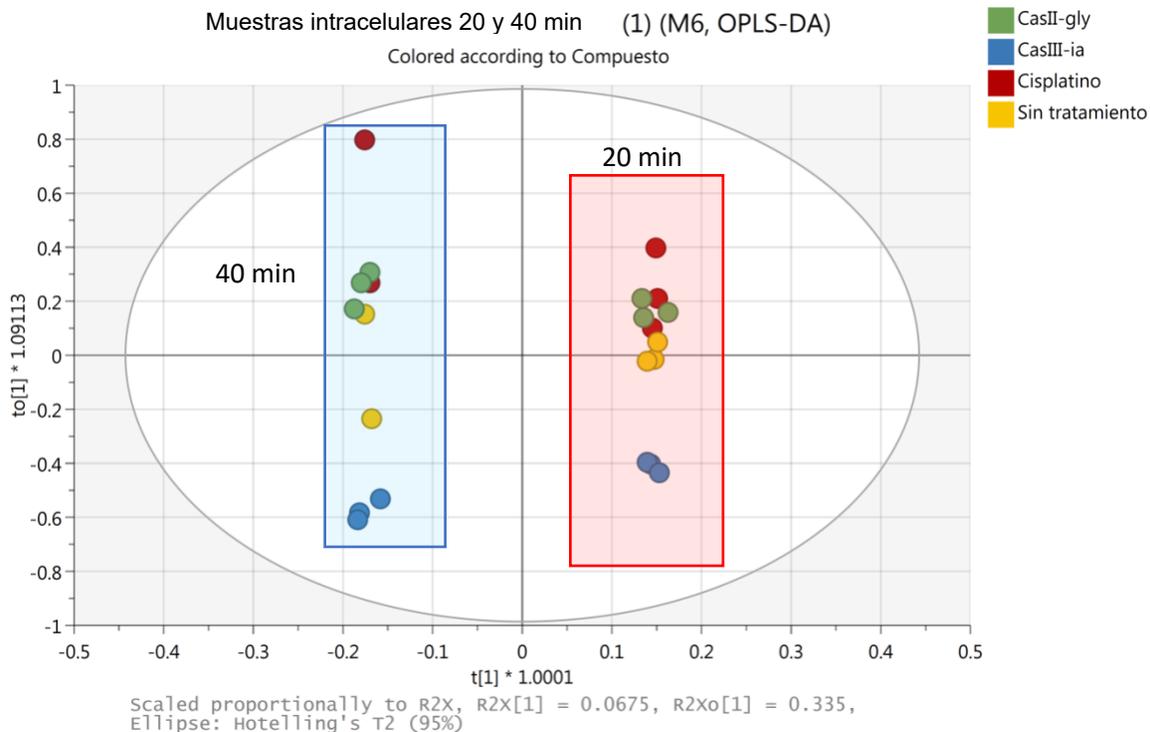
Primero se procedió a realizar el PCA, este método estadístico multivariado reduce el número de datos con la identificación de aquellos que representan la mayor variabilidad dentro de los resultados empleando únicamente la matriz de datos [85]; al no observarse una buena agrupación de los datos, se realizó un PLS-DA que se presenta en la **Figura 13**, obtenido para las muestra intracelulares de 20 y 40 min.



**Figura 13.** PLS-DA de scores modelado con los datos espectrales de las muestras intracelulares de los 20 y 40 min.

El método PLS-DA (**Figura 13**), tiene como objetivo dar a conocer si las muestras control y las de prueba son diferentes, maximizando la separación gráfica entre ellas y de esa manera facilitar el conocimiento de las variables experimentales que contribuyen a esa diferencia [86,87]. Se observa una agrupación entre las muestras tratadas con cisplatino y con **CasII-gly**, mientras que las muestras sin tratamiento y con **CasIII-ia** se encuentran agrupadas de forma independiente.

Por su parte el OPLS-DA reduce estas diferencias a sólo un componente, el cual se representa en el eje x. Para verificar si el tiempo era la característica gracias a la cual se tenía la máxima separación entre las muestras evaluadas se realizó el OPLS-DA para estas y el cual se presenta en la **Figura 14**.



**Figura 14.** OPLS-DA de scores modelado con los datos espectrales de las muestras intracelulares de los 20 y 40 min.

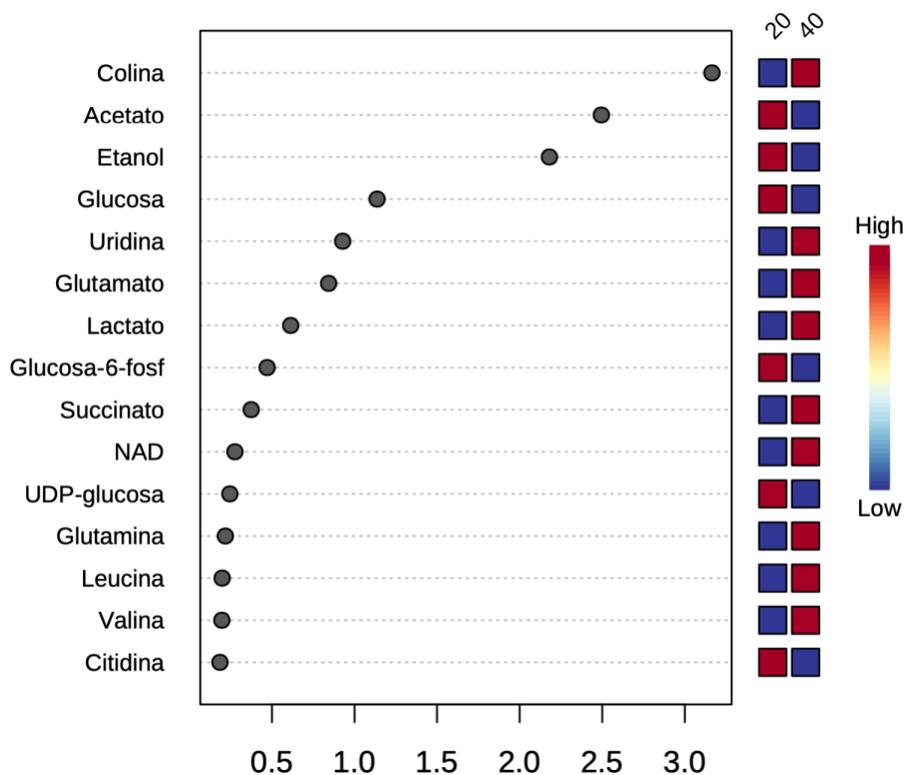
Con el OPLS-DA sigue observándose una ligera agrupación de las muestras con cisplatino y **CasII-gly**, mientras que las muestras de **CasIII-ia** y las que no tienen tratamiento continúan agrupándose de manera independiente. Por lo que se puede sugerir que probablemente el cisplatino y la **CasII-gly** tengan comportamientos similares y se encuentren afectando vías metabólicas análogas (las vías que se encuentran alterando se confirman con los estudios QEA y PEA más adelante). La **CasIII-ia** parece estar teniendo un comportamiento diferente a estos últimos dos. Además se observa una clara separación de las muestras por efecto del tiempo, por lo que efectivamente esta característica es la responsable de la máxima diferencia entre ellas.

En la **Tabla 7** se presenta el resumen de los parámetros para de cada uno de los métodos quimiométricos presentados anteriormente.

<i>Método</i>	<i>N</i>	<i>R<sup>2</sup>X</i>	<i>R<sup>2</sup>Y</i>	<i>Q<sup>2</sup></i>
PLS-DA	22	0.419	0.863	0.543
OPLS-DA	22	0.903	0.997	0.892

**Tabla 7.** Parámetros de los modelos quimiométricos empleados para las muestras intracelulares. *N*: número de muestras usadas para generar el modelo; *R<sup>2</sup>X*: varianza explicada por la matriz X; *R<sup>2</sup>Y*: varianza explicada por la matriz Y; *Q<sup>2</sup>*: predictibilidad.

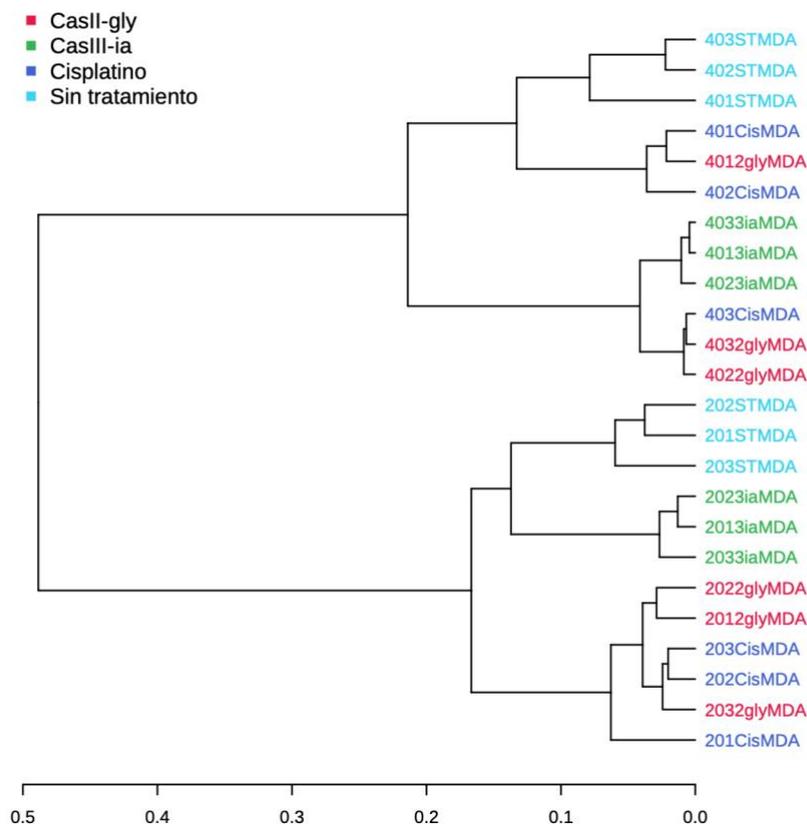
Derivado de la aplicación del método PLS-DA, se obtuvo un gráfico de importancia de la variable para la proyección, VIP por sus siglas en inglés, donde se muestran las variables que más contribuyen a la discriminación de clases en el modelo PLS-DA [88]. La escala de colores representa la abundancia de cada metabolito en las muestras de 20 y 40 min, representando el color rojo una mayor concentración y el color azul una menor concentración.



**Figura 15.** VIP de scores obtenido para los metabolitos intracelulares de los 20 y 40 min.

En el gráfico de VIP se observa que los metabolitos que están influyendo mayoritariamente en el agrupamiento de las muestras son: colina, acetato, etanol, glucosa, uridina, glutamato entre otros, por lo que se espera que las vías metabólicas más afectadas involucren a estas especies (el análisis de estas vías se presentan en los estudios QEA y PEA más adelante).

También se realizó una organización de los datos en grupos incluyendo ambos tiempos (**Figura 16**) para lograr identificar las agrupaciones formadas por aquellas muestras que eran similares unas con otras.

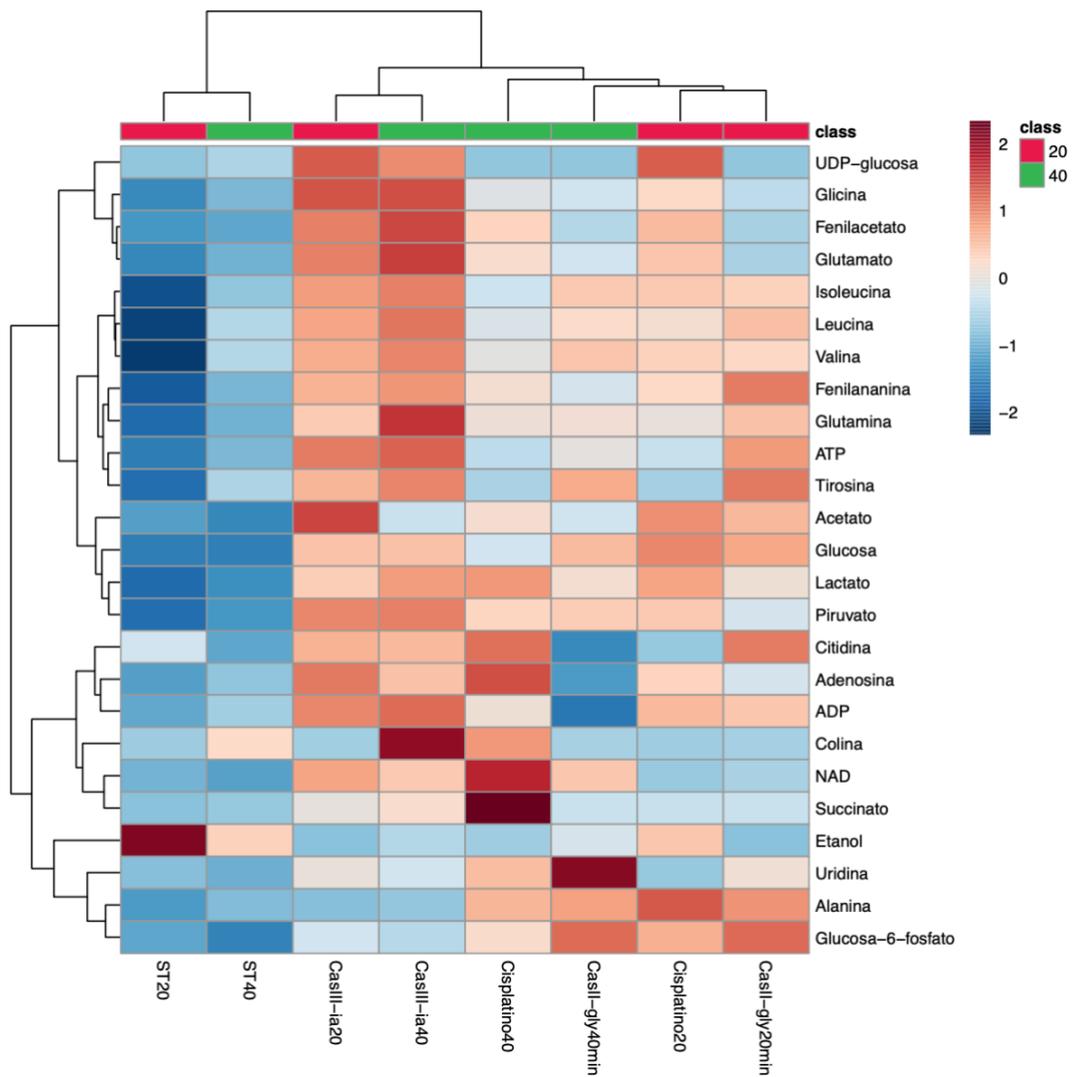


**Figura 16.** Agrupación de las muestras obtenida de acuerdo a los metabolitos intracelulares identificados en los 20 y 40 min.

Se aprecia que las muestras de los 20 min forman un grupo y las de 40 min otro, lo que indica que el tiempo de incubación sí está teniendo un efecto en el perfil metabólico de las células.

También se observa que las células sin tratamiento se agrupan por separado al resto de las muestras lo que coincide con la premisa de que las células sin tratamiento se comportarían de forma diferente al resto. Por otro lado las muestras de la **CasIII-ia** tanto de los 20 como de los 40 min también se encuentran agrupadas por separado, mientras que en el caso de las células con cisplatino y con **CasIII-gly** forman grupos mixtos entre sus mismas muestras, lo que confirma un comportamiento similar entre ellas.

Derivado de los grupos identificados en el diagrama anterior, se logró contruir un mapa de calor o heat map, que permite visualizar la variación de las concentraciones de los metabolitos en cada una de las muestras. En éste se emplea una escala de color de acuerdo al valor estadístico de *valor de p*, parámetro que nos indica la reelevancia de cada uno de los resultados, asociando un *valor mayor de p* a una mayor concentración del metabolito (color rojo) y un *valor menor de p* a una menor concentración de los mismos (color azul). El mapa de calor (**Figura 17**) presenta en el eje horizontal el promedio de las tres repeticiones para cada compuesto en cada tiempo y en el eje vertical aparece todos los metabolitos identificados. El ordenamiento tanto de las muestras como de los metabolitos no se hace de forma aleatoria si no que se ordenan de acuerdo a la semejanza de cada una de las muestras.

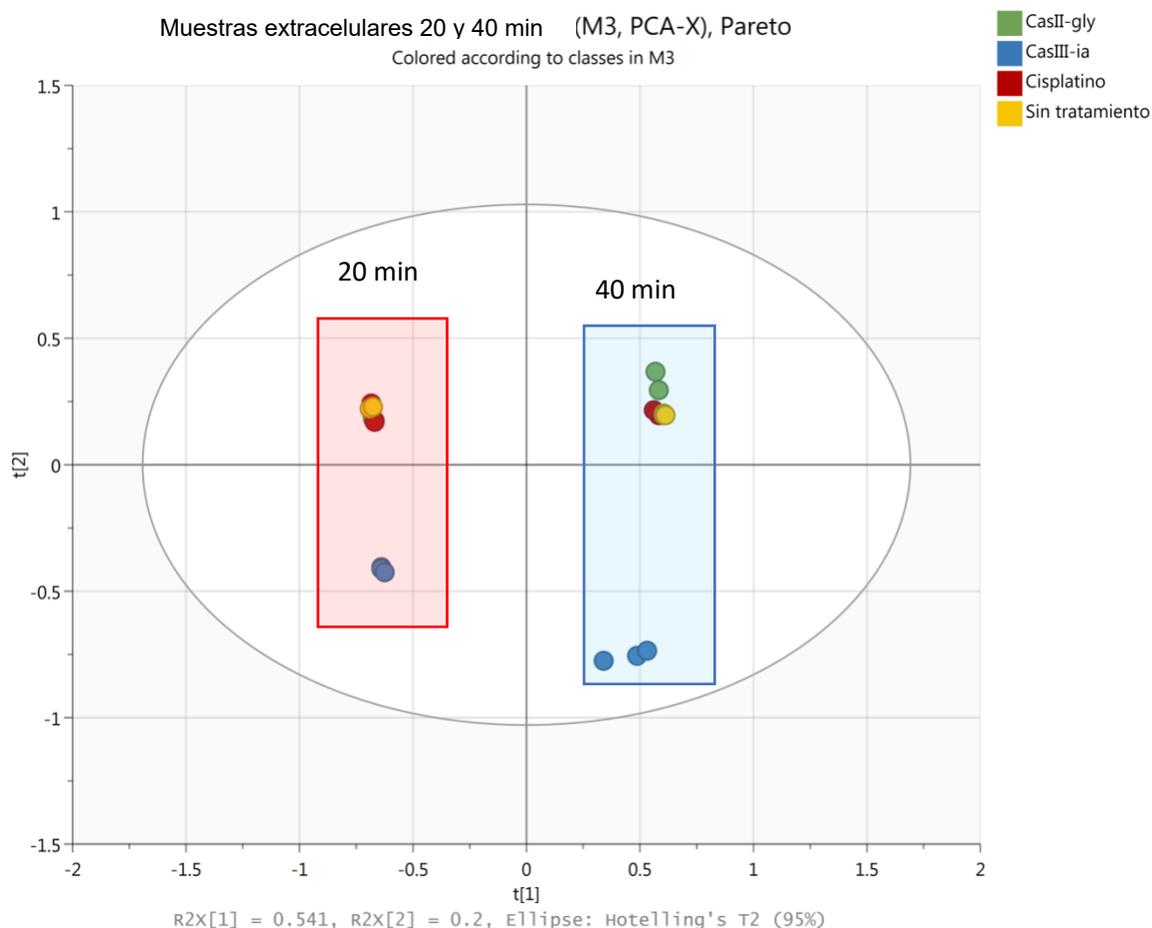


**Figura 17.** Mapa de calor obtenido de acuerdo a la concentración de los metabolitos intracelulares a los 20 y 40 min.

Se observa que en las muestras sin tratamiento la concentración de los metabolitos es menor (coloreadas en azul) y cuando se les administran los compuestos se tiene variación en las mismas aumentándolas (coloreadas en rojo). A simple vista se aprecia un patrón similar en los colores de las muestras de cisplatino y de la **CasII-gly**, mientras que la **CasIII-1a** presenta el aumento en la concentración de la mayoría de las especies, como por ejemplo el acetato, fenilacetato, glicina, glucosa, glutamina y lactato.

## 5.6. Análisis quimiométrico de muestras extracelulares

Se obtuvo el siguiente PCA para las muestras de metabolitos extracelulares de ambos tiempos (**Figura 18**). Sólo se presenta el PCA para estas muestras debido a que se tuvo una buena agrupación al aplicar este método y no existía variaciones significativas en la misma en comparación con el PLS-DA y el OPLS-DA.



**Figura 18.** PCA de scores modelado con los datos espectrales de las muestras extracelulares de los 20 y 40 min.

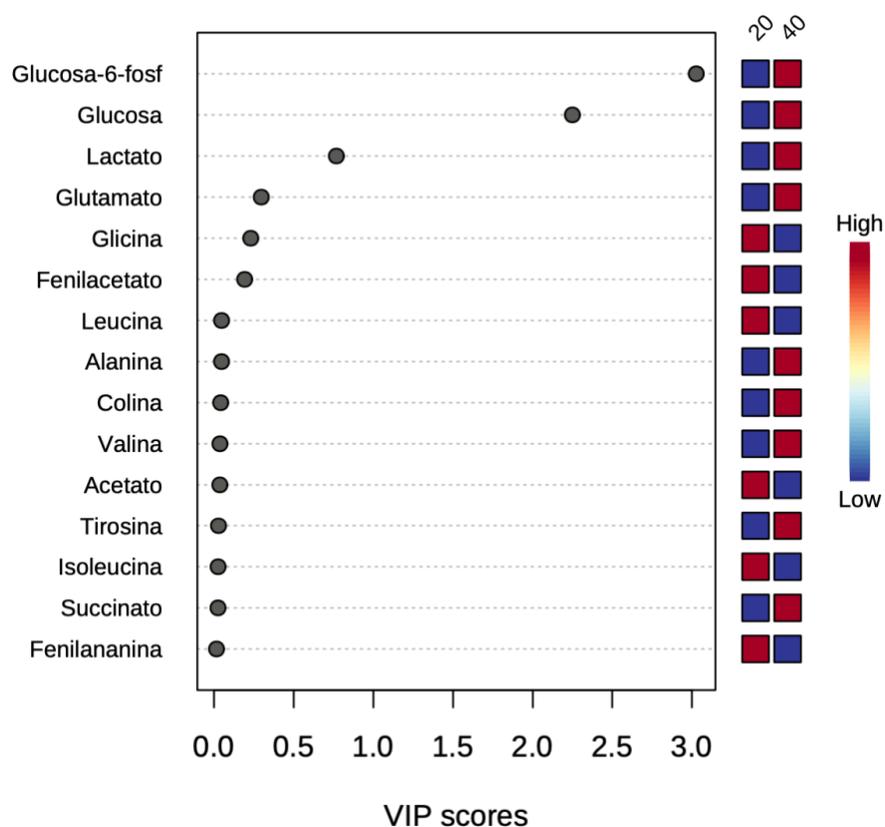
Se observa claramente una buena agrupación y el solapamiento entre las muestras sin tratamiento, cisplatino y **CasII-gly**, por su parte la **CasIII-ia** se encuentra apartada de forma significativa de este agrupamiento, por lo que se supone que su efecto en las células sea diferente al resto de las muestras.

En la **Tabla 8** se presenta el resumen de los parámetros para de cada uno de los métodos quimiométricos presentados anteriormente.

<b>Método</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup>X</b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
<b>PCA</b>	<b>22</b>	0.989	0.954

**Tabla 8.** Parámetros de los modelos quimiométricos empleados para las muestras extracelulares. **N**: número de muestras usadas para generar el modelo; **R<sup>2</sup>X**: varianza explicada por la matriz X; **Q<sup>2</sup>**: predictibilidad.

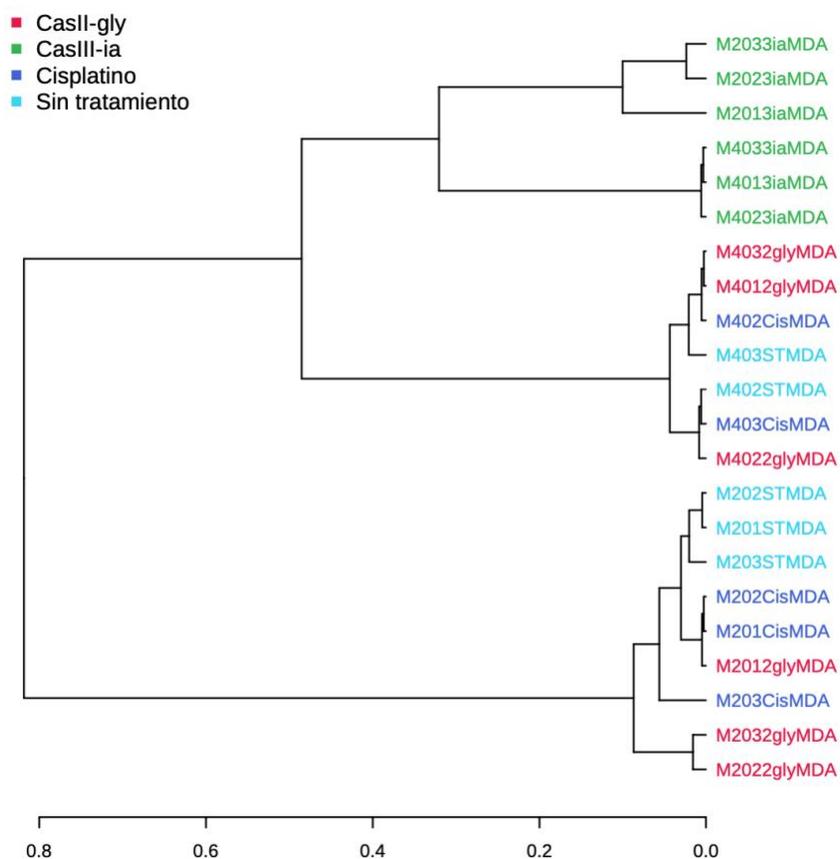
Derivado del PLS-DA, se obtuvo el VIP de scores presentado en la **Figura 19**.



**Figura 19.** VIP de scores obtenido para los metabolitos extracelulares de los 20 y 40 min.

De acuerdo al VIP de scores anterior, los metabolitos responsables de este agrupamiento son la glucosa-6-fosfato, la glucosa, el lactato, el glutamato, la glicina, la fenilananina, entre otros.

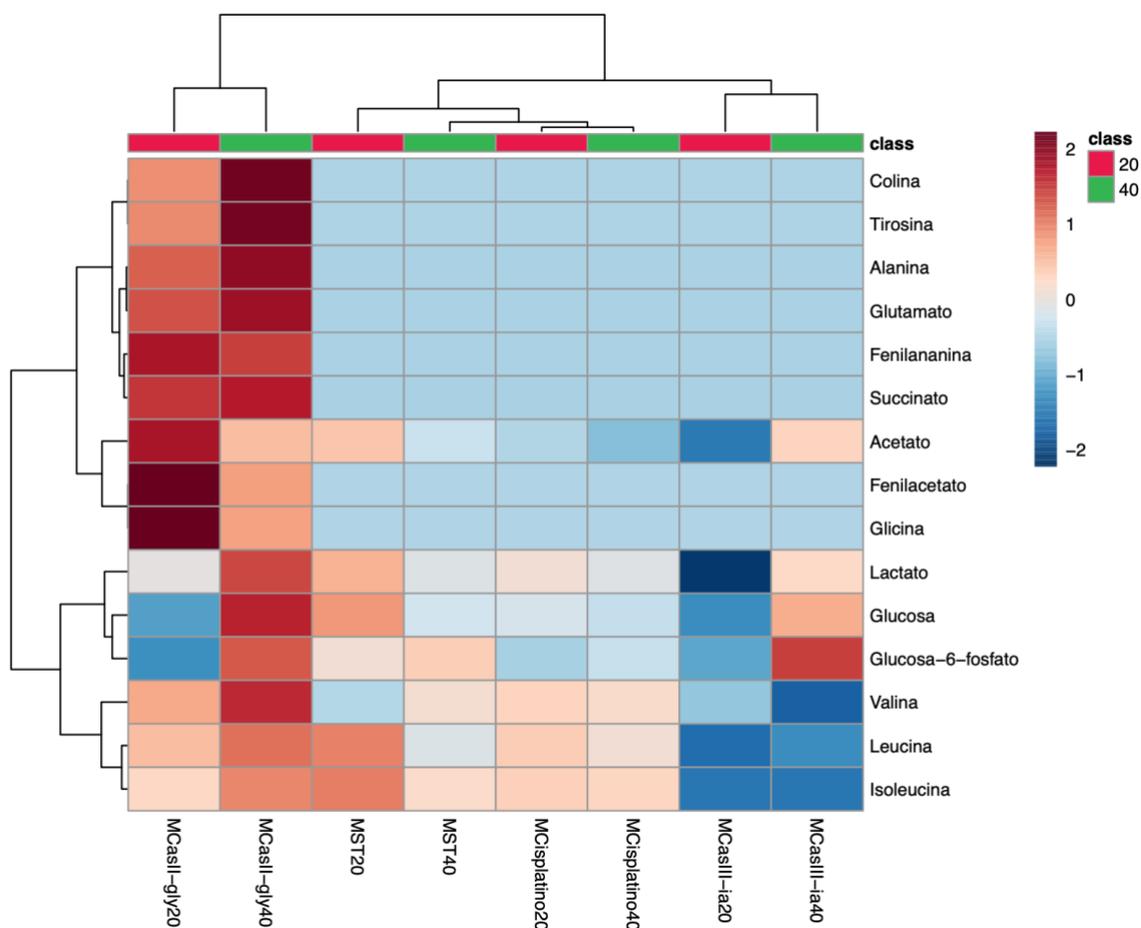
Los grupos formados por las muestras extracelulares en los dos tiempos de incubación de se presentan en el siguiente diagrama (**Figura 20**).



**Figura 20.** Agrupación de las muestras obtenida de acuerdo a los metabolitos extracelulares identificados en los 20 y 40 min.

Con el diagrama anterior se confirmó el agrupamiento de forma mixta de las muestras sin tratamiento, con cisplatino y con la **CasII-gly**, en grupos de 20 y 40 min. Por su parte las muestras de **CasIII-ia** se mantuvieron agrupadas de forma independiente.

Por último, el mapa de calor obtenido para las muestras extracelulares se muestra a continuación (**Figura 21**).



**Figura 21.** Mapa de calor obtenido de acuerdo a la concentración de los metabolitos extracelulares a los 20 y 40 min.

Se observa que la mayoría de la concentración de los metabolitos es baja para las células sin tratamiento, con cisplatino y con **CasII-gly**, mientras que la **CasIII-ia** mantiene en aumento la concentración de la mayoría de las especies, tales como el acetato, glucosa, glucosa-6-fosfato, lactato y leucina.

## 5.7. Análisis de enriquecimiento cuantitativo y análisis de enriquecimiento de vías (Quantitative enrichment analysis y pathway enrichment analysis)

Se realizó un QEA y un PEA (por sus siglas en inglés) para cada una de las muestras por separado y en conjunto a través del software MetaboAnalyst (los resultados del análisis de las muestras por separado se encuentran en el **anexo C**). El primer estudio es la contraparte metabolómica del análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA), pues operan de forma similar. En QEA se identifica el enriquecimiento de conjuntos de metabolitos en lugar de analizarlos de manera individual, siendo útil para visualizar cambios de concentración significativos y sutiles de los mismos asociando también las vías metabólicas donde se involucran [89].

En los gráficos de QEA el color y el tamaño de las barras indican la asociación positiva (color rojo) y la influencia de los metabolitos presentes en la muestra con cada una de las vías metabólicas. Las rutas metabólicas estadísticamente significativas que se deben de tomar en consideración son aquellas con un *valor de  $p < 0.05$*  [90].

Por otro lado el PEA, emplea los modelos de las vías metabólicas para completar el análisis, utiliza la estructura de una vía determinada para evaluar el impacto de cada uno de los metabolitos presentes en las muestras. Aquellas rutas metabólicas estadísticamente significativas son las que presentan un *valor de  $p < 0.05$*  y un valor de *impacto  $> 0.01$*  [91]

Ambos estudios son complementarios pues ayudan una mayor comprensión de los fenómenos observados experimentalmente. A continuación, en las **Figuras 22, 23, 24 y 25** se presentan los resultados de ambos estudios para las muestras intracelulares y extracelulares sin tratamiento y con la administración de los compuestos.

# Análisis cuantitativo de enriquecimiento (20 y 40 min)

## INTRACELULAR

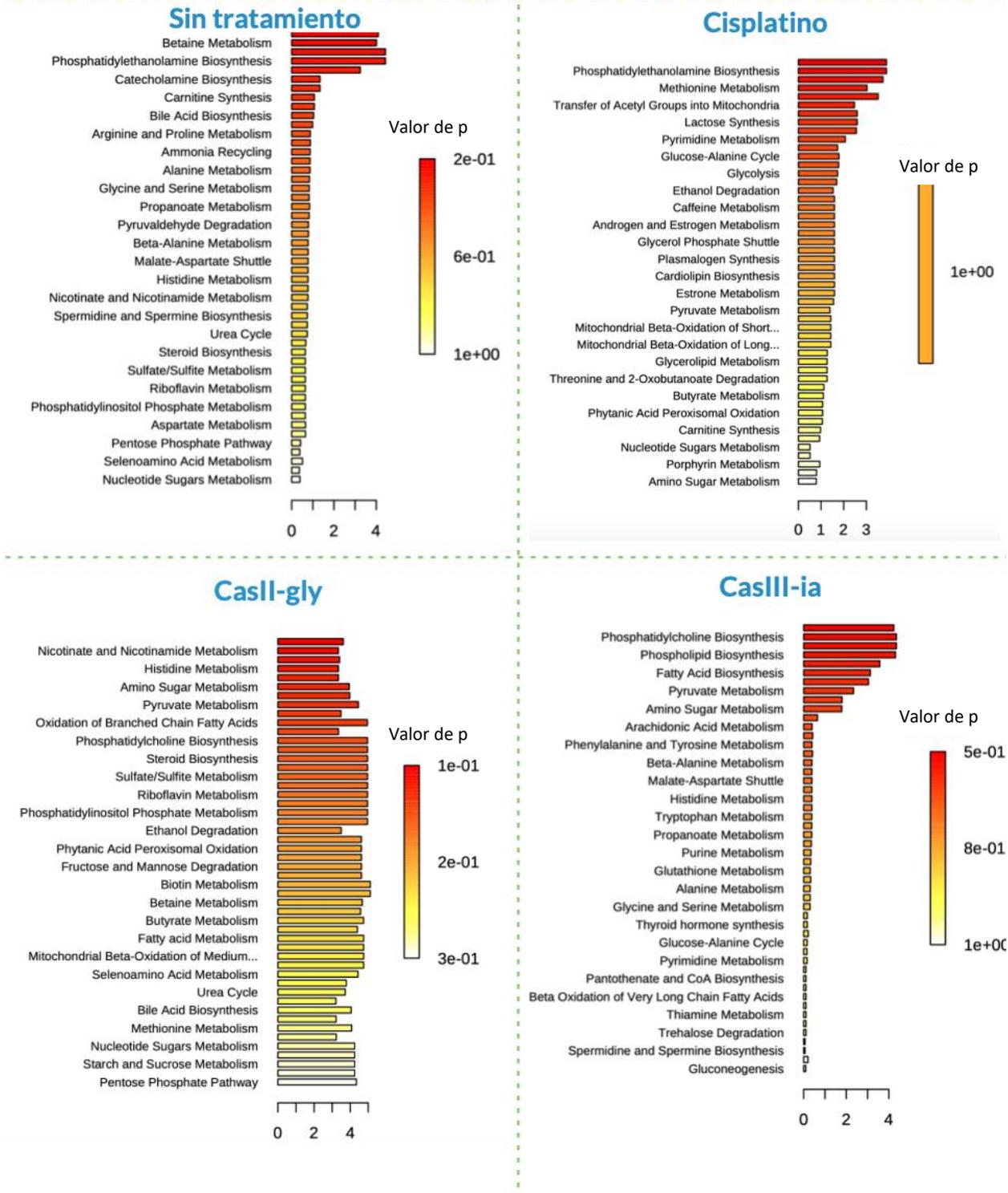


Figura 22. Resultados del análisis QEA para ambos tiempos correspondiente a las muestras intracelulares.

# Análisis cuantitativo de enriquecimiento (20 y 40 min)

EXTRACELULAR

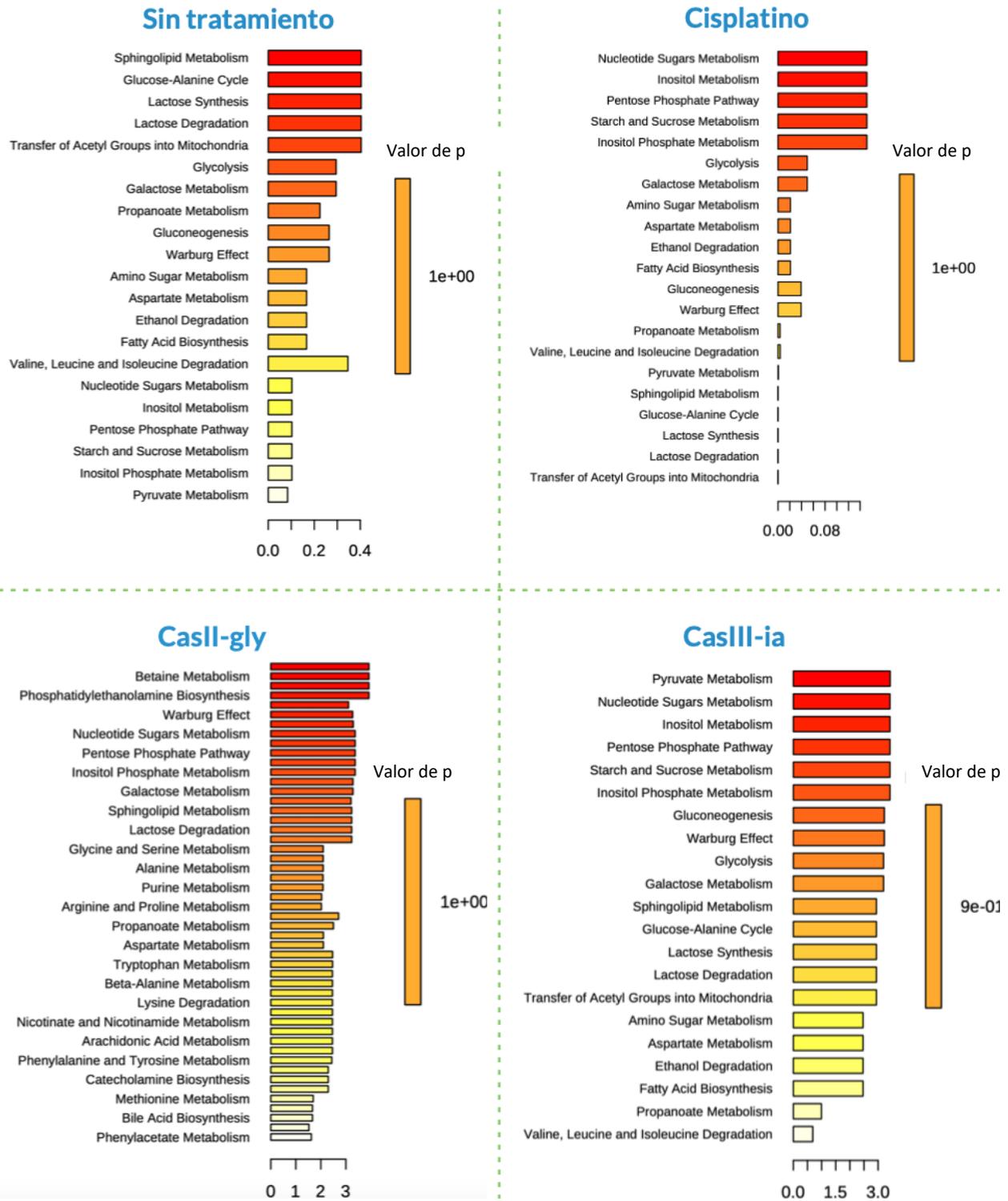


Figura 23. Resultados del análisis QEA para ambos tiempos correspondiente a las muestras extracelulares.

# Análisis de enriquecimiento de vía (20 y 40 min)

INTRACELULAR

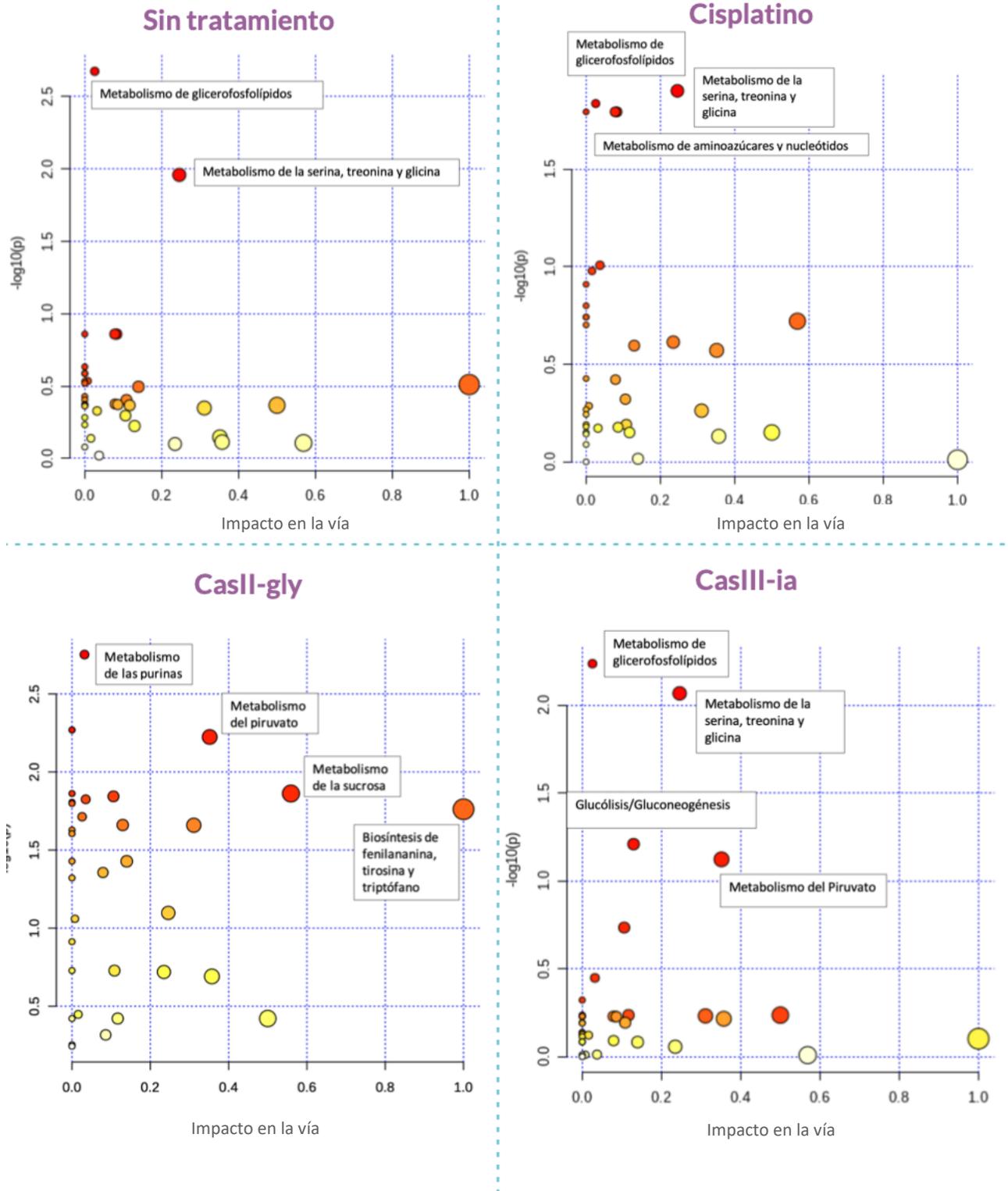


Figura 24 . Resultados del análisis PEA para ambos tiempos correspondientes a las muestras intracelulares

# Análisis de enriquecimiento de vía (20 y 40 min)

EXTRACELULAR

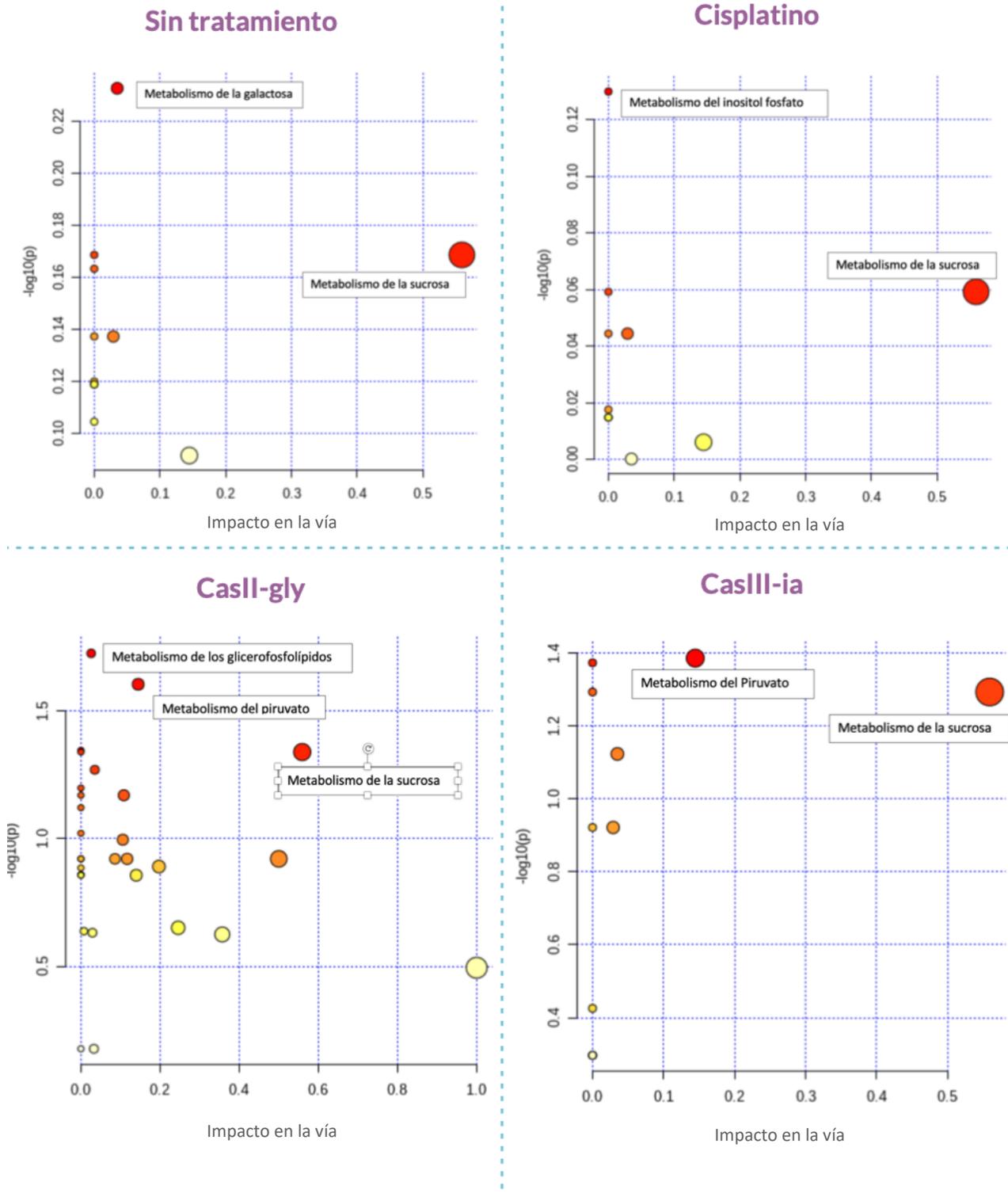
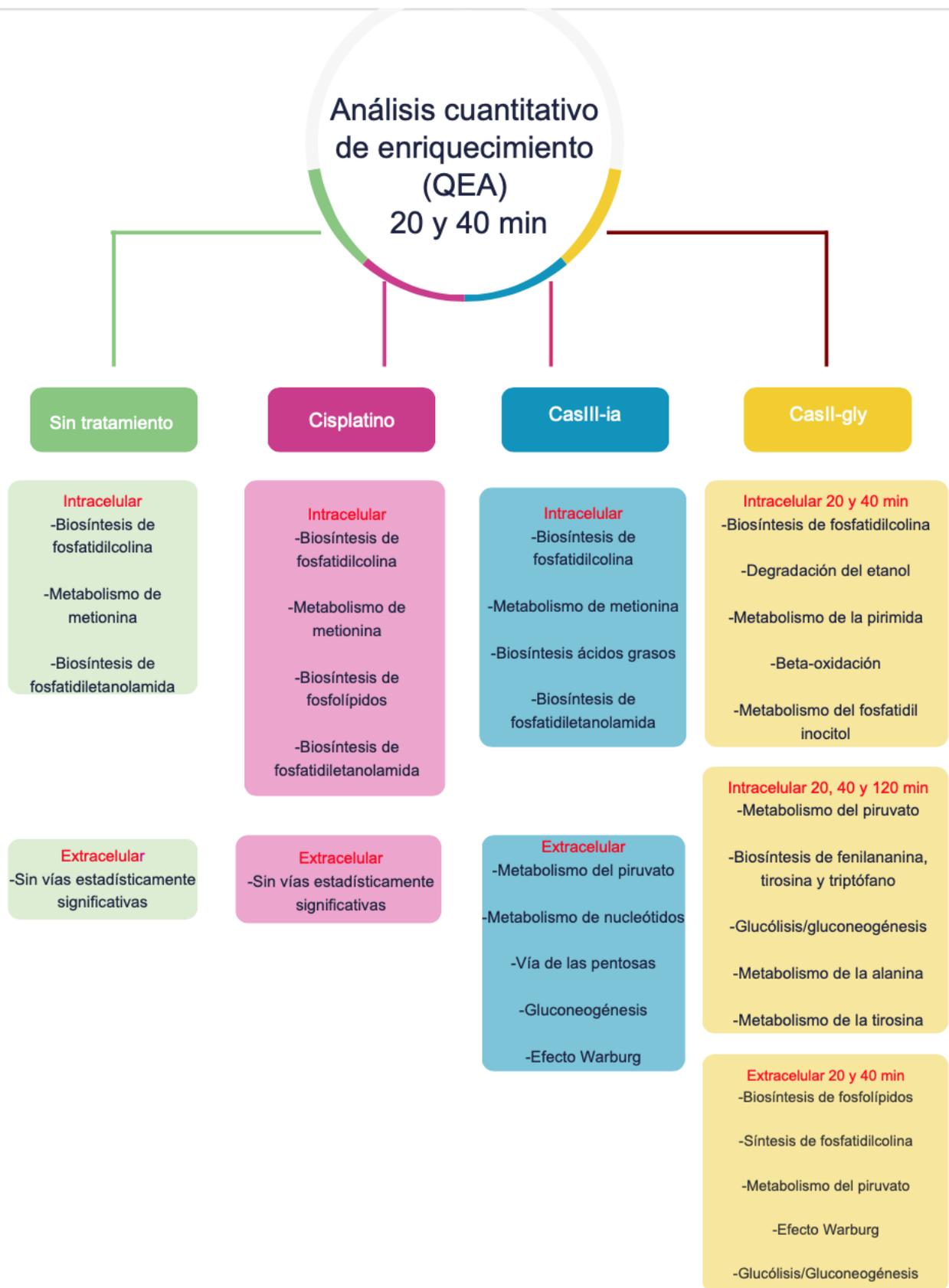


Figura 25 . Resultados del análisis PEA para ambos tiempos correspondiente a las muestras extracelulares

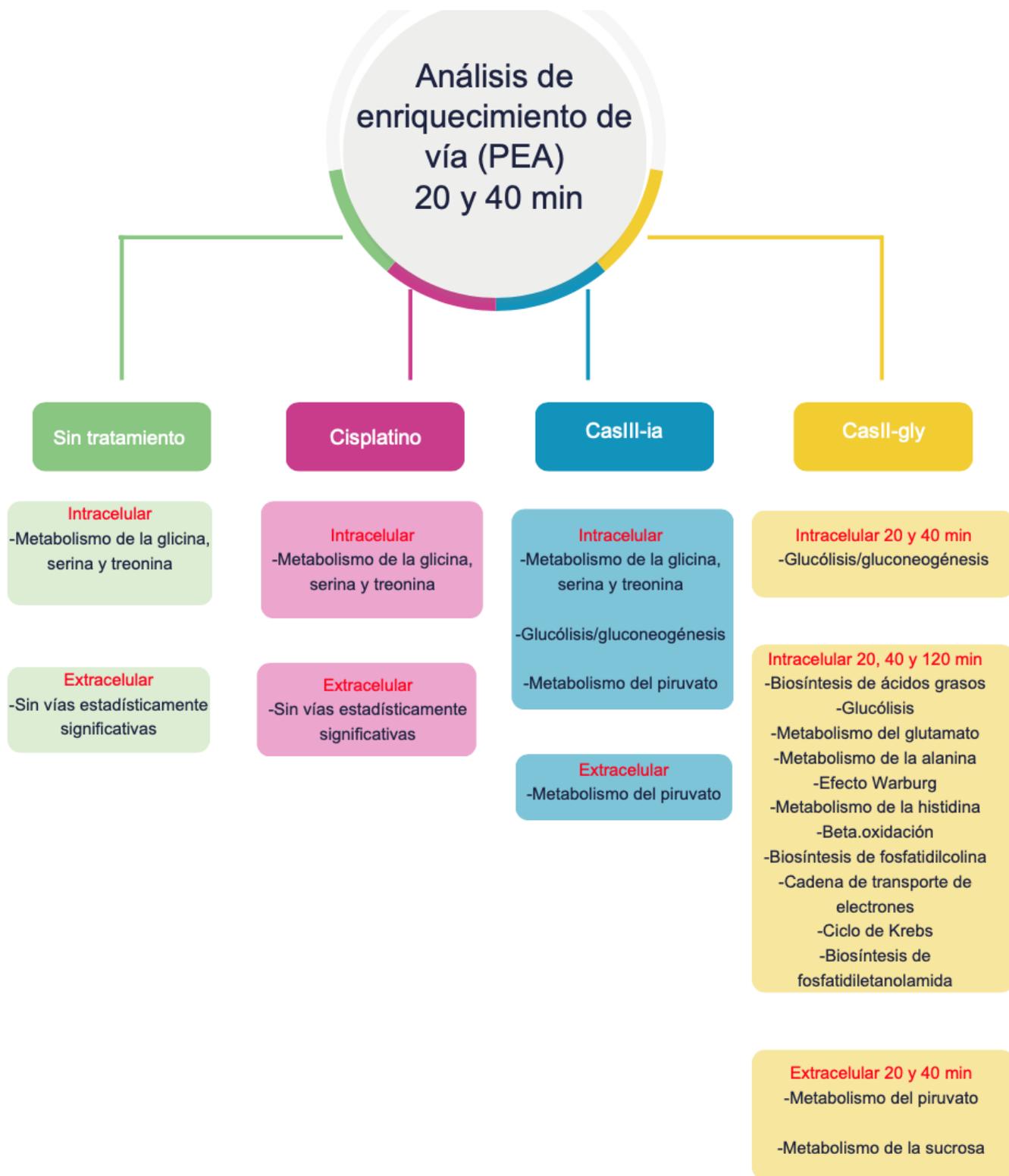
Gracias al estudio de clasificación realizado se pudo obtener un panorama general del comportamiento de las muestras y de la presencia de los metabolitos en ellas, pero el hecho de conocer qué vías se están alterando con los tratamientos toma mayor importancia debido a estas observaciones.

A continuación en las **Figuras 27 y 28** se muestran las principales vías metabólicas impactadas por los compuestos con una significancia estadística, obtenidas a través de QEA (donde se analizan conjuntos de metabolitos y se relacionan con una ruta metabólica) y PEA (donde se analiza que tan impactada está una ruta metabólica de acuerdo a los metabolitos presentes) .

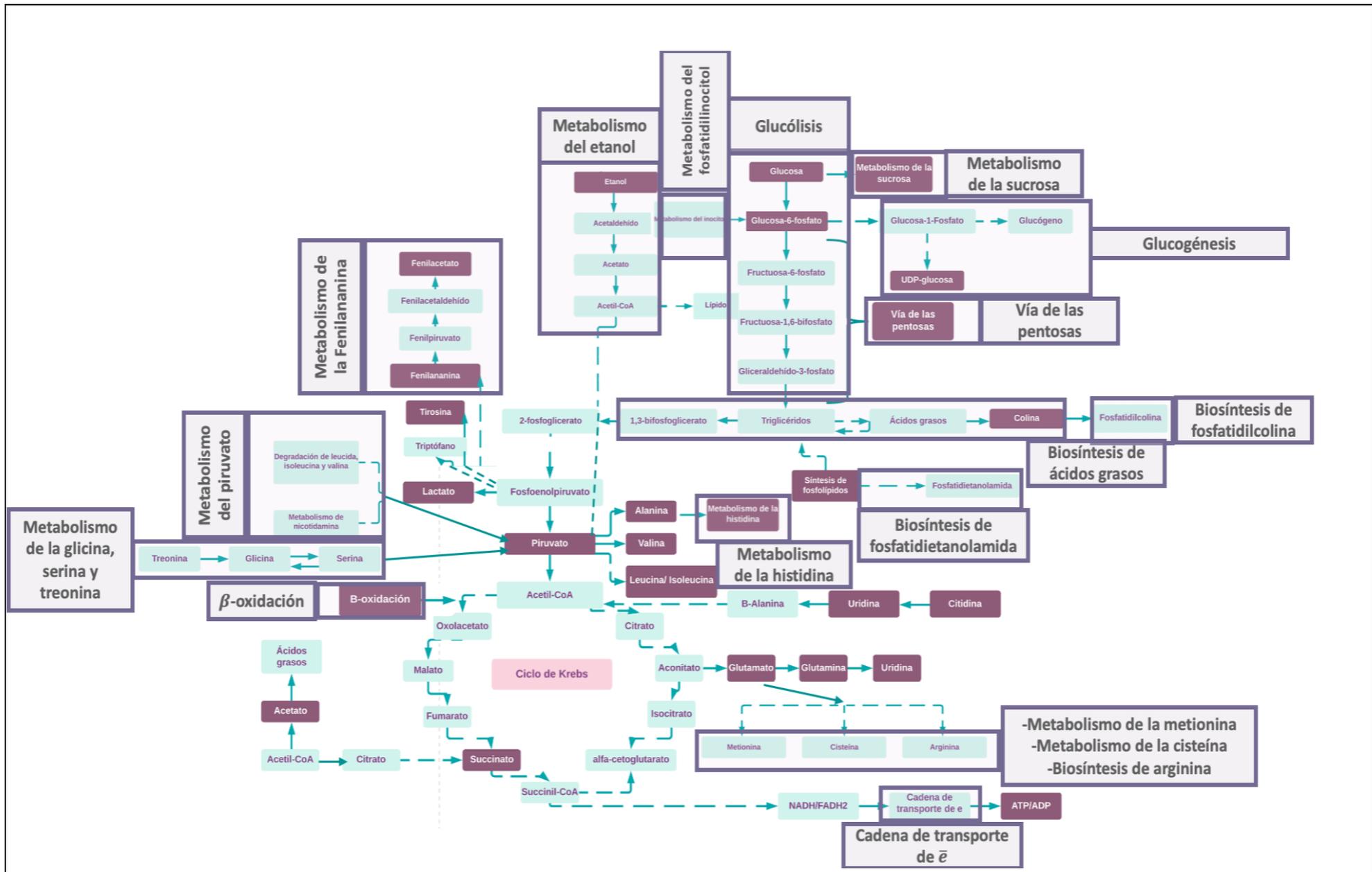
En la **Figura 29**, se presenta un mapa metabólico en donde se ubican las vías metabólicas que fueron encontradas durante los estudios QEA y PEA, así como los metabolitos indentificados (resaltados en color morado) en las muestras.



**Figura 26.** Vías metabólicas reelevantes para las muestras sin tratamiento y con tratamiento obtenidas por QEA.



**Figura 27.** Vías metabólicas reelevantes para las muestras sin tratamiento y con los tratamiento obtenidas por PEA.



**Figura 29.** Vías metabólicas y metabolitos (coloreados en morado) reelevantes para las muestras sin tratamiento y con tratamiento.

## **Capítulo 6. Discusión de resultados**

## 6. Discusión de resultados

De forma general y en comparación con el análisis clasificatorio presentado anteriormente en este capítulo, se observa que efectivamente las muestras sin tratamiento se comportan ligeramente distinto a las células con tratamiento. De acuerdo con los PLS-DA, las muestras con mayor similitud son las del cisplatino y **CasII-gly** tanto intracelular como extracelularmente. Comparando las vías resultantes a través de estos dos estudios se observa que no son precisamente las mismas, pero la función de cada una de ellas es similar, por lo que la aproximación de los métodos estadísticos parece ser acertada, pero en el caso de la **CasIII-ia** el análisis clasificatorio arrojó que tenía un comportamiento diferente a los otros dos compuestos y analizando las rutas se observa que, si bien sí existen rutas diferentes en comparación con los otros dos tratamientos también hay similitudes en las mismas.

Por su parte el gráfico VIP, evidenció que entre los metabolitos que marcan la diferencia entre las agrupaciones de las muestras intracelulares destacan colina, acetato, glucosa, glucosa-6-fosfato, entre otros. Se observa que sí existe relación con las vías encontradas, tal es el ejemplo la colina y el acetato que están conectados en los procesos metabólicos relacionados con los lípidos y estos destacan en los tres tratamientos. La glucosa, el glutamato y glucosa-6-fosfato se relacionan con el metabolismo de los carbohidratos, procesos que también se encontraron impactados por los compuestos.

Para las muestras extracelulares, el gráfico VIP resaltó metabolitos como la glucosa-6-fosfato, glucosa, lactato, glutamato, glicina, entre otros. Estos están relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y el efecto Warburg que también resultaron significativos dentro del estudio.

A continuación se hará un análisis de las rutas metabólicas encontradas por QEA y PEA para cada caso.

### *Sin tratamiento*

En QEA las vías metabólicas que se encontraron relevantes fueron la biosíntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamida, así como el metabolismo de la metionina.

La fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamida son componentes de las bicapas lipídicas de la membrana de la célula y se sabe que en células de tipo metastásico como las MDA-MB-231 la concentración de lípidos es mayor en comparación con su contraparte no metastásica. Además, se ha reportado que las células tumorales a menudo hacen metástasis en un medio rico en lípidos [92,93]. La metionina por su parte, es un aminoácido esencial y se ha asociado al crecimiento de las células tumorales [94], lo que también coincide con lo reportado en la literatura referente a que en las células MDA-MB-231 se puede encontrar una alteración en el metabolismo de los aminoácidos [95].

En la parte extracelular no se encontraron procesos estadísticamente relevantes.

El análisis de PEA, reveló en la parte intracelular al metabolismo de la glicina, serina y treonina. Se sabe que específicamente el metabolismo de la serina se encuentra elevado en esta línea celular [95]; además, están unidas biosintéticamente y juntas proporcionan los precursores esenciales para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que son cruciales para el crecimiento de las células cancerosas. La biosíntesis de serina / glicina también afecta la capacidad antioxidante celular, apoyando así la homeostasis tumoral. También se ha reportado que la vía biosintética de la serina / glicina impulsa la oncogénesis [96].

En el caso de estas muestras, la aparición de estas rutas y los antecedentes en la literatura sugieren que *per se* las células MDA-MB-231 ya tienen una alteración sobre esas vías metabólicas.

De igual forma en la muestra extracelular no se encontraron vías estadísticamente significativas.

### *Cisplatino*

El análisis de QEA identificó intracelularmente vías como la biosíntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamida y el metabolismo de la metionina que son las mismas que se encontraron en las células sin tratamiento, además de la biosíntesis de fosfolípidos.

El encontrar tres rutas que aparecen en el control se propone que pudiera deberse a uno de los dos siguientes motivos: el primero, es que la vía destaca por ser una alteración propia de la línea celular o el segundo es que efectivamente está siendo

alterada por el tratamiento con los compuestos. Al ser complicada la distinción de los dos casos expuestos anteriormente, se optó por hacer un enfoque en las vías que no aparecen en el control para este caso y para los compuestos restantes.

Extracelularmente no se encontraron vías estadísticamente significativas.

PEA, mostró que la vía influenciada por el cisplatino fue el metabolismo de la glicina, serina y treonina, al igual que el control. Extracelularmente tampoco se encontraron rutas significativas.

Por lo tanto se propone que en este estudio el cisplatino pudiera encontrarse alterando principalmente la biosíntesis de fosfolípidos y que su efecto sobre el metabolismo en esta línea celular con respecto al tiempo, no es tan inmediato; en estudios posteriores podrían evaluarse tiempos más largos para visualizar si logra alterar otras rutas metabólicas.

### *CasIII-ia*

Gracias al análisis QEA, se encontró que las vías metabólicas influenciadas por el compuesto son la biosíntesis de ácidos grasos, además de las tres rutas que coinciden con las encontradas en las muestras sin tratamiento.

En donde se observa el impacto de otros procesos es en las muestras extracelulares donde destacan el metabolismo del piruvato, de nucleótidos, vía de las pentosas, glucogénesis y el efecto Warburg, por lo que posiblemente a estos dos tiempos de evaluación, se tenga un consumo mayor los metabolitos involucrados en estas vías por parte del medio intracelular.

Por su parte los nucleótidos son esenciales para las células cancerosas, ya que dependen de la síntesis de *novo* de los mismos para mantener reservas suficientes y apoyar la replicación del ADN y la producción de ARN [97]; la vía de las pentosas, se considera comúnmente como una defensa que contrarresta el estrés oxidativo y produce ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos. Sin embargo, nuevos estudios sugieren que esta vía tiene impactos importantes en varios aspectos del cáncer, incluida la proliferación, la apoptosis, la invasión, la farmacorresistencia y la metástasis [98]; la glucogénesis o gluconeogénesis, suprime significativamente la glucólisis aeróbica lo que lleva al efecto Warburg (descrito en Capítulo 1) e influye en otras vías metabólicas en las células cancerosas, incluido el ciclo del TCA, la

fosforilación oxidativa, la vía de las pentosas, la glutaminólisis y la biosíntesis de serina y nucleótidos [99]. Como puede observarse, los procesos metabólicos significativos en la parte extracelular se encuentran relacionados entre ellas.

En PEA intracelularmente destacan la glucólisis/gluconeogénesis y el metabolismo del piruvato, el cual también es significativo extracelularmente.

Por lo que se propone que la **CasIII-ia**, esté influyendo principalmente en procesos como metabolismo de carbohidratos y de nucleótidos.

### *CasII-gly*

El caso de la **CasII-gly** resulta interesante pues se observan varias rutas impactadas en QEA, incluso a los 20 y 40 min, donde destacan la degradación del etanol, el metabolismo de la pirimidina y del fosfatidilinositol, así como la beta-oxidación. En el análisis hasta los 120 min (que sólo fue posible realizar para este compuesto), se observan otras rutas relevantes distintas, donde destacan el metabolismo del piruvato, de la alanina, tirosina, así como la glucólisis/gluconeogénesis y la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano.

El metabolismo de los nucleótidos, como ya se mencionó anteriormente, es una vía crítica que genera moléculas de purina y pirimidina para la replicación del ADN, la síntesis de ARN y la bioenergética celular, lo que apoya la replicación de células cancerosas [100]; la beta-oxidación está relacionada con la síntesis de ácidos grasos que como se mencionó anteriormente son empleados por las células cancerosas para su proliferación, supervivencia, resistencia a los medicamentos y metástasis [101], si bien para el metabolismo del a, resistencia a los medicamentos y metástasis [100]; si bien para el metabolismo del fosfatidilinositol no se ha reportado un efecto sobre las células cancerosas, se encuentra ligado a la glucólisis, tal como se muestra en la **Figura 29**; la alanina y tirosina, también se han asociado a la proliferación de células cancerosas [102].

Extracelularmente se tienen procesos como la biosíntesis de fosfolípidos, síntesis de fosfatidilcolina, metabolismo del piruvato, efecto Warburg y glucólisis/gluconeogénesis.

El análisis PEA encontró que hasta los 40 min las vías de importancia fueron la glucólisis/gluconeogénesis, mientras el número de vías significativas hasta los 120

min es mayor, destacando la síntesis de ácidos grasos, metabolismo del glutamato, histidina y la alanina, ciclo del TCA, cadena de transporte de  $\bar{e}$ , beta oxidación, biosíntesis de ácidos grasos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

De algunos procesos ya se explicó anteriormente el efecto que tiene sobre las líneas cancerosas; por su parte el metabolismo del glutamato, está directamente ligado con el de la glutamina que como se expuso en el Capítulo 1 es uno de los sellos característicos del cáncer; mientras que la cadena de transporte de  $\bar{e}$  y el ciclo del TCA son dos de los procesos más importantes de las células pues proveen de ATP a las mismas.

En la parte de antecedentes de este documento, se mencionó el estudio de microarreglos donde emplearon este mismo compuesto, que si bien fue evaluado en células de cáncer cervicouterino (HeLa), existen similitudes con los resultados encontrados durante este trabajo. Durante ese estudio se reportó que la **CasII-gly** impacta el metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos, así como alteraciones en el metabolismo de los lípidos, glucólisis/gluconeogénesis, coincidente con lo observado por medio de los estudios de QEA y PEA presentados anteriormente.

Estos hechos también evidencian una versatilidad de la actividad de esta **Casiopeína**<sup>®</sup> frente a diferentes líneas celulares teniendo probablemente el mismo efecto metabólico en ellas.

En resumen la **CasII-gly**, afecta mayor número de vías metabólicas y no directamente conectadas y su impacto sobre el metabolismo de lípidos sugiere que podría ser buena candidata a disminuir los procesos de metástasis y migración de las células cancerosas. Actualmente dentro del grupo de investigación se evalúa el efecto de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> en la migración e invasión de células de cáncer cervicouterino y el potencial anti-metastásico de las mismas *in vivo*.

Por otro lado, comparando los efectos sobre el metabolismo de la línea celular al agregar el tratamiento con las **Casiopeínas**<sup>®</sup> y la actividad biológica de cada una sobre la línea celular empleada, es clara una correlación, pues la **CasIII-ia** es menos activa que la **CasII-gly**, que logra una afectación de mayor número de vías metabólicas.

Adicionalmente, se ha propuesto en trabajos anteriores que las **Casiopeínas**<sup>®</sup> son capaces de producir un daño a las células cancerosas en tiempos cortos, lo que

empata con lo observado en los resultados, pues a comparación del cisplatino que hasta los 40 min no se encuentra alterando muchos procesos metabólicos, las **Casiopeínas®** impactan desde tiempos cortos, y al parecer a tiempos mayores (120 min) el efecto sobre las células es aún más importante.

## **Capítulo 7. Conclusiones**

## 7. Conclusiones

La **CasII-gly** fue el compuesto más activo, seguida de la **CasIII-ia**.

Las células se mantuvieron viables en los tiempos de evaluación (20 y 40 min) a las concentraciones empleadas para los tres compuestos.

Se identificaron un total de 25 metabolitos en las muestras intracelulares y 8 metabolitos en las muestras extracelulares.

Se encontraron similitudes en el comportamiento intracelular y extracelular de las muestras de cisplatino y de la **CasII-gly**, principalmente.

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre el impacto sobre las vías metabólicas en este estudio a los 20, 40 y 120 min (el último en el caso de la **CasII-gly**) se propone que:

El cisplatino podría encontrarse alterando principalmente la biosíntesis de fosfolípidos.

La **CasIII-ia** esté influyendo principalmente en procesos como metabolismo de carbohidratos y de nucleótidos.

La **CasII-gly** afecta mayor número de vías metabólicas, incluso no correlacionadas destacando su impacto sobre el metabolismo de carbohidratos y de lípidos.

## **Capítulo 8. Bibliografía**

- [1] Asco Cancer.Net Doctor-approved patient information. Revisado el día: 23-03-20. <http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-cancer>
- [2] National breast cancer foundation, inc. Revisado el día: 23-03-20. <http://www.nationalbreastcancer.org/what-is-cancer>
- [3] Mehdipour P., *Cancer genetics and psychotherapy*, Springer, **2017**, 400-402.
- [4] Cancer, solid tumor. Revisado el día: 23-03-20 [http://oirm.ca/sites/default/files/disease-cancer-solid\\_tumour.pdf](http://oirm.ca/sites/default/files/disease-cancer-solid_tumour.pdf)
- [5] The Genetics of Cancer. National Cancer Institute. Revisado el día: 23-03-20. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>
- [6] Hanahan D. y Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. Cell Press, **2000**, 100, 57-70.
- [7] Romero S., Sullivan J., Viveros J., Aguilar D. y Prado H., *Tumor cell metabolism An integral view*, Cancer Biology and Therapy, **2011**, 12, 939–948.
- [8] Kalyanaraman B., *Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism*, Redox Biology, **2017**, 12, 833-842.
- [9] Jeon SM, Hay N., *Expanding the concepts of cancer metabolism*, Experimental and Molecular Medicine, **2018**, 50.
- [10] Halama A., *Metabolomics in cell culture--a strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment*, Archives of Biochemistry and Biophysics, **2014**, 564.
- [11] Nelson D., Cox M., *Lehninger. Principles of Biochemistry*, Quinta edición, **2008**,
- [12] Zheng J., *Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review)*, Oncology Letters, **2012**, 4, 1151-1157.

- [13] Liberti MV. y Locasale JW., *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends Biochemical Sciences, **2016**, 41.
- [14] Vander MG., Cantley LC y Thompson CB., *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*, Science, **2009**, 22, 1029-1033.
- [15] López M., *The Warburg Effect: Why and How Do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen?* Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, **2008**, 8, 305–312.
- [16] Fadaka A., Ajiboye B., Ojo O., Adewale O., Olayide I. y Emuowhochere R., *Biology of glucose metabolism in cancer cells*, Journal of Oncological Sciences, **2017**, 3, 45-51.
- [17] Fadaka A., Ajiboye B., Ojo O., Adewale O., Olayide I. y Emuowhochere R., *Biology of glucose metabolism in cancer cells*, Journal of Oncological Sciences, **2017**, 3, 45-51.
- [18] Kaelin W. y Thompson C., *Clues from cell metabolism*, Nature, **2010**, 465, 562–564.
- [19] Cancer Quest. Metabolism. Revisado el día: 23-03-20. [https://www.cancerquest.org/cancerbiology/metabolism?gclid=Cj0KCQiAkKnyBRDwARIsALtxe7hdr6XF67FBioWVFqc8IUW0sE6cojO2NbgGY02NMHMtaQefEQfTxUaAi-IEALw\\_wcB](https://www.cancerquest.org/cancerbiology/metabolism?gclid=Cj0KCQiAkKnyBRDwARIsALtxe7hdr6XF67FBioWVFqc8IUW0sE6cojO2NbgGY02NMHMtaQefEQfTxUaAi-IEALw_wcB)
- [20] Jin L., Alesi N. y Kang S., *Glutaminolysis as a target for cancer therapy*, Oncogene, **2016**, 35, 3619–3625.
- [21] Weinberg S. y Chandel N., *Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy*, Nature Chemical Biology, **2015**, 11, 9-15.
- [22] Zhang Y. y Ming J., *Altered energy metabolism in cancer. A unique opportunity for therapeutic intervention*, Cancer Biology & Therapy, **2013**, 14, 81–89.

- [23] Yang L., Venneti S. y Nagrath D., *Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism*, Annual Review of Biomedical Engineering, **2017**, 19, 163-194.
- [24] Yan J., Kwan H., *Roles of Lipids in Cancer*, Advances in Lipid Metabolism, IntechOpen, 1-19.
- [25] Cheng C., Geng F., Cheng X. y Guo D., *Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer*, Cancer Communications, **2018**, 38, 1-14.
- [26] Long J., Zhang C., Zhu N., Du K., Yin Y., Tan X., Liao D. y Qin L., *Lipid metabolism and carcinogenesis, cancer development*, American Journal of Cancer Research, **2018**, 8, 778-791.
- [27] Oca. a M., Martínez B., Quesada R. y Medina M., *Glucose Favors Lipid Anabolic Metabolism in the Invasive Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231*, Biology, **2020**, 9.
- [28] Lieu, E., Nguyen T., Rhyne S. Y Kim J., *Amino acids in cancer*, Experimental and Molecular Medicine, **2020**, 52, 15–30.
- [29] Wiese E. y Hitosugi T., *Tyrosine Kinase Signaling in Cancer Metabolism: PKM2 Paradox in the Warburg Effect*, Frontiers in Cell and Developmental Biology, **2018**, 6, 79.
- [30] Glunde K., Bhujwala Z. y Ronen S., *Choline metabolism in malignant transformation*, Nature Reviews Cancer, **2011**, 11, 835–848.
- [31] Vigano S., Alatzoglou D., Irving M., Ménétrier-Caux C., Caux C., Romero P. y Coukos G., *Targeting Adenosine in Cancer Immunotherapy to Enhance T-Cell Function*, Frontiers in Immunology, **2019**, 10, 925.

[32] Sikalidis A., *Amino acids and immune response: a role for cysteine, glutamine, phenylalanine, tryptophan and arginine in T-cell function and cancer?*, Pathology & Oncology Research, **2014**, 21, 9-17.

[33] Costa A., Scholer A., Mehta F., *The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment*, Seminars in Cancer Biology **2014**, 25, 23-32.

[34] Yang H., Villani M., Wang H., Simpson M., Roberts M., Tang M. y Liang X., *The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy*, Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, **2018**, 37.

[35] Nalbantoglu S., *Metabolomics: Basic Principles and Strategies*, **2019**.

[36] Halama A. *Metabolomics in cell culture--a strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment*, Archives of Biochemistry and Biophysics, **2014**, 564, 100-109.

[37] Duarte I., Lamego I., Marques J., Marques M., Blaise B. y Gil A., *Nuclear magnetic resonance (NMR) study of the effect of cisplatin on the metabolic profile of MG-63 osteosarcoma cells*, **2010**, 9, 5877-5886.

[38] Emwas A., Roy R., McKay R., Tenori L., Saccenti E., Gowda G., Raftery D., Alahmari F., Jaremko L., Jaremko M. y Wishart D., *NMR Spectroscopy for Metabolomics Research*, Metabolites, **2019**, 9.

[39] Lefort N., Brown A., Lloyd V., Ouellette R., Touaibia M., Culf A. y Cuperlovic M., *<sup>1</sup>H NMR metabolomics analysis of the effect of dichloroacetate and allopurinol on breast cancers*, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, **2014**, 93, 77-85.

[40] Kostidis S., Addie R., Morreau H., Mayboroda O. y Gieraa M., *Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: A tutorial*, Analytica Chimica Acta, **2017**, 980, 1-24.

[41] Tuyiringire N., Tusubira D., Munyampundu J., Umba C., Muvunyi C. y Engeu P., *Application of metabolomics to drug discovery and understanding the mechanisms of action of medicinal plants with anti-tuberculosis activity*, *Clinical and Translational Medicine*, **2018**, 1, 29.

[42] Astolfi L., Ghiselli S., Guaran V., Chicca M, Simoni E., Olivetto E., Lelli G. y Martini A., *Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: a retrospective evaluation*, *Oncology reports*, **2013**, 29, 1285-1292.

[43] Nimse S., Palb D., *Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms*, *Royal Society of Chemistry*, **2015**, 5, 27986-28006.

[44] Marzano C., Pellei M, Tisato F., Santini C., *Copper Complexes as Anticancer Agents*, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2009**, 9,185-211.

[45] Arredondo M., Núñez M., *Iron and copper metabolism*, *Molecular Aspects of Medicine*, **2005**, 26, 313-325.

[46] Messerschmidt A., *Cooper Metalloenzymes*, *El servier*, **2010**, 489-545.

[47] Osredkar J., Sustar N., *Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance*, *Journal of Clinical Toxicology*, **2011**.

[48] Learya S., Winge D., Cobine P., *“Pulling the plug” on cellular copper: The role of mitochondria in copper export*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2009**, 1793, 146–153.

[49] Festa R., Thiele D., *Copper: An essential metal in biology*, *Current Biology*, 21.

[50] Chan W, Rennert M., *The role of copper in iron metabolism*, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **1980**, 10, 338-44.

- [51] Nimse S., Palb D., *Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms*, Royal Society of Chemistry, **2015**, 5, 27986-28006.
- [52] Agarwal S., Kumar D., Mehrotra R., *Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **2013**, 120, 177–182.
- [53] Ruiz-Azuara L., *Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos*, Tipo II S.18802 172248, **1993**.
- [54] Ruiz-Azuara L., *Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents*, 07/628843, US5107005 A, 1992, RE 35458, US RE35,458E, **1997**.
- [55] Ruiz-Azuara L., *Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from methylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents*, 628628, 5576325, **1996**.
- [56] Robledo D., *Efecto sinérgico de la casiopeína II gly con drogas empleadas en el sector clínico sobre la proliferación del cáncer cervico-uterino (CCU) de HeLa*, Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, **2016**.
- [57] Carvallo F., Trejo C., Gómez C., Rodríguez E., Rosales L., Cortés E., Cedillo C., Gracia I., Ruiz-Azuara L., Marina V., Constantino F., *Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo*, BioMetals, **2008**, 21, 17–28.
- [58] Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L. & Moreno-Sánchez, R. *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions*. Biochemical Pharmacology, **2003**, 65, 1979–1989.

[59] Bravo E., Hernández A., Gracia I., *Antineoplastic Evaluation of Two Mixed Chelate Copper Complexes (Casiopéinas®) in HCT-15 Xenograft Model*. Journal of the Mexican Chemical Society, **2013**, 57, 205–211.

[60] Trejo C., Palencia g., Zúñiga S., Rodríguez A., Osorio L., Sánchez L., Gracia I., Márquez L., Sánchez A., Moreno M., Cruz A., Bravo E., Ruiz-Azuara L., Rodríguez S., Sotelo J., *Cas Ilgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms*, Neoplasia, **2005**, 7, 563 – 574.

[61] Bravo E., García J., Gracia I., Ruiz-Azuara L., *Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N–N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N–N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopéinas®)*, **2009**, 103, 299-309.

[62] Valencia A., Uribe L., Galindo-Murillo R., Baca K., Gutiérrez A., Vázquez A., Ruiz-Azuara L., Lemus E., Mejía C., *Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopéina-Induced Apoptosis Pathways*, PLOS ONE, **2013**, 8, 1-18.

[63] Lemus E., Grizett A., Vázquez A., Palma L., Ruiz- Azuara L., Mejía C., *Analysis of Apoptotic and Autophagic Pathways in Neuroblastoma by Treatment with Copper Compounds*, INTECH, **2013**, 145-161.

[64] Trejo C., Jiménez D., Rodríguez S., Fernández F., Cruz A., Ruiz- Azuara L., Sotelo L., *Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation*, BioMed Central Cancer, **2012**, 156.

[65] Rivero-Müller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz-Azuara L. & Dobrota, M. *Mixed chelate copper complex, Casiopéina Ilgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity*. Chemico-Biological Interactions, **2007**, 165, 189–199.

- [66] Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L. & Moreno-Sánchez, R. *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions*. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 65, 1979–1989.
- [67] Guerrero S., Cano P., Reyes E., Velazquez F., Bravo M., Ruiz L., *Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes Casiopeínas*, *Toxicology in Vitro*, **2011**, 25, 1376-1384.
- [68] Kachadourian R., Brechbuhl H., Ruiz-Azuara L., Gracia I., Day B., *Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*, *Toxicology*, **2010**, 3, 176-183.
- [69] Sáenz A., *Estudio de la reactividad de la Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia, Cisteína, Glutación y 2-mercaptoetanol*, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, **2013**.
- [70] Hernández L., Marín A., Pavón N., Carvajal K., Moreno R., *Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism*, *Toxicology and applied pharmacology*, **2005**, 212, 79-88.
- [71] Macias M., Marin A., Gallardo J., Lopez S., Garcia J., Rodriguez J., Ruiz-Ramirez L., Gracia I., Zentella A., Sosa M., Moreno R. y Rodriguez S., *6*, *Archives of Toxicology*, **2012**, 86, 753-766.
- [72] Jáuregui G., Espinal J., Junguk H., Alcalá S., Ruiz-Azuara L. y Lemus E., *Identification of Casiopeina II-gly secondary targets through a systems pharmacology approach*, *Computational Biology and Chemistry*, **2019**, 78, 127-132.
- [73] García-Ramos J., Gutiérrez A., Vázquez A., Toledano Y., Alonso-Sáenz A., Vidales V., Flores-Alamo M., Mejía C. y Ruiz-Azuara L., *The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times*, *Biometals*, **2017**, 30, 43–58.

[74] Cancer. World Health Organization. Revisado el día: 26-03-20.  
[https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)

[75] Breast Cancer - Metastatic: Statistics. Cancer. Net. Revisado el día: 18-06-20.  
<https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer-metastatic/statistics>

[76] Maria R., Altei W., Selistre H. Y Colnago L., *Effects of Doxorubicin, Cisplatin, and Tamoxifen on the Metabolic Profile of Human Breast Cancer MCF-7 Cells As Determined by <sup>1</sup>H High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*, *Biochemistry*, 2017, 56, 2219-2224.

[77] Becco L., Rodríguez A., Bravo M., Prieto M., Ruiz-Azuara L., Garat B., Moreno V., Gambino D., *New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2012**, 109, 49–56.

[78] Müller A., De Vizcaya A., Plant, N., Ruiz- Azuara L. & Dobrota, M. *Mixed chelate copper complex, Casiopeina Ilgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity*. *Chemico-Biological Interactions* 165, 189–199 (2007).

[79] Alemón R., Muñoz J., Ruiz- Azuara L., Gracia I. *Casiopeína Ilgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*, *Toxicology in Vitro*, **2008**, 22, 710–715.

[80] Serment J., Cano P., Reyes E., Velazquez F., Bravo M., Ruiz-Azuara L., *Genotoxicity of the cooper antineoplastic coordination complexes Casiopeínas*, *Toxicology in Vitro*, **2011**, 25, 1376-1384.

[81] Mosmann T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, **1983**, 16, 55-63.

[82] Beckonert O., Keun H., Ebbels T., Bundy J. y Holmes E., *Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma,*

*serum and tissue extracts*, Nature protocols, **2007**, 2, 2692-2703.

[83] Yu W. Chen Y., Dubrulle J., Stossi F., Putluri V., Sreekumar A., Putluri N., Baluya D., Lai S., y Sandulache V., *Cisplatin generates oxidative stress which is accompanied by rapid shifts in central carbon metabolism*, Nature. Cientific Reports, **2018**, 8, 4306.

[84] Lefort N., Brown A., Lloyd V., Ouellette R., Touaibia M., Culf A. y Cuperlovic M., *<sup>1</sup>H NMR metabolomics analysis of the effect of dichloroacetate and allopurinol on breast cancers*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2014**, 93, 77-85.

[85] Madsen R., Lundstedt T. y Trygg J., *Chemometrics in metabolomics—A review in human disease diagnosis*, Analytica Chimica Acta, **2010**, 659, 23-33.

[86] Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). Revisado el día: 05-09-20. <https://www.mfitzp.com/article/partial-least-squares-discriminant-analysis-plsda/>

[87] Woldan S., Sjöströma M. y Eriksson L., *PLS-regression: a basic tool of chemometrics*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **2001**, 58, 109-130.

[88] Banerjee P., Ghosh S., Dutta M., Subramani E., Khalpada J., Choudhury R., Baidyanath S. y Chaudhury K., *Identification of Key Contributory Factors Responsible for Vascular Dysfunction in Idiopathic Recurrent Spontaneous Miscarriage*, PLoS One, **2013**, 8.

[89] Xia J. y Wishart D., *Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst*, Nature Protocols, **2011**, 6, 743-760.

[90] Xia J. y Wishart D., *Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis*, Current Protocols in Bioinformatics, **2016**, 55.

[91] Xiao H., Tung-Ting S. , Chan C., Li M., Chen X., Wu Q., Kam-Wah. D., Yao X. y Wong M., *A Metabolomics Study on the Bone Protective Effects of a Lignan-Rich Fraction From Sambucus Williamsii Ramulus in Aged Rats*, *Frontiers in Pharmacology*, **2018**, 9, 932.

[92] Gupta S., Roy A., Dwarakanath B., *Metabolic Cooperation and Competition in the Tumor Microenvironment: Implications for Therapy*, *Frontiers in Oncology*, **2017**, 7, 68.

[93] Teng-Hern L., Chan K., Pusparajah P., Lee W., Chuah L., Khan T., Lee L., Goh B., *Targeting Membrane Lipid a Potential Cancer Cure?*, *Frontiers in Pharmacology*, **2017**, 8, 12.

[94] Wanders D., Hobson K. y Ji X., *Methionine Restriction and Cancer Biology*, *Nutrients*, **2020**, 12, 684.

[95] Nathan J., Joshua P., Simar J., Andre N., Tovar E., Sanghera A., MacKeigan J., Filipp F., y Carrie R., *Metabolic profiling of triple-negative breast cancer cells reveals metabolic vulnerabilities*, *Cancer and Metabolism*, **2017**, 5, 6.

[96] Amelio I., Cutruzzolá F., Antonov A., Agostini M, Melino G., *Serine and glycine metabolism in cancer*, *Trends in Biochemical Sciences*, **2014**, 39, 191–198.

[97] Nucleotide Synthesis in Cancer Cells. Revisado el día: 10-09-20.  
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/nucleotide-synthesis-in-cancer-cells.html>

[98] Phan L., Yeung S., Lee M., *Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies*, *Cancer Biology and Medicine*, **2014**, 11, 1-19.

[99] Wang Z., Chenfang D., *Gluconeogenesis in Cancer: Function and Regulation of PEPCK, FBPase, and G6Pase*, *Trends in Cancer*, **2019**, 5, 30-45.

[100] Siddiqui A., Cepp P., *A non-proliferative role of pyrimidine metabolism in cancer, molecular metabolism*, **2020**, 35.

[101] Ma Y., Temkin S., Hawkrige A., Guo C., Wang W., Wang X. y Fang X., *Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer*, *Cancer Letters*, **2018**, 435, 92-100.

[102] Choi B. y Coloff J., *The Diverse Functions of Non-Essential Amino Acids in Cancer*, *Cancers*, **2019**, 11, 675.

## **Anexo A.**

### **Características fisicoquímicas de las Casiopeínas<sup>®</sup> empleadas.**

1. Nitrato de 4,4'-dimetil-2,2'-bipridina acetilacetonato cobre(II) monohidratado (**Casiopeína III-ia o CasIII-ia**). Rendimiento: 90%. Análisis elemental calculado para  $\text{CuC}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : (PM = 426.92 g/mol): C, 47.83; N, 9.84; H, 4.96%. Experimental: C, 47.48; N, 9.97; H, 5.07%. IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ): 1616.14, 1587.2, 1525.5, 1490.8, 1384.7 ( $\text{NO}_3^-$ ), 730.9.  $\mu_{\text{eff}} = 1.80$  BM.  $\lambda$  (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 40.23  $\mu\text{S}$ .

2. Nitrato de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) dihidratado (**Casiopeína II-gly o CasII-gly**) Rendimiento: 89%. Análisis elemental calculado para  $\text{CuC}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (PM = 443.9 g/mol): C, 43.29; N, 12.62; H, 4.54. Experimental: C, 43.53; N, 12.61; H, 4.70%. IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ): 3305, 3253, 2945, 1600, 1579, 1383 ( $\text{NO}_3^-$ ), 1430, 871, 726.  $\mu_{\text{eff}} = 1.76$  BM.  $\lambda$  (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 38.8  $\mu\text{S}$ .

## **Anexo B.**

### **Resultados de los experimentos de viabilidad**

### Viabilidad en células sin tratamiento

<i>Tiempo</i>	<i>Repetición</i>	<i>Células vivas</i>	<i>Células muertas</i>	<i>Células totales</i>	<i>% Viabilidad</i>	<i>% Viabilidad promedio por tiempo</i>
<b>0 h</b>	<b>1</b>	98	2	100	98	<b>99.33</b>
	<b>2</b>	92	0	92	100	
	<b>3</b>	74	0	74	100	
<b>20 min</b>	<b>1</b>	90	1	91	98.90	<b>99.23</b>
	<b>2</b>	82	1	83	98.80	
	<b>3</b>	64	0	64	100	
<b>40 min</b>	<b>1</b>	100	0	100	100	<b>99.66</b>
	<b>2</b>	71	0	71	100	
	<b>3</b>	97	1	98	98.98	
<b>1 h</b>	<b>1</b>	108	1	109	99.08	<b>99.38</b>
	<b>2</b>	106	1	107	99.07	
	<b>3</b>	106	0	106	100	
<b>2 h</b>	<b>1</b>	69	2	71	97.18	<b>96.95</b>
	<b>2</b>	82	2	84	97.62	
	<b>3</b>	73	3	76	96.05	
<b>4 h</b>	<b>1</b>	94	0	94	100	<b>99.55</b>
	<b>2</b>	110	0	110	100	
	<b>3</b>	73	1	74	98.65	
<b>6 h</b>	<b>1</b>	109	0	109	100	<b>99.69</b>
	<b>2</b>	104	0	104	100	
	<b>3</b>	105	1	106	99.06	

**Tabla 1.** Resultados de los experimentos de viabilidad para cada muestra en la línea celular MDA-MB-231 **sin tratamiento**.

### Viabilidad en células con cisplatino

<i>Tiempo</i>	<i>Repetición</i>	<i>Células vivas</i>	<i>Células muertas</i>	<i>Células totales</i>	<i>% viabilidad</i>	<i>% viabilidad (promedio por tiempo)</i>
<b>0 h</b>	<b>1</b>	99	0	99	100	<b>99.34</b>
	<b>2</b>	90	1	91	98.90	
	<b>3</b>	113	1	114	99.12	
<b>20 min</b>	<b>1</b>	129	0	129	100	<b>99.69</b>
	<b>2</b>	122	0	122	100	
	<b>3</b>	106	1	107	99.07	
<b>40 min</b>	<b>1</b>	90	4	94	95.74	<b>99.44</b>
	<b>2</b>	80	0	80	100	
	<b>3</b>	84	0	84	100	
<b>1 h</b>	<b>1</b>	80	0	80	100	<b>99.68</b>
	<b>2</b>	92	0	92	100	
	<b>3</b>	103	1	104	99.04	
<b>2 h</b>	<b>1</b>	61	0	61	100	<b>100.00</b>
	<b>2</b>	84	0	84	100	
	<b>3</b>	89	0	89	100	
<b>4 h</b>	<b>1</b>	60	1	61	98.36	<b>97.63</b>
	<b>2</b>	82	2	84	97.62	
	<b>3</b>	126	4	130	96.92	
<b>6 h</b>	<b>1</b>	72	1	73	98.63	<b>98.75</b>
	<b>2</b>	87	1	88	98.86	
	<b>3</b>	118	0	118	100	

**Tabla 2.** Resultados de los experimentos de viabilidad para cada muestra en la línea celular MDA-MB-231 con **cisplatino** (21.76  $\mu$ M).

### Viabilidad en células con CasII-gly

<i>Tiempo</i>	<i>Repetición</i>	<i>Células vivas</i>	<i>Células muertas</i>	<i>Células totales</i>	<i>% viabilidad</i>	<i>% viabilidad (promedio por tiempo)</i>
<b>0 h</b>	<b>1</b>	80	0	80	100	<b>100</b>
	<b>2</b>	210	0	210	100	
	<b>3</b>	102	0	102	100	
<b>20 min</b>	<b>1</b>	156	1	157	99.36	<b>99.79</b>
	<b>2</b>	162	0	162	100	
	<b>3</b>	184	0	184	100	
<b>40 min</b>	<b>1</b>	140	0	140	100	<b>100</b>
	<b>2</b>	157	0	157	100	
	<b>3</b>	139	0	139	100	
<b>1 h</b>	<b>1</b>	120	0	120	100	<b>99.75</b>
	<b>2</b>	133	1	134	99.25	
	<b>3</b>	121	0	121	100	
<b>2 h</b>	<b>1</b>	141	0	141	100	<b>99.61</b>
	<b>2</b>	154	0	154	100	
	<b>3</b>	169	2	171	98.83	
<b>4 h</b>	<b>1</b>	167	3	170	98.24	<b>98.18</b>
	<b>2</b>	187	5	192	97.40	
	<b>3</b>	180	2	182	98.90	
<b>6 h</b>	<b>1</b>	188	6	194	96.91	<b>98.44</b>
	<b>2</b>	152	0	152	100	
	<b>3</b>	186	3	189	98.41	

**Tabla 3.** Resultados de los experimentos de viabilidad para cada muestra en la línea celular MDA-MB-231 con **CasII-gly** (1.5  $\mu$ M).

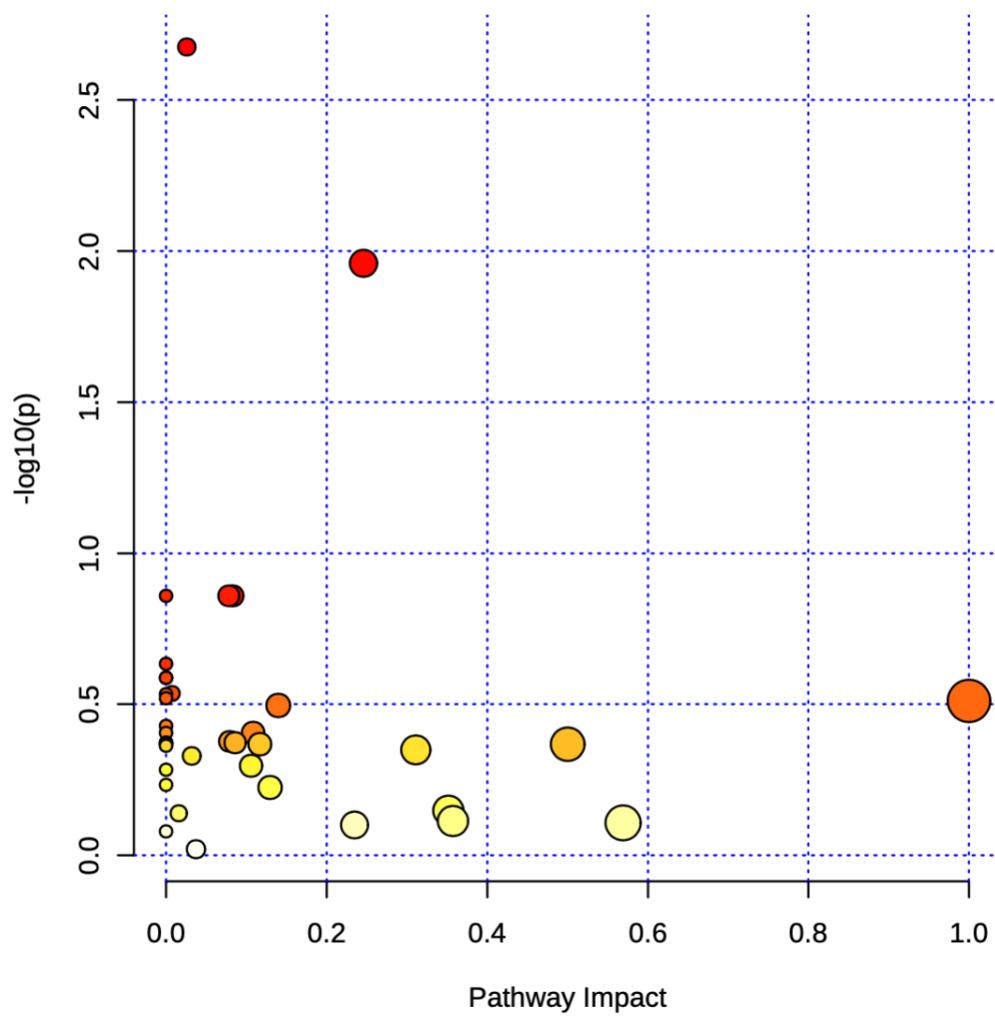
### Viabilidad en células con CasIII-ia

<i>Tiempo</i>	<i>Repetición</i>	<i>Células vivas</i>	<i>Células muertas</i>	<i>Células totales</i>	<i>% viabilidad</i>	<i>% viabilidad (promedio por tiempo)</i>
<b>0 h</b>	<b>1</b>	190	0	190	100	<b>100</b>
	<b>2</b>	98	0	98	100	
	<b>3</b>	119	0	119	100	
<b>20 min</b>	<b>1</b>	157	2	159	98.74	<b>99.58</b>
	<b>2</b>	147	0	147	100	
	<b>3</b>	137	0	137	100	
<b>40 min</b>	<b>1</b>	106	0	106	100	<b>99.44</b>
	<b>2</b>	343	2	345	99.42	
	<b>3</b>	367	4	371	98.92	
<b>1 h</b>	<b>1</b>	185	0	185	100	<b>99.63</b>
	<b>2</b>	171	1	172	99.42	
	<b>3</b>	189	1	190	99.47	
<b>2 h</b>	<b>1</b>	93	0	0	100	<b>98.58</b>
	<b>2</b>	193	3	196	98.47	
	<b>3</b>	226	3	229	98.69	
<b>4 h</b>	<b>1</b>	200	0	200	100	<b>98.91</b>
	<b>2</b>	171	1	172	99.42	
	<b>3</b>	217	6	223	97.31	
<b>6 h</b>	<b>1</b>	190	4	194	97.94	<b>98.59</b>
	<b>2</b>	259	2	261	99.23	
	<b>3</b>	190	4	194	97.94	

**Tabla 4.** Resultados de los experimentos de viabilidad para cada muestra en la línea celular MDA-MB-231 con **CasIII-ia** (15.55  $\mu$ M).

## **Anexo C.**

### **Resultados de los experimentos de QEA Y PEA**



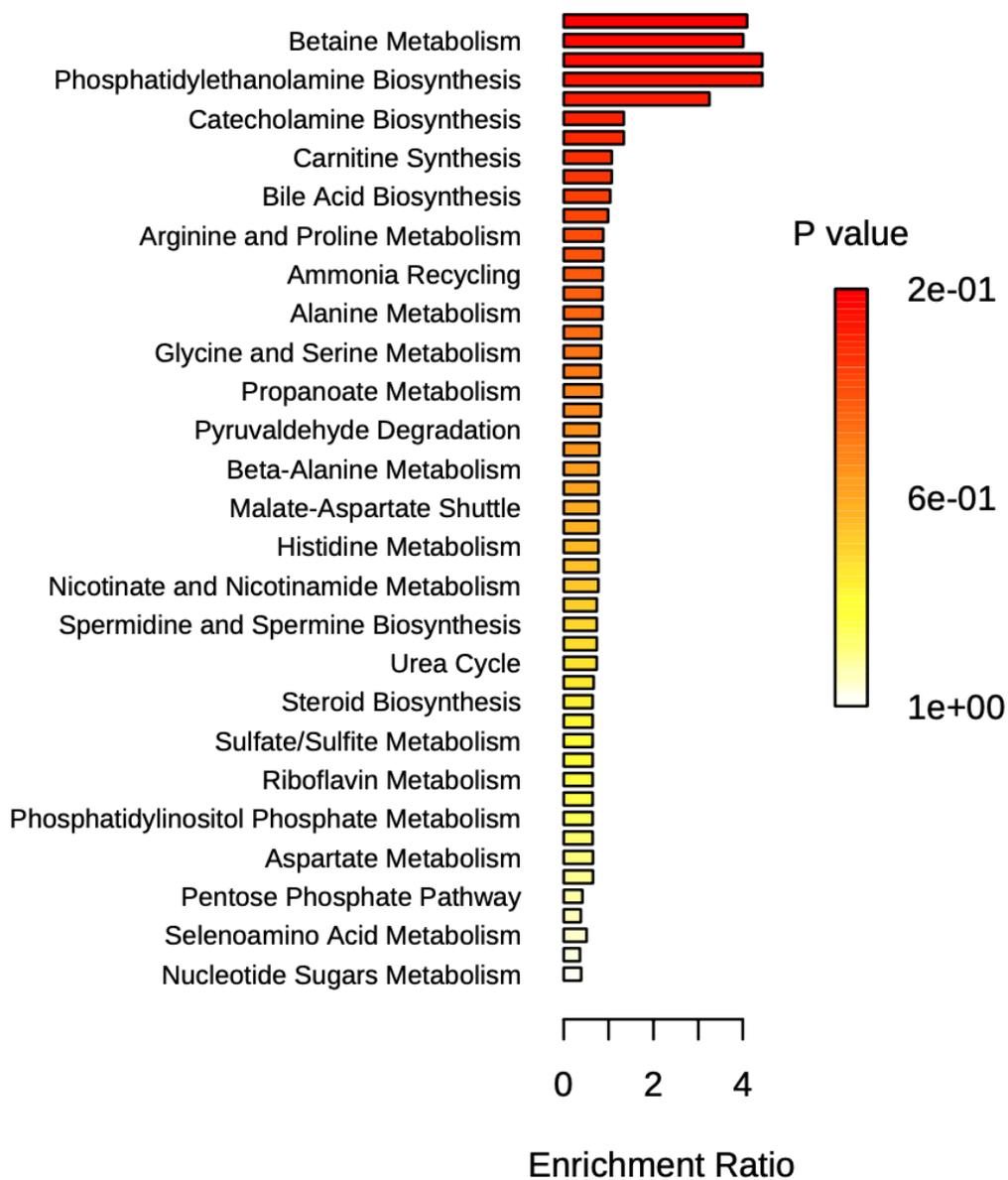
**Imagen 1.** Gráfico del análisis PEA para las muestras intracelulares en ambos tiempos de tratamiento.

Table 2: Result from Pathway Analysis

	Total Cmpd	Hits	Raw p	-log10(p)	Holm adjust	FDR	Impact
Glycerophospholipid metabolism	36	1	2.11E-03	2.68E+00	7.82E-02	7.82E-02	0.03
Glycine, serine and threonine metabolism	33	3	1.10E-02	1.96E+00	3.95E-01	2.03E-01	0.25
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	37	1	1.38E-01	8.60E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.08
Pentose and glucuronate interconversions	18	1	1.38E-01	8.60E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.08
Ascorbate and aldarate metabolism	8	1	1.38E-01	8.60E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Propanoate metabolism	23	1	2.33E-01	6.33E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8	3	2.59E-01	5.87E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Valine, leucine and isoleucine degradation	40	3	2.59E-01	5.87E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Primary bile acid biosynthesis	46	1	2.91E-01	5.35E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.01
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	9	1	2.93E-01	5.33E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	1	3.02E-01	5.19E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	2	3.08E-01	5.11E-01	1.00E+00	6.63E-01	1.00
Tyrosine metabolism	42	2	3.19E-01	4.96E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.14
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	9	3.73E-01	4.28E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Glutathione metabolism	28	2	3.93E-01	4.05E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.11
Porphyrin and chlorophyll metabolism	30	2	3.93E-01	4.05E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	2	4.20E-01	3.77E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.08
Butanoate metabolism	15	2	4.24E-01	3.73E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Histidine metabolism	16	1	4.24E-01	3.73E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Arginine and proline metabolism	38	2	4.24E-01	3.72E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.09
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	6	2	4.29E-01	3.67E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.50
Arginine biosynthesis	14	2	4.29E-01	3.67E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.12
Nitrogen metabolism	6	2	4.29E-01	3.67E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Cysteine and methionine metabolism	33	1	4.34E-01	3.62E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	5	4.48E-01	3.49E-01	1.00E+00	6.63E-01	0.31
Purine metabolism	65	4	4.69E-01	3.29E-01	1.00E+00	6.68E-01	0.03
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	5	5.06E-01	2.96E-01	1.00E+00	6.89E-01	0.11
Selenocompound metabolism	20	1	5.21E-01	2.83E-01	1.00E+00	6.89E-01	0.00
Inositol phosphate metabolism	30	1	5.85E-01	2.33E-01	1.00E+00	7.36E-01	0.00
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	2	5.96E-01	2.24E-01	1.00E+00	7.36E-01	0.13
Pyruvate metabolism	22	3	7.12E-01	1.48E-01	1.00E+00	8.39E-01	0.35
Pyrimidine metabolism	39	2	7.26E-01	1.39E-01	1.00E+00	8.39E-01	0.02
Phenylalanine metabolism	10	3	7.70E-01	1.13E-01	1.00E+00	8.39E-01	0.36
Starch and sucrose metabolism	18	3	7.81E-01	1.07E-01	1.00E+00	8.39E-01	0.57
Nicotinate and nicotinamide metabolism	15	1	7.94E-01	1.00E-01	1.00E+00	8.39E-01	0.23
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	2	2	8.34E-01	7.90E-02	1.00E+00	8.57E-01	0.00
Galactose metabolism	27	2	9.55E-01	2.02E-02	1.00E+00	9.55E-01	0.04

**Tabla 1.** Resultados del análisis PEA para las muestras intracelulares para ambos tiempos de tratamiento.

## Enrichment Overview (top 50)



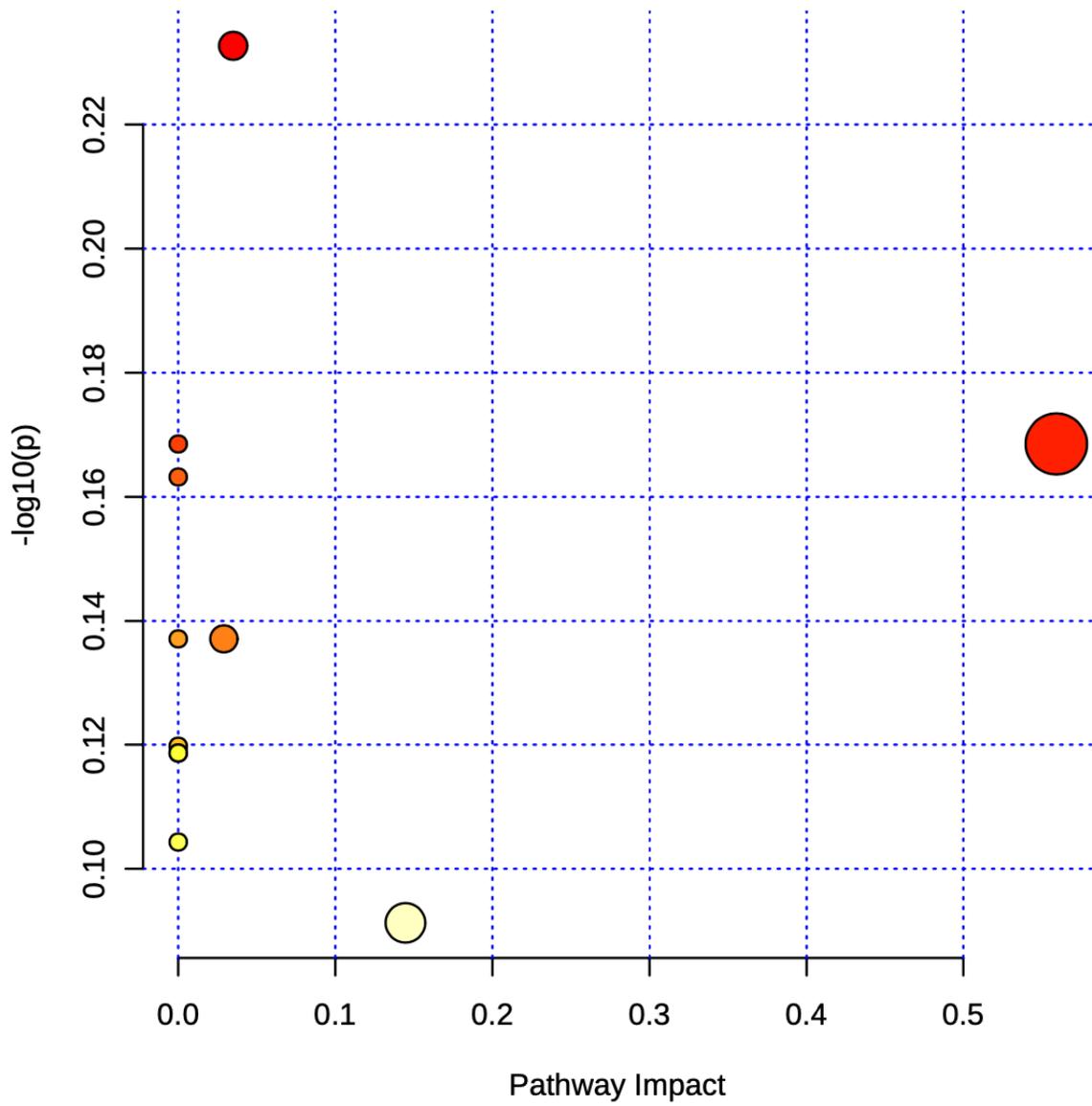
**Imagen 2.** Gráfico del análisis QEA para las muestras intracelulares en ambos tiempos de tratamiento.

Table 2: Result from Quantitative Enrichment Analysis

	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Expected Q	Raw p	Holm p	FDR
Phospholipid Biosynthesis	29	2	81.93	20.00	2.17E-03	1.93E-01	5.24E-02
Betaine Metabolism	21	4	80.21	20.00	2.32E-03	2.04E-01	5.24E-02
Phosphatidylcholine Biosynthesis	14	3	88.70	20.00	2.35E-03	2.05E-01	5.24E-02
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis	12	3	88.70	20.00	2.35E-03	2.05E-01	5.24E-02
Methionine Metabolism	43	5	64.94	20.00	1.15E-02	9.78E-01	2.05E-01
Catecholamine Biosynthesis	20	1	26.78	20.00	2.93E-01	1.00E+00	8.91E-01
Thyroid hormone synthesis	13	1	26.78	20.00	2.93E-01	1.00E+00	8.91E-01
Carnitine Synthesis	22	3	21.43	20.00	3.55E-01	1.00E+00	8.91E-01
Porphyrin Metabolism	40	2	21.41	20.00	3.55E-01	1.00E+00	8.91E-01
Bile Acid Biosynthesis	65	4	20.74	20.00	3.64E-01	1.00E+00	8.91E-01
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	8	19.78	20.00	3.86E-01	1.00E+00	8.91E-01
Arginine and Proline Metabolism	53	6	17.61	20.00	4.09E-01	1.00E+00	8.91E-01
Purine Metabolism	74	7	17.64	20.00	4.11E-01	1.00E+00	8.91E-01
Ammonia Recycling	32	7	17.43	20.00	4.14E-01	1.00E+00	8.91E-01
Glutathione Metabolism	21	5	17.33	20.00	4.14E-01	1.00E+00	8.91E-01
Alanine Metabolism	17	6	17.32	20.00	4.14E-01	1.00E+00	8.91E-01
Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	28	4	16.83	20.00	4.21E-01	1.00E+00	8.91E-01
Glycine and Serine Metabolism	59	7	16.64	20.00	4.22E-01	1.00E+00	8.91E-01
Arachidonic Acid Metabolism	69	1	16.51	20.00	4.24E-01	1.00E+00	8.91E-01
Propanoate Metabolism	42	5	16.95	20.00	4.29E-01	1.00E+00	8.91E-01
Glutamate Metabolism	49	9	16.55	20.00	4.30E-01	1.00E+00	8.91E-01
Pyruvaldehyde Degradation	10	1	15.87	20.00	4.34E-01	1.00E+00	8.91E-01
Tyrosine Metabolism	72	3	15.88	20.00	4.39E-01	1.00E+00	8.91E-01
Beta-Alanine Metabolism	34	2	15.55	20.00	4.42E-01	1.00E+00	8.91E-01
Lysine Degradation	30	2	15.55	20.00	4.42E-01	1.00E+00	8.91E-01
Malate-Aspartate Shuttle	10	2	15.55	20.00	4.42E-01	1.00E+00	8.91E-01
Cysteine Metabolism	26	5	15.49	20.00	4.45E-01	1.00E+00	8.91E-01
Histidine Metabolism	43	4	15.48	20.00	4.45E-01	1.00E+00	8.91E-01
Folate Metabolism	29	4	15.48	20.00	4.45E-01	1.00E+00	8.91E-01
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	5	15.44	20.00	4.50E-01	1.00E+00	8.91E-01
Biotin Metabolism	8	1	14.74	20.00	4.52E-01	1.00E+00	8.91E-01
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	1	14.74	20.00	4.52E-01	1.00E+00	8.91E-01
Tryptophan Metabolism	60	4	14.74	20.00	4.60E-01	1.00E+00	8.91E-01
Urea Cycle	29	7	14.73	20.00	4.66E-01	1.00E+00	8.91E-01
Oxidation of Branched Chain Fatty Acids	26	3	13.34	20.00	4.85E-01	1.00E+00	8.91E-01
Steroid Biosynthesis	48	2	12.89	20.00	4.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Pantothenate and CoA Biosynthesis	21	2	12.89	20.00	4.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Sulfate/Sulfite Metabolism	22	2	12.89	20.00	4.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	2	12.89	20.00	4.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Riboflavin Metabolism	20	2	12.89	20.00	4.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Thiamine Metabolism	9	2	12.89	20.00	4.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Phosphatidylinositol Phosphate Metabolism	17	2	12.89	20.00	4.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Trehalose Degradation	11	2	12.89	20.00	4.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Aspartate Metabolism	35	4	13.03	20.00	4.96E-01	1.00E+00	8.91E-01
Amino Sugar Metabolism	33	6	13.03	20.00	5.54E-01	1.00E+00	8.91E-01
Pentose Phosphate Pathway	29	3	8.32	20.00	5.91E-01	1.00E+00	8.91E-01
Fatty Acid Biosynthesis	35	1	7.63	20.00	5.96E-01	1.00E+00	8.91E-01
Selenoamino Acid Metabolism	28	5	10.19	20.00	6.12E-01	1.00E+00	8.91E-01
Ethanol Degradation	19	3	7.23	20.00	6.20E-01	1.00E+00	8.91E-01
Nucleotide Sugars Metabolism	20	5	7.77	20.00	6.51E-01	1.00E+00	8.91E-01
Starch and Sucrose Metabolism	31	5	7.77	20.00	6.51E-01	1.00E+00	8.91E-01
Inositol Metabolism	33	4	7.62	20.00	6.54E-01	1.00E+00	8.91E-01
Inositol Phosphate Metabolism	26	4	7.62	20.00	6.54E-01	1.00E+00	8.91E-01
Pyrimidine Metabolism	59	5	11.62	20.00	7.02E-01	1.00E+00	8.91E-01
Pyruvate Metabolism	48	6	8.89	20.00	7.51E-01	1.00E+00	8.91E-01
Glucose-Alanine Cycle	13	5	7.78	20.00	7.58E-01	1.00E+00	8.91E-01
Warburg Effect	58	10	8.37	20.00	7.65E-01	1.00E+00	8.91E-01
Ketone Body Metabolism	13	2	2.19	20.00	7.87E-01	1.00E+00	8.91E-01
Pterine Biosynthesis	29	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Caffeine Metabolism	24	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Fatty Acid Elongation In Mitochondria	35	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Androgen and Estrogen Metabolism	33	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Retinol Metabolism	37	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Glycerol Phosphate Shuttle	11	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Steroidogenesis	43	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Plasmalogen Synthesis	26	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
De Novo Triacylglycerol Biosynthesis	9	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Cardiolipin Biosynthesis	11	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Androstenedione Metabolism	24	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01
Estrone Metabolism	24	1	1.92	20.00	7.94E-01	1.00E+00	8.91E-01

Citric Acid Cycle	32	5	6.21	20.00	8.00E-01	1.00E+00	8.91E-01
Gluconeogenesis	35	7	4.97	20.00	8.14E-01	1.00E+00	8.91E-01
Butyrate Metabolism	19	3	4.32	20.00	8.14E-01	1.00E+00	8.91E-01
Phenylacetate Metabolism	9	3	6.60	20.00	8.18E-01	1.00E+00	8.91E-01
Fatty acid Metabolism	43	2	4.11	20.00	8.20E-01	1.00E+00	8.91E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	2	4.11	20.00	8.20E-01	1.00E+00	8.91E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids	27	2	4.11	20.00	8.20E-01	1.00E+00	8.91E-01
Mitochondrial Beta-Oxidation of Long Chain Saturated Fatty Acids	28	2	4.11	20.00	8.20E-01	1.00E+00	8.91E-01
Mitochondrial Electron Transport Chain	19	4	5.15	20.00	8.27E-01	1.00E+00	8.91E-01
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	26	4	5.15	20.00	8.27E-01	1.00E+00	8.91E-01
Glycerolipid Metabolism	25	3	4.97	20.00	8.31E-01	1.00E+00	8.91E-01
Fructose and Mannose Degradation	32	3	4.97	20.00	8.31E-01	1.00E+00	8.91E-01
Threonine and 2-Oxobutanoate Degradation	20	3	4.97	20.00	8.31E-01	1.00E+00	8.91E-01
Glycolysis	25	6	2.81	20.00	8.77E-01	1.00E+00	9.20E-01
Galactose Metabolism	38	6	2.79	20.00	8.78E-01	1.00E+00	9.20E-01
Sphingolipid Metabolism	40	4	0.41	20.00	9.25E-01	1.00E+00	9.40E-01
Lactose Synthesis	20	4	0.41	20.00	9.25E-01	1.00E+00	9.40E-01
Lactose Degradation	9	3	0.32	20.00	9.29E-01	1.00E+00	9.40E-01
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	5	0.54	20.00	9.87E-01	1.00E+00	9.87E-01

**Tabla 2.** Resultados del análisis QEA para las muestras intracelulares para ambos tiempos de tratamiento.



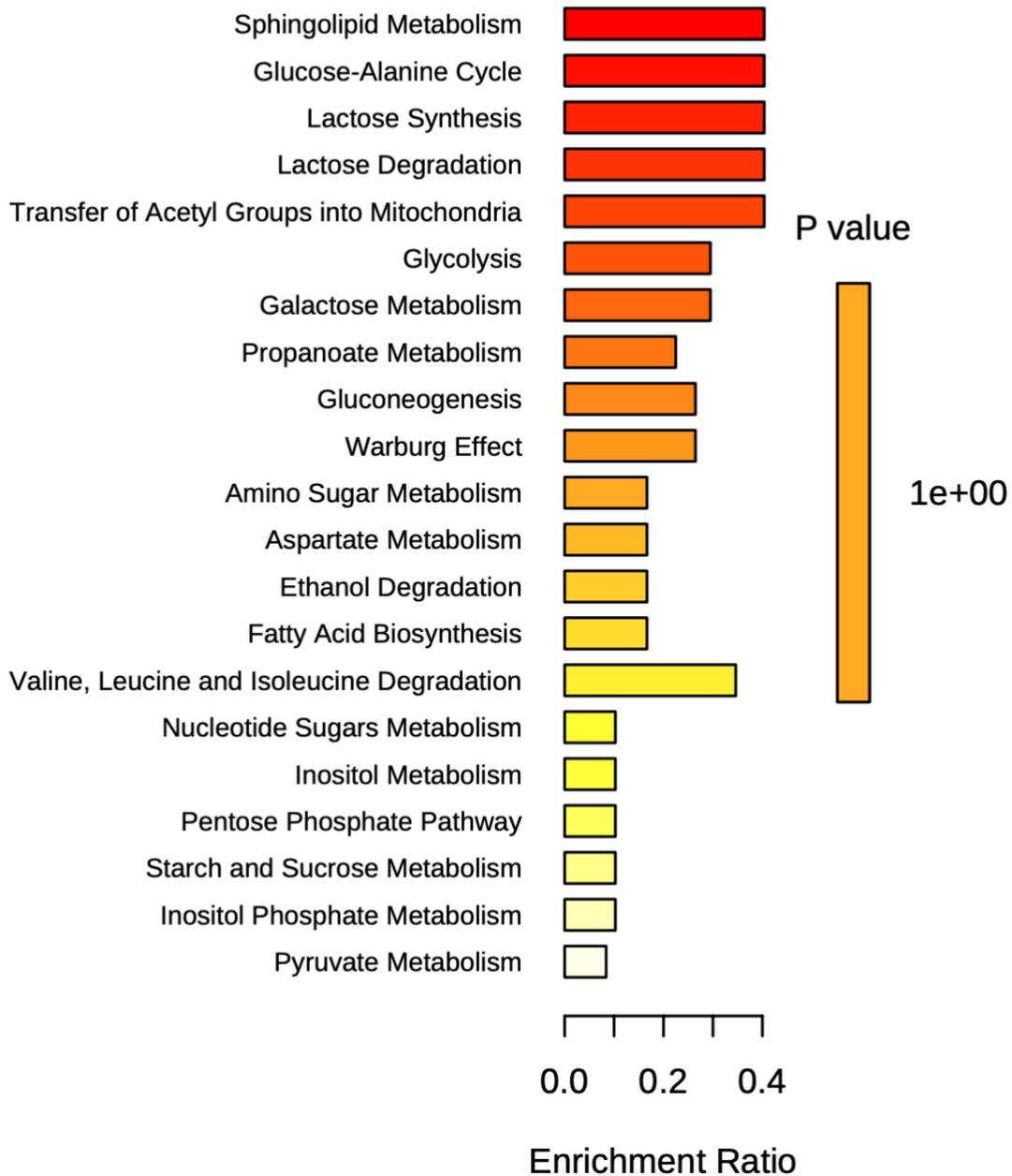
**Imagen 3.** Gráfico del análisis PEA para las muestras extracelulares en ambos tiempos de tratamiento.

Table 2: Result from Pathway Analysis

	Total Cmpd	Hits	Raw p	$-\log_{10}(p)$	Holm adjust	FDR	Impact
Galactose metabolism	27	1	5.85E-01	2.33E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.03
Starch and sucrose metabolism	18	2	6.78E-01	1.69E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.56
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	2	2	6.78E-01	1.69E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.00
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	1	6.87E-01	1.63E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.00
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	1	7.29E-01	1.37E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.03
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	1	7.29E-01	1.37E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8	3	7.59E-01	1.20E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.00
Valine, leucine and isoleucine degradation	40	3	7.61E-01	1.19E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.00
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	3	7.61E-01	1.19E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.00
Inositol phosphate metabolism	30	1	7.86E-01	1.04E-01	1.00E+00	8.10E-01	0.00
Pyruvate metabolism	22	2	8.10E-01	9.13E-02	1.00E+00	8.10E-01	0.14

**Tabla 3.** Resultados del análisis PEA para las muestras extracelulares para ambos tiempos de tratamiento.

## Metabolite Sets Enrichment Overview



**Imagen 4.** Gráfico del análisis QEA para las muestras extracelulares en ambos tiempos de tratamiento.

Table 2: Result from Quantitative Enrichment Analysis

	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Expected Q	Raw p	Holm p	FDR
Sphingolipid Metabolism	40	1	8.07	20.00	5.85E-01	1.00E+00	8.10E-01
Glucose-Alanine Cycle	13	1	8.07	20.00	5.85E-01	1.00E+00	8.10E-01
Lactose Synthesis	20	1	8.07	20.00	5.85E-01	1.00E+00	8.10E-01
Lactose Degradation	9	1	8.07	20.00	5.85E-01	1.00E+00	8.10E-01
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	1	8.07	20.00	5.85E-01	1.00E+00	8.10E-01
Glycolysis	25	2	5.90	20.00	6.78E-01	1.00E+00	8.10E-01
Galactose Metabolism	38	2	5.90	20.00	6.78E-01	1.00E+00	8.10E-01
Propanoate Metabolism	42	1	4.49	20.00	6.87E-01	1.00E+00	8.10E-01
Gluconeogenesis	35	3	5.29	20.00	7.01E-01	1.00E+00	8.10E-01
Warburg Effect	58	3	5.29	20.00	7.01E-01	1.00E+00	8.10E-01
Amino Sugar Metabolism	33	1	3.33	20.00	7.29E-01	1.00E+00	8.10E-01
Aspartate Metabolism	35	1	3.33	20.00	7.29E-01	1.00E+00	8.10E-01
Ethanol Degradation	19	1	3.33	20.00	7.29E-01	1.00E+00	8.10E-01
Fatty Acid Biosynthesis	35	1	3.33	20.00	7.29E-01	1.00E+00	8.10E-01
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	3	6.92	20.00	7.59E-01	1.00E+00	8.10E-01
Nucleotide Sugars Metabolism	20	1	2.05	20.00	7.86E-01	1.00E+00	8.10E-01
Inositol Metabolism	33	1	2.05	20.00	7.86E-01	1.00E+00	8.10E-01
Pentose Phosphate Pathway	29	1	2.05	20.00	7.86E-01	1.00E+00	8.10E-01
Starch and Sucrose Metabolism	31	1	2.05	20.00	7.86E-01	1.00E+00	8.10E-01
Inositol Phosphate Metabolism	26	1	2.05	20.00	7.86E-01	1.00E+00	8.10E-01
Pyruvate Metabolism	48	2	1.68	20.00	8.10E-01	1.00E+00	8.10E-01

**Tabla 4.** Resultados del análisis QEA para las muestras extracelulares para ambos tiempos de tratamiento.